

Oxygen metabolism in organism. Part I: A physiological standard

Gajewski M.¹, Kamińska E.², Wysocki Ł.³, Szczepanik Sz.³, Sygítowicz G.⁴, Wojciechowski M.⁵, Pachecka J.⁴, Maśliński S.^{1,3} • Department of Biochemistry, Institute of Rheumatology, Warsaw¹, Department of Pathophysiology and Immunology, Institute of Rheumatology, Warsaw², Department of General and Experimental Pathology, Medical Academy, Warsaw³, Department of Clinical Biochemistry and Chemistry, Medical Academy, Warsaw⁴, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University⁵.

Oxygen is a very common element and can be found not only on Earth but throughout the universe, usually bound with other elements. Unbound oxygen (usually called molecular oxygen, O₂) made its initial appearance on Earth as a product of the metabolic activity of early anaerobes (archaea and bacteria). The atmospheric abundance of free oxygen up to the present time has been largely driven by terrestrial plants, which release oxygen during photosynthesis. Oxygen is essential in sustaining all kinds of life. Certain derivatives of oxygen, such as ozone (O₃), hydrogen peroxide, oxyradicals and superoxide are highly toxic. Oxyradicals are generally considered harmful byproducts of oxidative metabolism, causing molecular damage in living systems. They are involved in processes such as mutagenesis, aging, and in series of pathological events. Thus every organism has developed a mechanism to protect itself against these toxic species. Many antioxidants, like glutathione, neutralize harmful oxygen derivatives. This paper outlines current knowledge of oxygen metabolism in animals and the role of free radicals in cell biology.

Keywords: oxygen, metabolism, reactive oxygen species, ageing, ROS toxicity.

Tlen to pierwiastek, bez którego zdecydowana większość organizmów na naszej planecie nie mogłaby istnieć. Z racji swojej dużej aktywności chemicznej potrafi być on również wyjątkowo niebezpieczny.

Gospodarka tlenowa w organizmie. Część I. Warunki normy fizjologicznej

Michał Gajewski¹, Elżbieta Kamińska², Łukasz Wysocki³, Szymon Szczepanik³, Grażyna Sygítowicz⁴, Mikołaj Wojciechowski⁵, Jan Pachecka⁴, Sławomir Maśliński^{1,3}

z Zakładu Biochemii¹ oraz Zakładu Patofizjologii i Immunologii² Instytutu Reumatologii w Warszawie, Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej³ oraz Katedry i Zakładu Biochemii i Chemii Klinicznej⁴ Akademii Medycznej w Warszawie, Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie⁵

Organizmy żyjące w atmosferze 21% tlenu i wykorzystujące go do oddychania komórkowego musiały wykształcić skomplikowane mechanizmy obronne, chroniące je przed negatywnymi skutkami ubocznymi takiego sposobu pozyskiwania energii. Wytworzył się delikatny stan równowagi, którego zaburzenia mogą być przyczyną wielu patologii. Zachwianie tego stanu na rzecz prooksydantów, kosztem antyoksydantów, nazwane zostało stresem oksydacyjnym.

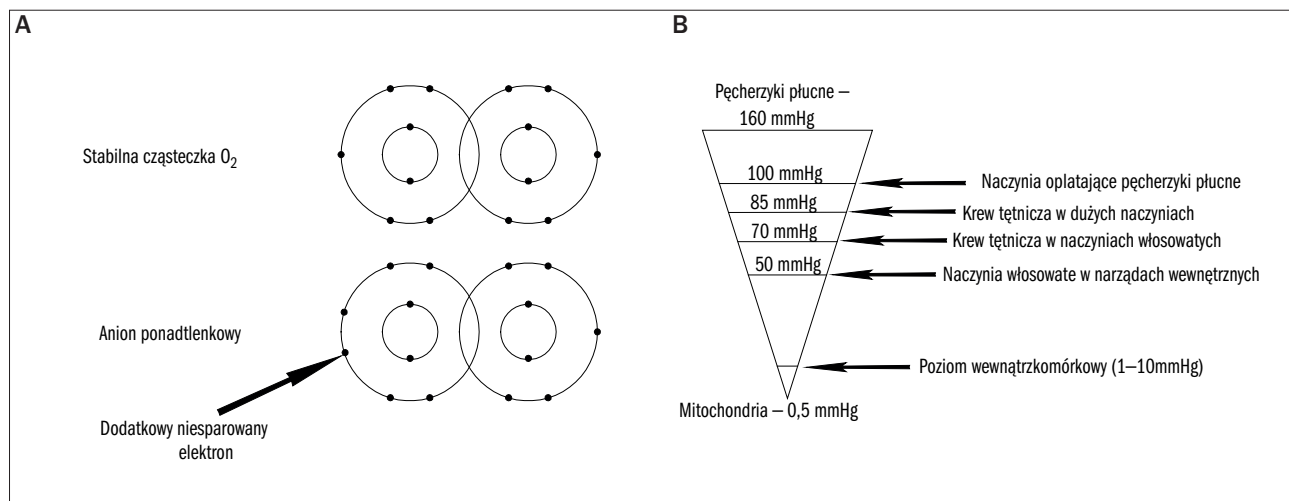
Artykuł ten jest próbą spojrzenia na tak różne zjawiska, jak fizjologiczna norma, proces starzenia się czy obumierania oraz patologiczne: niedotlenienie, zapalenie (w tym przewlekłe), choroby neurodegeneracyjne, jak Huntingtona, Alzheimera lub Parkinsona, jedynie poprzez pryzmat zakłóconej gospodarki tlenem.

Aktywny tlen

Kiedy w atmosferze Ziemi nie było wolnego tlenu (O₂), nie było również warstwy ozonowej (O₃). Promieniowanie ultrafioletowe docierało do powierzchni Ziemi bez przeszkód i było 30-krotnie bardziej intensywne od obecnego (1). Pierwszym źródłem tlenu w atmosferze nie był, jak się powszechnie uważa, biologiczny proces fotosyntezy,

lecz jego chemiczny ekwiwalent. Energia słoneczna, a szczególnie promieniowanie ultrafioletowe, mogą powodować rozkład, np. siarkowodoru, z rozbięciem cząsteczki wody na wodór, tlen i jego pochodne (aniony ponadtlenkowe, nadtlutki wodoru, rodniki hydroksylowe) z uwolnieniem energii (2).

Badania misji Viking na Marsie (1976 r.) wykazały obecność bardzo dużych ilości pochodnych tlenu, powstałych właśnie poprzez oddziaływanie promieniowania ultrafioletowego na parę wodną, obecną w śladowych ilościach na Marsie. Jest ich tak dużo, iż uważa się Marsa za planetę w stanie szoku oksydacyjnego (3). Wobec braku wód powierzchniowych związki te wchodziły w reakcję z żelazem, dając w efekcie rdzawe tlenki, którym planeta ta zawdzięcza swoją nazwę. Na Ziemi większość tlenków metali jest nietrwała, ale w sterylnych i suchych warunkach są one trwałe. Dzisiejsze warunki na Marsie odpowiadają panującym na Ziemi 4 mld lat temu. Zbiorniki wodne zawierały tak duże ilości utleniaczy, że dobór naturalny sprzyjał ewolucji enzymów antyoksydacyjnych (4). Tak więc pierwotne organizmy, zbliżone do dzisiejszych bakterii (choć jeszcze beztlenowe), posiadały już enzymy chroniące przed toksycznym wpływem tle-



Ryc. 1. A – schemat budowy anionu nadtlenkowego, B – zakres obniżania stężenia tlenu w organizmie człowieka

nu. Energię potrzebną do życia zdobywały, przeprowadzając rozkład siarkowodoru lub żelaza, przy użyciu energii świetlnej. Z jednego z tych enzymów (z dwóch cząsteczek katalazy) wyewoluował kompleks enzymatyczny niezbędny w fotosyntezie oksygenicznej (fotosystem II: kompleks rozszczepiający wodę i uwalniający tlen). Powstała możliwość uzyskiwania energii poprzez rozkład wody (i energii świetlnej), który jest systemem wielokrotnie bardziej sprawnym od fotosyntezy opartej na rozkładzie np. siarkowodoru (5, 6).

Wolny tlen, w postaci cząsteczkowej, może powstać w dużych ilościach jedynie w procesie fotosyntezy polegającej na rozkładzie wody. Według najpowszechniejszej z teorii, gdy ilość tlenu w atmosferze przekroczyła 0,5% nastąpiło wielkie wymieranie istot nie mogących przystosować się do tak wysokiego stężenia tego niezwykle aktywnego chemicznie pierwiastka (4, 7).

W tym właśnie czasie doszło do symbiozy między tworzącymi się komórkami eukariotycznymi a mitochondriami, samodzielnie egzystującymi bakteriami. Miały one nie tylko sprawny system zabezpieczający przed toksycznym tlenem, ale dysponowały również unikalną zdolnością komórkowego oddychania tlenem. Proces redukcji tlenu przez oksydazę cytochromową jest dokładnym odwróceniem reakcji fotolizy wody. Jest to reakcja prowadząca do połączenia tlenu z wodą. Rolą oksydazy cytochromowej jest uzyskanie jak największej ilości energii i niedopuszczenie do ucieczki pośrednich, reaktywnych postaci tlenu. Mitochondria pochłonięte przez nowo powstające komórki do dzisiaj zachowały pewną autonomię: własne DNA czy mnożenie się przez podziały, niezależnie od podziałów komórki, wewnątrz której egzystują (7, 8).

Podsumowując: tlen ulegać może zarówno pełnej redukcji do cząsteczki wody, z równoczesnym wytworzeniem energii (co jest podstawą tlenowego oddychania ko-

mórkowego), jak i niepełnej redukcji, w wyniku której powstają tzw. aktywne metabolity tlenowe (wolne rodniki tlenowe, reaktywne formy tlenu).

Zawierają one na swoich orbitalach dodatkowe, niesparowane elektrony, „dążące” do jak najszybszego połączenia się z orbitalami innych atomów, w celu wytworzenia stabilnego połączenia chemicznego. To chaotyczne wchodzenie w niekontrolowane enzymatycznie reakcje chemiczne jest niezwykle toksyczne („nieprzewidziane w biochemicznym planie”). Toksyczność aktywnych metabolitów tlenowych wynika więc z szybkiego wchodzenia przez nie, w chaotyczny sposób, w dowolne reakcje chemiczne (9, 10).

Ze względu na toksyczność wolnych rodników tlenowych organizmy wielokomórkowe, składające się głównie z komórek tylko częściowo dostosowanych do wysokich stężeń tlenu (mitochondria), powinny ograniczać zawartość tlenu w stosunku do otoczenia. Gdy tlenofobne orzęski (pierwotniaki) zostaną umieszczone w silnie natlenowanej wodzie, ich pierwszym odruchem jest poszukiwanie miejsca o niższej koncentracji tlenu. Gdy nie mają gdzie uciekać, zbijają się w gromadkę. Przypuszczalnie, to konieczność ograniczenia toksyczności tlenu była bodźcem do powstania organizmów wielokomórkowych (7, 11).

U człowieka głównym mechanizmem obronnym przed toksycznością tlenu jest tzw. kaskada tlenowa, czyli stopniowe obniżanie prężności tlenu. Ciśnienie atmosferyczne tlenu wynosi 160 mmHg, w płucach jest on wiązany przez hemoglobinę erytrocytów, znajdujących się w naczyniach włosowatych oplatających pęcherzyki płucne. W naczyniach tych nasycenie hemoglobiny tlenem sięga 95%, a ciśnienie tlenu wynosi tutaj około 100 mmHg. W trakcie krążenia krwi hemoglobina oddaje tlen i jego ciśnienie stopniowo spada. W krwi wychodzącej z serca (w obiegu ustrojowym) ciśnienie to wynosi 85 mm Hg, w rozgałę-

ziających się tętniczkach wynosi 70 mm Hg, a w sieci naczyń włosowatych w narządach wewnętrznych już tylko 50 mm Hg. Tutaj nasycenie hemoglobiny tlenem jest na poziomie 60–70%. Tlen odłącza się od hemoglobiny i wchodzi do wnętrza komórki drogą dyfuzji od większego stężenia do mniejszego. Ten gradient stężeń utrzymuje się na skutek ciągłego zużywania tlenu w procesie oddychania komórkowego. We wnętrzu ciała ciśnienie tlenu w komórkach wynosi tylko 1–10 mmHg. Ostatnim etapem wędrówki tlenu są mitochondria, gdzie reakcje oddechowe obniżają jeszcze bardziej jego poziom. Ciśnienie tlenu w mitochondriach wynosi zaledwie 0,5 mm Hg. W przeliczeniu procentowym jest to poziom niższy niż 0,3% ciśnienia tlenu atmosferycznego, czyli 0,07% ciśnienia powietrza. Tak więc zawartość tlenu w mitochondriach jest prawie taka sama, jak w atmosferze, uznawanej przez za beztlenową, jaka panowała przed epoką znanej nam fotosyntezy (5, 7, 12). Schemat budowy anionu nadtlenkowego oraz spadku ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach człowieka przedstawia **rycina 1**.

Podstawowym źródłem energii w komórkach człowieka jest mitochondrialny proces oksydacyjnej fosforylacji. Dostarcza on ponad 90% adenosynotryfosforanu (ATP). Pozostałe 10% ATP powstaje w procesie beztlenowej glikolizy, zachodzącej w cytoplazmie (13). W tkankach o wysokim metabolizmie, jak np. serce, mitochondria mogą zajmować nawet do 40% objętości komórek.

Kompleks enzymatyczny wytwarzający energię, a znajdujący się w mitochondriach, nie jest sprawny w 100 procentach. Ponad 5% tlenu zużywanego przez mitochondria i peroksosomy jest bowiem zamieniane na nadtlenek wodoru, a dalsze 5% służy do powstawania częściowo zredukowanej postaci tlenu - anionu nadtlenkowego (14). W efekcie, około 3% tlenu w komórkach serca i około 10% w komór-

kach płuc nie dociera do końcowego enzymu redukującego tlen do wody (czyli do oksydazy cytochromowej), lecz w postaci reaktywnych form tlenu wycieka (leakage) przez błony mitochondriów (15).

Jak podaje Sayre (16), w procesach tlenowo-zależnego wytwarzania energii, każda komórka człowieka zużywa 10^{13} atomów tlenu dziennie. Szacuje się, że dziennie w jednej komórce wytwarzane jest 10^{11} aktywnych metabolitów tlenowych, a więc z prostego wyliczenia wynika, iż w komórkach płuc wytworzy się ich 10^{12} .

Wiadomo, że wolne rodniki tlenowe są również jedną z trzech głównych trucizn zawartych w dymie papierosowym (po smołach pogazowych i nikotynie). W jednym haucie papierosowym jest ich aż 10^{15} (10); a w całym papierosie (na który przypadnie około 10 haustów) będzie ich więc 10^{16} . Ciało człowieka składa się z około 200 typów komórek o różnej wielkości. Zakładając, że 1 mln komórek człowieka o uśrednionej wielkości zajmuje objętość około 1 mm^3 , to tkanka o objętości 1 cm^3 zawierać będzie 10^9 komórek. Tak więc przez objętość „jednego centymetra sześciennego płuc” (uśredniając wielkość komórek i zakładając, że nie ma pomiędzy nimi macierzy pozakomórkowej) przepływać będzie dziennie do 10^{21} reaktywnych form tlenu (10^{12} aktywnych metabolitów tlenowych na $1 \text{ komórkę} \times 10^9$ komórek).

Z obliczeń tych wynika, że skutkiem ubocznym metabolizmu tlenowego może być wytwarzanie w 1 cm^3 pęcherzyków płucnych takiej ilości wolnych rodników tlenowych, jak podczas wypalania 10^4 – 10^5 papierosów dziennie. Obliczenia te są bardzo przybliżone, chodzi jedynie o zarysowanie skali problemu.

System inaktywujący reaktywne formy tlenu

System enzymów detoksykujących reaktywne formy tlenu jest więc absolutnie niezbędny do przeżycia wszystkich organizmów żyjących w atmosferze zawierającej 21% tlenu. Jednym z tych enzymów jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), przekształcająca anion ponadtlenkowy (pierwszy wolny rodnik tlenowy powstający w łańcuchu oddechowym) w nadtlenek wodoru. Dotychczas nie stwierdzono nigdzie znaczącego obniżenia się jej aktywności ponieważ taki „defekt” byłby dla każdego organizmu letalny. Wyjątkiem wydają się tutaj pewne bakterie z rodzajów *Leptospira*, *Neisseria* czy *Lactobacillus*, które nie posiadając dysmutazy ponadtlenkowej, muszą gromadzić ogromne (miliomolarne) stężenia jonów manganu celem detoksykacji reaktywnych form tlenu (10).

SOD jest enzymem niezwykle stabilnym. Nie traci aktywności enzymatycznej nawet podczas godzinnej inkubacji w temperaturze 70°C i wytrząsania z rozpuszczalnikami organicznymi. Aktywność jego jest stała w bardzo szerokim zakresie pH (nawet w wyższym niż 10). Jest również oporna na działanie enzymów proteolitycznych (10).

SOD jest także enzymem niezwykle aktywnym. Stwierdzono, że jedna cząsteczka potrafi w ciągu sekundy przekształcić milion anionorodników. Jego centra aktywne zajmują w rzeczywistości jedynie 0,1% jego powierzchni, ale dzięki mechanizmowi określanemu mianem kierowania elektrostatycznego (electrostatic guidance) enzym ten działa w taki sposób, jakby jego centra aktywne zajmowały w rzeczywistości aż do 10% całej powierzchni (17).

Wydaje się, że to właśnie SOD jest kluczowym enzymem detoksykującym reaktywne formy tlenu. Potwierdziły to badania Tolmasoffa (18) wskazujące, że średni okres życia wszystkich przebadanych w nich gatunków małp (naczelnych) był ściśle uzależniony od średniej aktywności ich SOD.

Pozostałymi komponentami systemu detoksykacji reaktywnych form tlenu są katalaza i peroksydaza glutationowa, odpowiedzialne za przekształcenie toksycznego nadtlenu wodoru (wytwarzanego przez SOD) do bezpiecznych chemicznie związków: tlenu i wody. Tylko 50% SOD i 14% katalazy jest niezbędne do przetrwania naszych komórek w atmosferze zawierającej 21% tlenu. Reszta z nich stanowi rezerwę enzymatyczną (10, 17).

Efekt obecności reaktywnych form tlenu a czas trwania życia

Prawie 60 lat temu zauważono, że długość życia zwierząt laboratoryjnych ma ścisły związek z intensywnością metabolizmu tlenowego, np. myszy na niskokalorycznej diecie żyją nawet o 40% dłużej. Jak się okazało, jest to skorelowane ze stopniem wytwarzania reaktywnych form tlenu. Z 300 wskaźników procesu starzenia, takich jak zjawiska behawioralne, ekspresja genów, aktywności enzymatyczne czy zdolności reperacji DNA – nawet 90% wskazuje na znaczące spowolnienie procesów starzenia, towarzyszące obniżaniu stopnia kaloryczności diety (19, 20).

Obniżeniu temperatury u zimnokrwistych oraz zwierząt hibernujących towarzyszy obniżenie ich aktywności fizycznej i zmniejszenie tempa metabolizmu. Maksymalny okres życia much może być 2,5-krotnie zwiększony poprzez obniżenie temperatury otoczenia o 10°C lub uniemożliwienie im latania, wymagającego 50–100-krotnie większego poboru tlenu (21).

Badania Tolmasoffa nad małpami naczelnymi wykazały, iż w trakcie trwającej około 60 mln lat całej ich ewolucji, wybitne obniżenie tempa zapadalności na nowotwory i znaczny wzrost średniej długości życia dla danego gatunku, związane było bezpośrednio z obniżeniem intensywności metabolizmu tlenowego (18).

W 1928 r. Max Rubner zauważył, że wszystkie przebadane dotąd gatunki ssaków, nie należących do naczelnych, zużywają około 200 ± 25 kcal na gram tkanki w ciągu całego swego życia. Rubner wykazał, że chociaż krowa, koń, kot, pies czy świnka morska różnią się prawie 5-krotnie średnią długością życia, to ich potencjał metaboliczny, czyli ilość energii zużywanej na gram tkanki ciała, a liczony w czasie całego życia, był właściwie identyczny. Różne filogenetyczne grupy mają różny potencjał metaboliczny (22). I tak, na przykład muchy mają potencjał wielkości 25 kcal, nie-naczelnne ssaki 200, ludzie 800, a ptaki 1000–1500 kcal.

Jeżeli zmierzy się liczbę uderzeń serca myszy i przemnoży przez długość jej życia, otrzyma się taki sam wynik, jak przy podobnych obliczeniach dla innych ssaków: konia, krowy, psa, kota czy świnki morskiej. Zależność między tempem metabolizmu a maksymalną długością życia jest dla większości ssaków rzeczywistość bardzo wysoka. Koń żyje maksymalnie 35 lat, a jego metabolizm podstawowy wynosi ok. 0,2 litra tlenu na 1 kg masy ciała na godzinę. W ciągu całego swojego życia zużywa więc około 60 tys. l tlenu na kilogram masy ciała. Wiewiórka, żyjąca maksymalnie 7 lat, ma pięć razy szybszy metabolizm podstawowy i zużywa około 1 l tlenu na kilogram masy ciała, czyli w ciągu całego swojego życia zużywa również około 60 tys. l na 1 kg masy ciała (23, 24, 25).

Pewien problem stanowią ptaki i ssaki latające. Żyją one znacznie dłużej niż by to wynikało z ich tempa metabolizmu. Nietoperze mogą nawet dożywać wieku 20 lat, choć ich podstawowe tempo metabolizmu jest takie samo jak u myszy dożywających 2–4 lat. Gołębie z kolei mają metabolizm podstawowy porównywalny z przemianą materii szczura, a mogą żyć nawet 35 lat, czyli niemal 10-krotnie dłużej niż szczur. Najbardziej krańcowym przykładem są kolibry, które zużywają w ciągu życia 500 tysięcy litrów tlenu na kilogram masy ciała. Wyizolowane mitochondria gołębi pobierają trzy razy więcej tlenu niż mitochondria szczura z analogicznej tkanki. Mimo to z mitochondriów gołębia wydostaje się tylko $\frac{1}{3}$ porcji nadtlenu wodoru wymykającego się z mitochondriów szczura. W mitochondriach gołębia proporcja tlenu przekształcanego w wolne rodniki tlenowe jest 10-krotnie mniejsza niż u szczura, co dokładnie odpowiada dziesięciokrotnie dłuższemu życiu gołębi (26).

Najogólniej rzecz ujmując, większe, dłuższe żyjące zwierzęta zużywają mniej kalorii na gram tkanki, w danej jednostce czasowej, aniżeli mniejsze, krócej żyjące. Tak więc, 1 gram przeciętnej tkanki ryjówki „zużywa” dziennie tyle samo kalorii, ile 1 gram porównywalnej tkanki słonia na miesiąc. Pearl podsumował to krótko: „generalnie czas trwania życia zmienia się odwrotnie proporcjonalnie do szybkości wydatkowania energii”. Nazwano to „teorią szybkości życia”. Pomimo znacznych różnic tempa metabolizmu tlenowego, a co za tym idzie różnej długości życia, wykazano, że każdemu gatunkowi „przysługiwało około miliarda uderzeń serca”. We wszystkich omawianych przypadkach tempo wytwarzania reaktywnych form tlenu przez mitochondria było proporcjonalne do tempa metabolizmu i odwrotnie proporcjonalne do średniej długości życia danego gatunku (19, 20).

Efekt obecności reaktywnych form tlenu: uszkodzenia DNA

Wynikiem prawidłowego metabolizmu tlenowego może być oksydacyjne uszkodzenie 10% wszystkich białek komórki. Tempo oksydacyjnych uszkodzeń DNA daje w rezultacie takie, a nie inne różnice w przeciętnej długości życia charakterystycznej dla danego gatunku (19, 21).

Łańcuchy DNA w każdej komórce ciała ludzkiego są uszkodzane codziennie w 10 tys. miejsc i pomimo sprawnego systemu naprawczego, ludzkie DNA w każdej komórce ciała jest na stałe uszkodzone w 100 tys. miejsc. Jądrowe DNA szczura, którego metabolizm tlenowy jest proporcjonalnie szybszy, atakowane jest codziennie prawie w 100 tys. miejsc, co wykazano badając poziom 8-hydroksyguaniny (8-OHGua) w moczu szczurów (27). Pomimo systemów naprawczych, DNA w każdej komórce szczura jest trwale uszkodzone w 1 mln miejsc, a w komórkach starszych zwierząt nawet do 2 mln. Powoduje to, że średni wiek życia (30% zgonów w całej populacji na skutek procesów nowotworowych) wynosi dla szczura mniej więcej 2 lata, natomiast dla człowieka około 80–100 lat (17).

Zdolność mitochondrialnej oksydazy cytochromowej do czteroelektronowej redukcji tlenu do wody maleje mniej więcej od trzeciej dekady życia człowieka. Zwiększa się równocześnie poziom jednoelektronowych redukcji i w konsekwencji wzrost poziomu reaktywnych form tlenu wpływających z mitochondriów. Obserwacja ta jest podstawą ogólnie uznawanej wolnorodnikowej teorii starzenia się Harmana (28). Jedną z konsekwencji zwiększającej się ilości reaktywnych form tlenu w środowisku komórkowym jest powol-

ne obniżanie tempa ich proliferacji. Wraz z każdą replikacją DNA skróceniu ulegają telomery, powtórzenia DNA, o sekwencji TTAGGG, uważane za molekularny zegar biologiczny (wyjątek stanowią komórki macierzyste czy nowotworowe; 29, 30).

W komórkach prawidłowych spowodowane jest to brakiem enzymu – telomerazy, która ma zdolność replikacji sekwencji telomerowych. Wynikiem jest ograniczona ilość podziałów, jakie mogą przejść komórki w ciągu swojego życia. W przypadku diploidalnych, zróżnicowanych fibroblastów wynosi ona, w warunkach *in vitro*, około 50, i jest to tzw. granica Hayflicka (29).

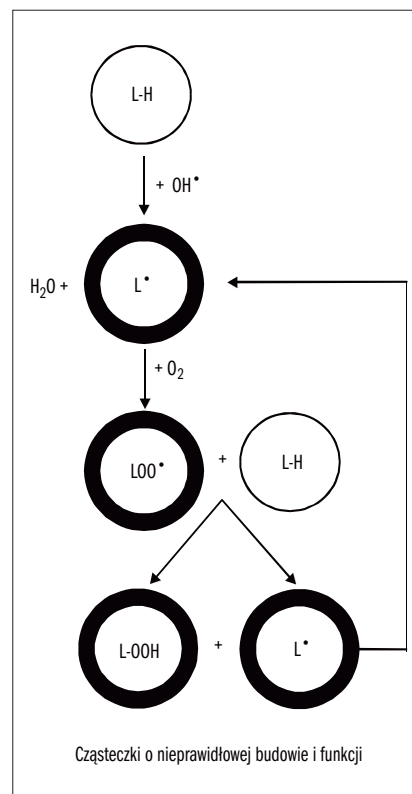
Stres oksydacyjny zwiększa zakres uszkodzeń DNA telomerów, co więcej, na obszarze telomerów naprawa DNA jest znacznie mniej wydajna (31).

Efektom jest obniżenie potencjału proliferacyjnego komórek, a co za tym idzie skrócenie czasu ich życia. Zjawisko to jest korzystne dla organizmu jako całości. Każda komórka poddana działaniu stresu oksydacyjnego, poprzez zwiększoną ilość mutacji, jest bardziej podatna na proces nowotworzenia, niebezpiecznego dla całego organizmu. Skrócenie czasu życia takich pojedynczych komórek (poprzez nasilający się stres oksydacyjny) zwiększa szansę przeżycia organizmu jako całości (32, 33).

Efekt obecności reaktywnych form tlenu: peroksydacja lipidów błon komórkowych

Drugim obiektem ataku reaktywnych form tlenu są lipidy błon komórkowych. Ich peroksydacja jest najbardziej znanym biologicznym procesem wolnorodnikowym. Polega ona na utlenieniu nienasyconych kwasów tłuszczowych, w których powstają nadtlenki lipidów. Inicjacja procesu peroksydacji lipidów (LPO) rozpoczyna się z chwilą ataku reaktywnych form tlenu na kwasy tłuszczowe. W olbrzymim uproszczeniu, proces ten wygląda następująco: tworzący się rodnik lipidowy (L') przyłącza atomy tlenu, tworząc cząsteczkę LOO', która wchodzi w reakcję z inną, normalnie działającą cząsteczką lipidową (LH). W reakcji tej odtwarza się rodnik atakujący (L') i tworzy cząsteczkę nieprawidłową (LOOH). W wyniku serii takich reakcji, w rezultacie ataku jednej nieprawidłowej cząsteczki na cząsteczkę normalnie funkcjonującą, powstają dwie nieprawidłowe (10, 13). Schemat przebiegu reakcji peroksydacji lipidów przedstawia **rycina 2**.

Jest to więc klasyczna reakcja łańcuchowa, która w sposób lawinowy uszkadza błony komórkowe, powodując błyskawiczne uszkodzenia komórek. Jedynie bardzo sprawnie działające, enzymatyczne układy detoksykujące wolne rodniki tleno-



Ryc. 2. Uproszczony schemat peroksydacji lipidów; w czarnej obwódce cząsteczki o nieprawidłowej budowie i funkcji

we ograniczają ten proces do rozmiarów na tyle niewielkich, że umożliwiają przetrwanie organizmów oddychających tlenowo. Podczas podziałów komórkowych uszkodzenia te są niejako „rozcieńczane” między komórki potomne.

Po zahamowaniu proliferacji następuje stopniowa kumulacja oksydacyjnych uszkodzeń. Zakłócony zostaje proces ciągłego degradowania i odtwarzania wewnątrzkomórkowych organelli w nie dzielących się już komórkach.

Głównym miejscem wewnątrzkomórkowej degradacji są lizosomy. Zawierają one niemal 40 różnych hydrolitycznych enzymów, takich jak: proteazy, nukleazy, lipazy, fosfatazy oraz wiele innych, i są w stanie przeprowadzić biodegradację praktycznie każdej molekuly czy organelli występującej w ludzkim organizmie. Lizosomy trawią również i inne lizosomy, pełniąc jakby funkcje wewnątrzkomórkowych fagocytów. Sfagocytowane i rozłożone na czynniki pierwsze biomolekuly czy organelle zostają skierowane do procesów ponownej syntezy (procesy anaboliczne; 34).

Podczas wewnątrzkomórkowej fagocytozy mitochondriów tworzone są duże ilości reaktywnych form tlenu, zaś znajdujący się w nich tlen (w różnych stadiach redukcji), wydostając się na zewnątrz, prowadzi do peroksydacji lipidów błon oraz polimeryzacji lipoprotein. W wyniku polimeryzacji, powstałe kompleksy lipoproteiny stają się materiałem nierozkładalnym en-

zymatycznie, stanowiącym główny składnik lipofuscyny, uznanej z tego powodu za wewnątrzkomórkowy marker starzenia się. Powoduje to powolne blokowanie komórkowych procesów syntezy (anabolizm), a efektem tego blokowania jest stale postępujący zanik możliwości samooczyszczania się komórek (36).

Zahamowanie autofagocytozy samych lisosomów pociąga za sobą zahamowanie fagocytozy mitochondriów, które nie niszczone we właściwym czasie stają się dodatkowym, źródłem reaktywnych form tlenu, powodującym na zasadzie sprzężenia zwrotnego dalsze nasilenie stresu oksydacyjnego i lipofuscynogenezy (34).

Wydaje się, iż występująca relacja pomiędzy aktywnością lisosomów a liczbą degradowanych mitochondriów (mitochondrial-lysosomal axis) istnieje na poziomie organelli, będąc wyznacznikiem stopnia zakłócenia komórkowej homeostazy.

Istnieje ścisła dodatnia korelacja pomiędzy zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, skróceniem się telomerów a prędkością powstawania markera starzenia się – lipofuscyny (36).

Starzenie się przebiega z różną prędkością w różnych narządach i układach. Od stopnia peroksydacji lipidów zależy długość życia, a co za tym idzie i sprawność poszczególnych typów komórek. Stale produkowane w organizmie limfocyty B – krótko żyjące (parę miesięcy) zawierają w swoich błonach stosunkowo niewiele produktów peroksydacji lipidów. Natomiast długo żyjące (kilka lat) limfocyty T są narażone na większe uszkodzenia w co raz to bardziej „speroksydowanym” organizmie. Z tego powodu odporność komórkowa (a nie humoralna) ulega większemu obniżeniu wraz z wiekiem (37).

Natychmiast po śmierci człowieka, dochodzi do zahamowania wytwarzania zmiataczy reaktywnych form tlenu, prowadząc do przerwania ich blokady i nasilenia peroksydacji lipidów. Przez kilka dni po śmierci, ciało „zasysa”, przez skórę, z otoczenia tlen z intensywnością znacznie większą aniżeli podczas normalnego oddychania za życia organizmu. Śmierć, na poziomie molekularnym, wynika z gwałtownie nasilającego się i nieodwracalnego już procesu peroksydacji lipidów (38).

Możliwości modyfikacji metabolizmu tlenowego

Przeprowadzone dotychczas próby przedłużania życia wybranych organizmów koncentrowały się na zwiększeniu aktywności enzymów detoksykujących reaktywne formy tlenu. Osiągnięto przy tym obiecujące rezultaty, poprzez zwiększenie aktywności dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) wydłużono ponad dwukrotnie

wiek muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*; 39).

Najważniejszym enzymem detoksykującym reaktywne formy tlenu jest właśnie SOD, jej całkowity brak powoduje natychmiastową śmierć noworodków mysich, natomiast częściowy – jest wiązany z wystąpieniem progerii. Fenotypowe objawy progerii wykazano u zmutowanych nicieni (*Caenorhabditis elegans*), którym brakowało peroksymalnej katalazy (39, 40).

Produkcja SOD jest indukowana nie tylko poprzez czynniki wewnętrzne, ale i zewnętrzne (światło ultrafioletowe, promieniowanie radiacyjne), które mogą przedostać się przez blokadę antyoksydacyjną. Badania przeprowadzone na 306 pracownikach elektrowni w Czarnobylu wykazały u nich zespół zbliżony do progerii (progeroid syndrome). Tempo starzenia tychże pracowników znacznie się nasiliło: 5-letnie przyspieszenie starzenia biologicznego (cardiopulmonary age) i 11-letnie psychicznego (4).

Mechanizm, przez który napromienianie i zatrucie tlenem wywołują swoje biologiczne efekty jest identyczny. Letalne skutki napromieniania i nadmiaru tlenu są wywoływane przez te same związki pośrednie powstające w tym łańcuchu. Przy zatruciu radioaktywnym powstają z wody, przy zatruciu tlenem – z tlenu. Te same związki powstają również w cyklu reakcji oddychania komórkowego. Oddychanie komórkowe można więc traktować jako bardzo powolny proces zatrucia organizmu tlenem. Wszystkie trzy rodzaje promieniania (alfa, beta, gamma) rozkładają wodę na tlen i wodór, a produktami pośrednimi, powstającymi w wyniku napromieniania wody, są rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru i anion ponadtlenkowy. Już w 1954 r. Gilbert i Gerschman wykazali, że szkody wyrządzane przez promienianie radiacyjne i toksyczność tlenu mają identyczne podłoże (42).

Z nadmiarem SOD wiązany jest, z kolei, zespół Downa. Trisomia chromosomu 21, na którym znajduje się gen kodujący SOD, powoduje jego nadaktywację, co w rezultacie prowadzi do przekształcania każdego anionu ponadtlenkowego w nadtlenek wodoru. Aktywność katalazy czy peroksydazy glutationowej, przekształcających nadtlenek wodoru do tlenu i wody, pozostaje jednak bez zmian. Tak więc, następuje nagromadzenie toksycznego nadtlenku wodoru, bez szansy na późniejszą inaktywację (do wody i tlenu). Podwyższenie aktywności SOD, wytwarzającej nadtlenek wodoru, któremu jednak nie towarzyszy odpowiedni wzrost aktywności enzymów usuwających ten nadtlenek, wywołuje wzmożony stres oksydacyjny (39).

Wszczepienie genu kodującego SOD człowieka do zapłodnionego jaja myszy pozwala na uzyskanie myszy transgenicz-

nych, u której wszystkie komórki zawierają dodatkowy gen i podwyższoną aktywność SOD. Poziom serotoniny w ich krwi jest obniżony, podobnie jak u pacjentów z zespołem Downa, oraz analogicznie są uszkodzone struktury połączeń nerwowomięśniowych (10).

Ze względu na konieczność synchronicznego współdziałania ze sobą tego bardzo skomplikowanego systemu inaktywacji reaktywnych form tlenu, nie wydaje się, aby modulowanie aktywności pojedynczych enzymów detoksykujących reaktywne formy tlenu było, na drodze wydłużania życia, właściwym postępowaniem.

Wydaje się jednak, że można w sposób znaczący wydłużyć życie organizmów oddychających tlenowo poprzez wyraźne ograniczenie emisji reaktywnych form tlenu w wyniku obniżenia aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

Opisany w 1998 r. gen zwany „methusełah” wydłuża życie jego posiadacza o 35%. Niedawno inny zespół badaczy odkrył kolejny „gen długiego życia”, którego mutacja u muszki owocowej, wydłuża życie dwukrotnie. Obie mutacje polegają na spowolnieniu tempa metabolizmu. Komórki takie wymagają więc mniejszej ilości energii. Gen długowieczności otrzymał nazwę „Indy” („I’m not dead yet”). Mutacja tego genu spowalnia transport składników odżywczych z i do komórek organizmu, a zatem ogranicza przemianę materii (43).

Zmutowane nicienie (*Caenorhabditis elegans*), o ograniczonej przemianie materii (bezpłodne i o przytępionych zmysłach – uszkodzone rzęski), żyją nawet sześć- czy ośmiokrotnie dłużej. Przywrócenie tym organizmom zdolności do widzenia czy rozmnażania się, natychmiast (ale i proporcjonalnie) skraca średni okres ich życia (44). Pojedyncza mutacja w genie *daf-2* w komórkach nicieni może wydłużyć czas życia, ponieważ tempo metabolizmu nicieni (a co za tym idzie, poziom wyzwalanej w komórkach energii) znacznie się obniża. Równocześnie, takie dłużej żyjące mutanty są zdecydowanie bardziej odporne na patogeny bakteryjne. Ekspozycja mutantów *daf-2* na Gram-dodatnie bakterie, takie jak *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus aureus*, wykazała 5–6-krotne wydłużenie ich życia, w porównaniu do niezmutowanych nicieni (44, 45).

Można założyć, że gdyby szczerem żyjącym dwa lata spowolnić metabolizm do tempa metabolizmu ludzkiego (80–120 lat), ich życie mogłoby się wydłużyć przynajmniej o rząd wielkości, czyli nawet do 20 lat. Analogicznie spowolnienie tempa metabolizmu u człowieka wydłużyłoby jego życie do 1000 lat. Powszechnie dzisiaj akceptowana teoria starzenia się Harmana wyznacza granicę wieku człowieka na 120 lat (28). Podobną granicę (125 lat) wyzna-

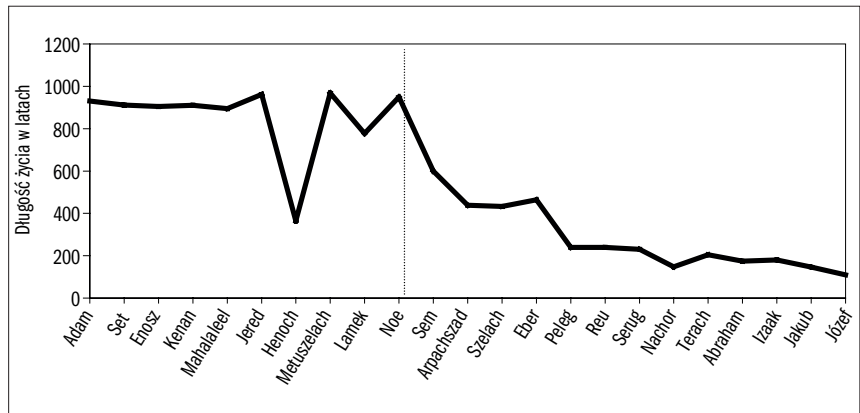
cza Hayflick (29). Pierwszym znanym źródłem podającym tę granicę jest Księga Rodzaju (Rdz. 6.3). Następuje to jednak nie od razu, lecz po 22 pokoleniach ciągłego spadku tak długości życia, jak i wieku płodzenia potomstwa. Obie wartości są wyjątkowo bardzo wysokie. Można założyć, że wydłużenie życia mężczyzn mogłoby istotnie nie wpłynąć na ich płodność, całe życie produkują oni bowiem plemniki. Cytowane źródło nie porusza natomiast problemu kobiet. O fakcie urodzenia syna przez 90-letnią Sarę, wspomina się jak o ewenemencie (Rdz. 17.17). Wiadomo, że kobiety posiadają ukształtowane komórki jajowe już w wieku płodowym, więc nie mogłyby rodzić dzieci w tak ekstremalnie długim życiu. Brak danych o długo żyjących kobietach, rodzących dzieci w późnej starości świadczyć może o wiarygodności przekazu. Krzywa jest ponadto bardzo "nowoczesna", z nieoczekiwanymi spadkami i wzrostami, typowymi dla wszelkich pomiarów, dokonywanych przez naukę właściwie dopiero od epoki Oświecenia. Przed XVIII wiekiem nie wiadomo, że stałemu spadkowi jakiejś wartości towarzyszą chwilowe ich wzrosty, i odwrotnie. Dlatego można sugerować, że dane zawarte w Księdze Rodzaju zbytnie wczesnie uznano jedynie za mityczne zmyślenie. Wykres długości życia patriarchów biblijnych przedstawia **rycina 3**.

Sugestie te prezentowaliśmy, we wstępnej formie, na Forum: Etnomedycyna odpowiedzią na potrzeby XXI wieku (Warszawa 27 XI 2004). Tam powiedziano jednemu z autorów (M.G.), że według informacji, jakie posiadają mongolscy naukowcy, w wysokich górach Tybetu, mni- si, nadzy i na granicy hibernacji, dożywali do kilkuset lat.

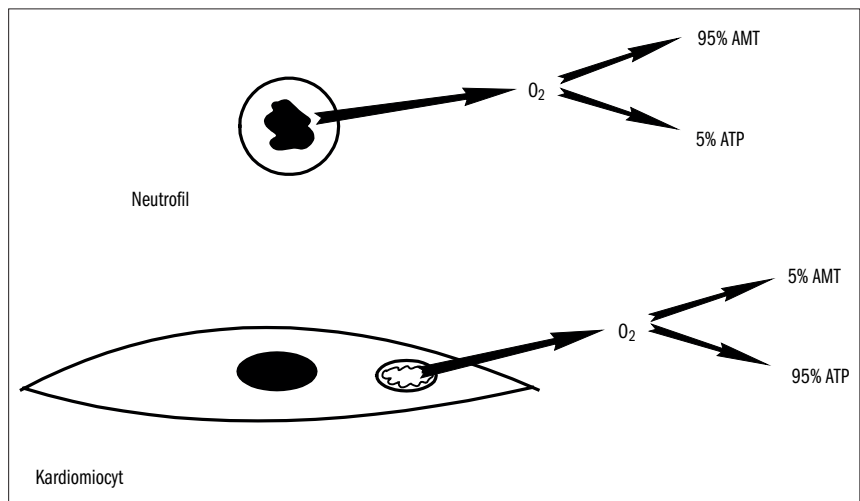
Pierwotny system odpornościowy w warunkach fizjologicznej normy

Głównym elementem obrony organizmu przed obcymi czynnikami lub własnymi toksycznymi metabolitami są leukocyty, wśród nich szczególne znaczenie mają neutrofile (granulocyty obojętnochłonne). Są one komórkami bardzo aktywnymi i nietrwałymi, dziennie następuje 4-krotna ich wymiana, a prawie 60% masy szpiku kostnego (ważącego u dorosłego człowieka 2–3 kg) przeznaczone jest wyłącznie dla granulopoezy (46). Neutrofile są pierwszymi komórkami układu odpornościowego stykającymi się z obcymi patogenami i są również pierwszymi komórkami prezentującymi antygeny (47).

Badania Branda i Hermfisse wykazały, że w spoczynkowych tymocytach (prekursorach limfocytów) 88% syntetyzowanego ATP było pochodzenia mitochondrialnego, podczas gdy w proliferujących tymocytach już tylko 14%. Równocześnie, przejściu tymocytów ze stanu spoczynkowego



Ryc. 3. Dane dotyczące długości życia 22 pokoleń biblijnych patriarchów (wg Ks. Rdz.). Podkreślona linia na środku wykresu wyznacza granicę zdarzenia opisanego jako „potop”



Ryc. 4. Schemat obrazujący lokalizację systemów generujących z tlenu ATP bądź aktywnych metabolitów tlenowych w komórkach fagocytarnych i stacjonarnych (na przykładzie kardiomiocytów)

w cykl komórkowy towarzyszyło niemal całkowite zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu.

W komórkach proliferujących dochodzi do konkurencji pomiędzy zapotrzebowaniem na energię (proces oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach), a zapotrzebowaniem na czynniki redukcyjne potrzebne do procesów biosyntezy nowych komponentów komórkowych (proces glikolizy i cykl Krebsa).

Wykazano, że przejście na metabolizm glikolityczny jest nie tyle sposobem na zwiększenie produkcji komponentów powstających *de novo* komórek, ale przede wszystkim na zminimalizowanie zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu, wytwarzanych przez enzymatyczny łańcuch oddechowy, w celu uniknięcia autodestrukcji (48, 49).

Komórki neutrofilów są nazywane komórkami samobójcami (kamikadze cells), gdyż błyskawicznie się aktywują i mogą pozostać aktywnymi aż do autodestrukcji. Komórki linii limfocytarnej natomiast ograniczają swoją aktywność w sytuacji zbyt nasilonego stresu oksydacyjnego.

Aktywność komórek szybko proliferujących wymaga więc utrzymywania deli-

katnej równowagi między pro- i antyoksydantami. Intensywność odpowiedzi układu odpornościowego (np. uwalnianie ze szpiku komórek fagocytujących) wynika więc będzie z prostej proporcji pomiędzy układem stymulującym (cytokiny, antygeny, produkty rozpadu tkanek) a układem ochraniającym (antyoksydanty; 50).

Mechanizm, za pomocą którego neutrofile sprawują swoje funkcje obronne, jest znany od bardzo dawna. Już od kilkadziesiąt lat jest wiadomo, że fagocytujące komórki emitują światło w zakresie fal podczerwonych. Ich świecenie skorelowano dość szybko z bardzo znacznym poborem tlenu z otoczenia. Nazwano to wybuchem tlenowym (respiratory burst). Sądzono bowiem, że fagocytujące komórki wymagają dostarczenia im bardzo znacznych ilości tlenu do wyprodukowania energii niezbędnej dla fagocytozy. Szybko okazało się, iż te fagocyty są praktycznie jedynymi w organizmie komórkami beztlenowymi, a pobierany przez nie tlen służy nie do oddychania komórkowego, lecz do produkcji reaktywnych form tlenu. Chemiluminescencja (emisja światła w wyniku reakcji chemicznej) jest markerem powstawania reaktywnych form tlenu, którego przejściu

w stan podstawowy towarzyszy wytworzenie kwantu energii (50).

Rejestracja transferu energii, pod postacią fali elektromagnetycznej o długości 1270 nm, jest możliwa do rejestrowania metodami fizycznymi. Chemiczna natura reaktywnych form tlenu, uwalnianych w czasie aktywacji neutrofilów jest identyczna z reaktywnymi formami tlenu wpływającymi z mitochondriów podczas niepełnej redukcji tlenu do wody. O ile reaktywne formy tlenu uwalniane z mitochondriów są wynikiem pewnej „niesprawności” układu enzymatycznego komórki, o tyle fagocytarne reaktywne formy tlenu są produkowane celowo. W komórkach somatycznych około 95% tlenu, ulegając redukcji wytwarza energię, podczas gdy pozostałe kilka procent jest „niechcianym” czynnikiem uszkadzającym (13). W komórkach fagocytujących proporcje te są odwrócone (około 95% tlenu jest celowo przekształcanych w reaktywne formy tlenu, z niewielką, niejako przypadkową produkcją ATP przez pozostałe 5% tlenu – obserwacje własne). Schemat przekształcania tlenu w ATP i reaktywne formy tlenu przedstawia **rycina 4**.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy układ enzymatyczny oksydazy NADPH, produkujący przede wszystkim reaktywne formy tlenu, a zlokalizowany w błonie komórkowej, wydaje się podobny do łańcucha oddechowego, znajdującego się w mitochondriach i służącego przede wszystkim do wytwarzania energii. Można sobie zatem wyobrazić sytuację, w której mitochondria, ze swoim łańcuchem oddechowym dokonują fuzji z błoną komórkową, a następnie ten łańcuch oddechowy ulega serii zasadniczych mutacji, zmieniając całkowicie scenariusz wykorzystania tlenu. Pewnym potwierdzeniem tej hipotezy jest to, że neutrofile prawie całkowicie utraciły swoje mitochondria (pozostało ich bardzo niewiele w cytoplazmie).

W całym Królestwie Zwierząt to właśnie neutrofile są pierwszą i najważniejszą linią obrony. Ich całkowita inaktywacja spowodowałaby śmierć człowieka lub zwierzęcia na skutek nawracających, oportunistycznych zakażeń już w ciągu kilku dni (50).

Piśmiennictwo

- Berner R.A.: Biogeochemical cycles of carbon and sulfur and their effect on atmospheric oxygen over Phanerozoic time. *Palaeogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* 1988, **75**, 97–122.
- Cloud P.: Atmospheric and hydrospheric evolution on the primitive earth. *Science* 1968, **160**, 729–736.
- Oyama V.I., Berdahl B.J.: The Viking gas exchange experiment results from Chryse and Utopia surface samples. *J. Geophysical Res.* 1977, **82**, 4669–4676.
- Mojzsis S.J., Arrhenius G., McKeegan K.D., Harrison T.M., Nutman A.P., Friend C.R.L.: Evidence for life on earth before 3,800 million years ago. *Nature* 1996, **384**, 55–59.
- Hoganson C.W., Pressler M.A., Proshlyakov D.A., Babock G.T.: From water to oxygen and back again; mechanistic similarities in the enzymatic redox conversions between water and dioxygen. *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, **1365**, 170–174.
- Blankenship R.E., Hartman H.: The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends in Biological Sciences* 1998, **23**, 94–97.
- Kurland C.G., Anderson S.G.E.: Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, **64**, 786–820.
- Castresana J., Sarataste M.: Evolution of energetic metabolism: the respiratory-early hypothesis. *Trends in Biological Sciences* 1995, **20**, 443–448.
- Beerling D.J., Berner R.A.: Impact of a Permo-Carboniferous high O₂ event on the terrestrial carbon cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 12428–12432.
- Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Warszawa PWN, 1995.
- Doolittle W.F.: Phylogenetic classification and the universal stress. *Science*, 1999, **284**, 2124–2129.
- Kostowski W.: *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. Wyd. II. PZWL Warszawa, 2001.
- Reimer K.A., Jennings R.B.: Myocardial ischemia, hypoxia and infarction. W: Fozzard H.E. (edit.): *The Heart and Cardiovascular System*. Raven Press, New York, 1986, s. 1133–1201.
- Floyd R.A.: Protective action of nitron-based free radical traps in neurodegenerative diseases. W: Fiskum G. (edit.): *Neurodegenerative Diseases*, Plenum Press, New York 1996.
- Chance B., Sies H., Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979, **59**, 527–605.
- Sayre L.M., Perry G., Atwood C.S., Smith M.A.: The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol.* 2000, **46**, 731–741.
- Klotz L.O., Kroncke K.D., Buchczyk D.P., Sies H.: Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defence against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 2003, **133**, 1448S–1451S.
- Tolmasoff J.M., Ono T., Cutler R.G.: Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rates in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980; **77**, 2777–2781.
- Sohal R.S.: Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, **14**, 583–588.
- Jazwinski S.M.: Longevity, genes, and ageing. *Science* 1996, **273**, 54–59.
- Sohal R.S., Toy P.L., Allen R.G.: Relationship between life expectancy, endogenous antioxidants and products of oxygen free radical reactions in the housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.* 1986, **36**, 71–77.
- Sohal R.S., Weindruch R.: Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996, **273**, 59–63.
- Sohal R.S.: The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Ageing (Milano)* 1993, **5**, 3–17.
- Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., Lal H.: Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defences during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 1994, **74**, 121–133.
- Sohal R.S., Agarwal S., Candas M., Forster M.J., Lal H.: Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissue of C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* 1994, **76**, 215–224.
- Barja G.: Mitochondrial free radicals production and aging in mammals and birds. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998, **854**, 224–238.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 7915–7922.
- Harman D.: The biological clock: the mitochondria? *J. Amer. Geriatric Soc.*, 1972, **20**, 145–147.
- Hayflick L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.*, 1965, **37**, 614–636.
- Aragona M., Maisano R., Panetta S., Guidice A., Morelli M., La Torre I., La Torre F.: Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 2000, **17**, 981–989.
- Zglinicki von T.: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 2002, **27**, 339–344.
- Weinstein B.S., Ciszek D.: The reserve-capacity hypothesis: evolutionary origins and modern implications of the trade-off between tumor-suppression and tumor-repair. *Exp. Gerontol.*, 2002, **37**, 615–627.
- Sozou P.D., Kirkwood T.B.: A stochastic model of cell replicative senescence based on telomere shortening, oxidative stress, and somatic mutations in nuclear and mitochondrial DNA. *J. Theor. Biol.* 2001, **213**, 573–586.
- Brunk U.T., Jones C.B., Sohal R.S.: A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 1992, **275**, 395–403.
- Ueno T., Kominami E.: Mechanism and regulation of lysosomal sequestration and proteolysis. *Biomed. Biochim. Acta* 1991, **50**, 365–371.
- Sohal R.S., Marzabadi M.R., Galaris D., Brunk U.T.: Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in cultured rat heart myocytes; a novel *in vitro* model of lipofuscinogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 1989, **6**, 23–30.
- Hendricks L.C., Heidrick M.L.: Susceptibility to lipid peroxidation and accumulation of fluorescent products with age is greater in T-cell than B-cell. *Free Radic. Biol. Med.*, 1988, **5**, 145–154.
- Dormandy T.L.: Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1978, **1**, 647–650.
- Macmillan-Crow L.A., Cruthirds D.L.: Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* 2001, **34**, 325–336.
- Petriv O.I., Rachubinski R.A.: Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 19996–20001.
- Polyukhov A.M., Kobsar I.V., Grebelnik V.I., Voitenko V.P.: The accelerated occurrence of age-related changes of organism in Chernobyl workers: a radiation-induced progeroid syndrome? *Exp. Gerontol.* 2000, **35**, 105–115.
- Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwuer P., Fenn W.O.: Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism is common. *Science* 1954, **119**, 623–626.
- Strauss E.: Of hyperaging and metuselah genes. *Sci. Ageing Knowledge Environm.* 2001, **3**, 2001.
- Friedman D.B., Johnson T.E.: A mutation in the age-1 in *Caenorhabditis elegans* life and reduces hermaphroditic fertility. *Genetics* 1988, **118**, 75–86.
- Garsin D.A., Villanueva J.M., Begun J., Kim D.H., Sifri C.D., Calderwood S.B., Ruvkun G., Ausubel F.M.: Long-lived C. elegans daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 2003, **300**, 1921.
- Masliński S.: Molekularne podstawy odczynu zapalnego. W: Masliński S., Ryzewski J. (red.): *Patofizjologia*. PZWL, Warszawa 1992, s. 211–220.
- Ashtekar A.R., Saha B.: Poly's plea; membership to the club of APCs. *Trends in Immunol.* 2003, **24**, 9.
- Brand K.A.: Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the response of energy yield. *Bioenerg. Biomembr.* 1997, **29**, 355–364.
- Brand K.A., Hermfisse U.: Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen intermediates. *FASEB J.* 1997, **11**, 388–395.
- Droge W., Mihm S., Bockstette M., Roth S.: Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T-lymphocytes. *Methods Enzymol.* 1994, **234**, 135–151.