

1996, 45 (1): 69-96

PL ISSN 0023-4249

Polskie
Towarzystwo
Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

ROLAND ŻADZIŃSKI

Uniwersytet Łódzki

Katedra Biofizyki Molekularnej

Banacha 12/16, 90-237 Łódź

PROGRAM CZY NIEDOSKONAŁOŚĆ — NIEROZWIKŁANA ZAGADKA GERONTOLOGII

WSTĘP

Problem starzenia się i śmierci intrygował ludzkość zawsze. Strach przed ostatecznym końcem ziemskiej egzystencji i marzenie o wiecznej młodości były jednym z ważniejszych czynników rozwoju kultury, natchnieniem dla sztuki; były jednocześnie tym, co leżało u podstaw działalności magów, alchemików czy też zwykłych oszustów. Z tego ostatniego powodu oficjalna nauka długo bała się wkraczać na ten, jakże frapujący teren. Dopiero w XX wieku pojawili się badacze, którzy procesy starzenia się traktowali jako podstawowy przedmiot swojej działalności. Od samego początku zaznaczył się wyraźny podział na tych, którzy widzieli w starzeniu się proces, jeśli nawet nie celowy to w każdym bądź razie zaprogramowany i powstały w drodze ewolucji oraz na tych, którzy uważali, że organizmy starzeją się i umierają, gdyż najprościej to ujmując, ulegają zużyciu. W tym drugim przypadku śmierć jest oczywiście czymś niezamierzonym. Organizm broni się przed nią, tyle tylko, że jego mechanizmy obronne są zbyt słabe i niedoskonałe. Podział ten istnieje w dalszym ciągu, a zwolennicy jednego i drugiego poglądu niejednokrotnie zdają się wzajemnie nie dostrzegać. Nie można się też temu specjalnie dziwić, jako że obydwie strony posiadają ważne argumenty pozwalające dowodzić zarówno jednej, jak i drugiej tezy.

TEORIE STOCHASTYCZNE

Teorie, zgodnie z którymi starzenie się jest procesem niecelowym, stochastycznym i wynikającym z niedoskonałości organizmów żywych, zdają się być obecnie dominującymi. Nie cofając się zbyt daleko w przeszłość, ich początku należy upatrywać w teorii zwanej wear and tear. Jak sama nazwa na to wskazuje, teoria ta przyrównywała organizm do odzieży, której używanie nieuchronnie prowadzi do zniszczenia. Zakładała, że przyczyną starzenia miałyby być ciągła akumulacja przypadkowych uszkodzeń biopolimerów. Założenie takie można odnaleźć właściwie w każdej stochastycznej teorii.

WOLNORODNIKOWA TEORIA STARZENIA

Parędziesiąt lat od powstania wear and tear Denham Harman w oparciu o takie właśnie założenia stworzył swoją własną, już znacznie bardziej ukonkretnioną teorię (HARMAN 1956). Uznał, że głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenia, których akumulacja prowadzi do śmierci, są wolne rodniki, w szczególności aktywne formy tlenu. Częsteczki te, w których występuje jeden niesparowany elektron, a co za tym idzie, charakteryzujące się wysoką reaktywnością, pojawiają się w komórkach żywych głównie jako uboczny produkt oddychania tlenowego, aczkolwiek nie tylko. Istniały trzy główne przesłanki, którymi kierował się Harman, obarczając wolne rodniki tak negatywną funkcją.

Po pierwsze, ich występowanie w komórce jest zjawiskiem naturalnym i pospolitym. Poza wspomnianą wyżej nieszczelnością układu oddychania komórkowego mogą być generowane celowo przez komórki układu immunologicznego (BELLAVITE 1988), powstają w reakcjach cytochromu P-450, jak również w innych przemianach metabolicznych. Drugą przesłanką była zdolność wolnych rodników do reagowania z wszystkimi podstawowymi biopolimerami: lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi (SAGAI i ICHINOSE 1980, AMES 1989, GAFNII 1990). W wyniku tych reakcji wymienione cząsteczki mogą ulegać utlenianiu, zmianom konformacyjnym, agregacji, mogą się rozpadać na mniejsze struktury, a także ulegać innym nieodwracalnym zmianom, które ostatecznie prowadzą do ich bezużyteczności, czy nawet szkodliwości dla metabolizmu komórkowego. Istotne jest również to, że reakcje wolnorodnikowe mają charakter łańcuchowy. Uszkodzone cząsteczki mogą być źródłem kolejnych uszkodzeń. Ostatnią przesłanką było podobieństwo objawów choroby popromiennej do zmian, jakie powstają w procesie starzenia się (UPTON 1957) oraz to, że promieniowanie jonizujące może powodować obniżenie średniej długości życia (LINDROP i ROTHBLAT 1961). Jak wiadomo, promieniowanie jonizujące poza bezpośrednim uszkodzaniem biopolimerów, powoduje również radiolizę wody, a przez to prowadzi do powstania wyższego niż fizjologiczne stężenia wolnych rodników. Można zatem domniemywać, że jeśli napromieniowywanie przyspiesza proces starzenia się, udział wolnych rodników w tym procesie jest niewykluczony.

Wkrótce po ogłoszeniu teorii Harmana pojawił się szereg dalszych popierających ją argumentów. Jednym z istotniejszych jest istnienie mechanizmów chroniących organizm przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi. Co więcej, prace prowadzone przez Cutlera wykazały istnienie pozytywnej korelacji między maksymalną długością życia różnych gatunków ssaków, a stężeniem większości z podstawowych antyoksydantów w ich tkankach (CUTLER 1991). Szczególnie było to widoczne w przypadku kwasu moczowego, witaminy C i E oraz dysmutazy ponadtlenkowej. Również badania nad wpływem odżywiania się na długość życia zdają się potwierdzać teorię wolnorodnikową. Doświadczenia, w których badanym zwierzętom podawano pokarm wzbogacony w antyoksydanty, prowadziły do wzrostu średniej długości życia (EMANUEL 1976, MIGUEL I ECONOMOS 1979). Podobne wyniki uzyskano stosując diety eliminujące te aminokwasy i tłuszczone, które w większym stopniu niż inne ulegają łańcuchowym reakcjom wolno-

rodnikowym (HARMAN 1978). Kolejnych argumentów zwolennikom teorii wolnorodnikowej dostarczyły eksperymenty, polegające na głodzeniu badanych zwierząt. Eksperymenty te przeprowadzano głównie na gryzoniach. Rezultatem był wyraźny wzrost długowieczności (MASORO 1992, YU 1987), który wiązano z ogólnym spadkiem tempa przemian metabolicznych, a przez to z obniżoną produkcją wolnych rodników. Istotne argumenty pochodzą także z szeregu doświadczeń nad wpływem stężenia tlenu w powietrzu, jakim oddychały badane zwierzęta na ich długowieczność. Zgodnie z przewidywaniami, stwierdzono ujemną korelację między tymi wielkościami (BARET i współaut. 1994, KLOEK i współaut. 1976, MIGUEL i współaut. 1975), przy czym zjawisko to było szczególnie wyraźne przy stężeniach tlenu wyższych od normalnego. Jeszcze inne popierające teorię wolnorodnikową wyniki pochodzą z doświadczeń nad mutantami nicieni, charakteryzujących się obniżoną odpornością na czynniki oksydacyjne. Zaobserwowano u nich wyraźne skrócenie długości życia (HOSOKAWA i współaut. 1994).

Poza sporym zbiorem faktów przemawiających za słusznością teorii wolnorodnikowej, bardzo ważną zaletą koncepcji Harmana jest jej uniwersalność. Daje się ona zastosować do niemal wszystkich organizmów zwierzęcych, a postulowany mechanizm procesu starzenia się jest oparty na kilku podstawowych reakcjach. Jest to wreszcie teoria o największym jak do tej pory znaczeniu praktycznym. Stanowi inspirację dla wielu badaczy, a wyniki badań nad nią znajdują już zastosowanie kliniczne. Bez względu bowiem na to, czy wolne rodniki są podstawową przyczyną starzenia czy nie, ich ogromne znaczenie dla organizmu jest niewątpliwe. Może o tym świadczyć chociażby fakt wolnorodnikowego podłoża wielu charakterystycznych dla późnego wieku chorób, w tym między innymi miażdżycy, cukrzycy typu II, czy też raka (PRYOR 1987). Istnieje jednak szereg faktów, które nakazują z ostrożnością podchodzić do teorii Harmana. Wspomniane podobieństwo skutków napromieniowania i starzenia się nie jest idealne. Szczególnie warto zwrócić uwagę na wyższe prawdopodobieństwo pojawiania się chorób nowotworowych w populacjach napromieniowanych, w stosunku do populacji starzejących się (LUNDBLAD i SZOSTAK 1989). Opierając się na krzywych wymieralności, można wysunąć przypuszczenie, że to właśnie one były przyczyną obniżenia się średniej długości życia napromieniowanych populacji (LINDROP i ROTHBLAT 1961). Co więcej, w wielu eksperymentach, w których stosowano bardzo słabe dawki, nie stwierdzono, aby napromieniowywanie skracało długość życia, a niekiedy wręcz przeciwnie, napromieniowane populacje żyły dłużej (KANUNGO 1980). Także badania z użyciem antyoksydantów można interpretować na niekorzyść teorii Harmana. Ich podawanie rzeczywiście powoduje wzrost średniej długości życia, ma jednak znikomy wpływ na długość maksymalną (MCCARTER i współaut. 1985). Wygląda to tak, jakby maksymalny wiek, który organizm jest w stanie osiągnąć, był dość ściśle ustalony, natomiast to, jak wielu osobnikom danej populacji będzie dane dożyć do tego wieku, zależałoby od czynników losowych, w tym również od wolnych rodników. Czym byłoby ich więcej, tym więcej rozwinęłyby się patologie i tym więcej osobników umarłoby przedwcześnie. Wydłużenia długości życia nie obserwowano również u transgenicznych muszek owocowych i myszy, które charakteryzowały się podwyższonym poziomem niektórych antyoksydantów endogennych, w tym między innymi dysmutazą ponadtlenkową i katalazą (CRISTOFALO i współaut.

1994). Zwolennicy teorii wolnorodnikowej bronią się wysuwając hipotezę istnienia wewnętrznego regulatora obrony antyoksydacyjnej. W razie zwiększonej produkcji wolnych rodników, mechanizmy obronne miałyby być pobudzane, zaś w przypadku obniżonego poziomu tych reaktywnych cząstek, stężenie antyoksydantów ulegałoby obniżeniu (CUTLER 1991). Istotna byłaby w tym mechanizmie możliwość kompensowania działania jednych elementów układu antyoksydacyjnego przez inne. Podawanie antyoksydantów egzogennych, jak również zwiększony poziom niektórych endogennych miałoby zatem niewielkie znaczenie — mechanizmy obronne komórki pracowałyby na obniżonych obrotach, a poziom wolnych rodników nie ulegałby zmianie. W rozumowaniu tym istnieje jednak pewien brak konsekwencji. Nie możemy bowiem zapominać o tym, że egzogenne antyoksydanty nie są obojętne dla organizmu. Ich podawanie rzeczywiście wydłuża średnią długość życia oraz zmniejsza prawdopodobieństwo powstania wielu chorób, między innymi raka, a zatem w wyraźny sposób wpływa na polepszenie skuteczności obrony przed wolnymi rodnikami. Również pomiary te charakterystycznych dla gatunku stężeń antyoksydantów sprawiły pewną niespodziankę. Analogiczna do Cutlerowskiej analiza zależności między stężeniami a długowiecznością, przeprowadzona dla kręgowców należących do różnych gromad, nie pozwala już na wyciągnięcie wniosków, które tak silnie przemawiałyby za wolnorodnikową teorią starzenia (PEREZ-CAMPO i współaut. 1994). Także efekt głodzenia nie daje się wytłumaczyć w tak jednoznaczny sposób. Na skutek podawania zmniejszonych ilości pokarmu, rzeczywiście dochodzi do spadku całkowitego metabolizmu. Towarzyszy mu jednakże wyraźny spadek masy ciała, w wyniku czego ilość zużywanej energii w przeliczeniu na masę pozostaje nie zmieniona (MCCARTER i współaut. 1985). Co za tym idzie, również liczba generowanych, wolnych rodników na jednostkę masy pozostaje stała. Pozytywne działanie głodówek może mieć zatem inne źródło.

GLIKACYJNA TEORIA STARZENIA

Możliwe wyjaśnienie wpływu głodzenia na długość życia oferuje nam przedstawiona w 1985 roku przez ANTHONEGO CERAMIEGO inna akumulacyjna teoria starzenia. Zakłada ona, że u molekularnych podstaw degeneracyjnych zmian zachodzących w organizmach żywych leży szereg nieenzymatycznych reakcji, zwanych ogólnie reakcjami Maillarda. Reakcje te układają się w dość złożony proces, w którym można wyróżnić inicjację, propagację i terminację (KRISTAL i YU 1992). Pierwszą fazę rozpoczyna reakcja kondensacji redukującego cukru, a jest nim zazwyczaj glukoza, z grupą aminową. W wyniku tej pierwszej reakcji, zwanej reakcją glikacji, powstaje nietrwała zasada Schiffa. Przechodzi ona następnie w bardziej stabilny izomer, tak zwany produkt Amadoriego, który jest źródłem różnorodnych ketoaldehidów. Te ostatnie cząsteczki wykazują często dosyć wysoką reaktywność, co prowadzi do powstania bardziej złożonych związków, u takich jak na przykład imidazole, pirymidyny, pirole, furany. Są one już znacznie mniej reaktywne i nazywamy je końcowymi, zaawansowanymi produktami glikozylacji. Tempo z jakim opisywany proces może zachodzić w organizmie jest w oczywisty sposób związane ze stężeniem glukozy. Ma to swoje odbicie w przypadku cukrzycy. Mogłoby to również, jak już to zostało wcześniej wspo-

mniane, tłumaczyć efekt głodzenia (SPENCER 1993). Stwierdzono bowiem, że u zwierząt, którym zmniejszano ilość pożywienia, wyraźnie spadało stężenie glukozy we krwi (MASORO 1992). Reakcje glikacji mogą zachodzić z grupami aminowymi białek i kwasów nukleinowych. W warunkach *in vivo* została opisana głównie pierwsza z tych możliwości (BAYNES i współaut. 1989). Choć omawiane procesy mogą dotyczyć wielu białek, to jednak ze względu na krótki czas życia większości z nich mają one istotne znaczenie jedynie dla niektórych. Należałoby wśród nich wymienić kolagen, krystalinę, elastynę i hemoglobinę. Powstałe zmiany polegają głównie na tworzeniu się wiązań sieciujących, które w znaczący sposób wpływają na funkcjonalność białek. Znacznie bardziej problematyczna wydaje się możliwość reagowania cukrów z kwasami nukleinowymi. Jak do tej pory mutagenny wpływ podwyższonego stężenia glukozy opisano jedynie w przypadku bakterii (LEE i CERAMI 1992), a więc organizmów prokariotycznych, u których materiał genetyczny nie jest odseparowany od cytoplazmy. Jeśli działanie glikacyjne glukozy dotyczyłoby jedynie pewnych, nielicznych zresztą białek, teorię Ceramiego należałoby raczej uważać jako uzupełniającą, zaś samą reakcję Maillarda jako dodatkowy czynnik wpływający na procesy starzenia się i związane z nimi patologie. Podobnie jak w przypadku choroby popromiennej, także podobieństwo cukrzycy do procesu starzenia się jest ograniczone. Istnieją również doniesienia, zgodnie z którymi stopień glikacji białek jest względnie stały w ciągu całego życia (GARLICK i współaut. 1988, SWAMY i ABRAHAM 1987). Zwraca się przy tym uwagę na odwracalny charakter inicjacji glikacji sugerując, że ilość powiązanych z nią zmian jest pochodną istnienia pewnej dynamicznej równowagi uzależnionej między innymi od stężenia glukozy, tolerancji na nią, zmian w składzie białek oraz tempa metabolizmu (BAYNES i współaut. 1989). Przyrost zmian glikacyjnych w tym ujęciu nie byłby wynikiem akumulacji, lecz raczej skutkiem zmian środowiska wewnętrznego. Świadczyłyby o tym również badania przeprowadzone na osobach chorych na cukrzycę. Ilość zmian glikacyjnych stwierdzona w ich komórkach może być nawet trzykrotnie wyższa niż u ludzi starych (VLASSARA i współaut. 1994). Zgodnie z teorią Ceramiego można byłoby sobie wyobrazić, że ich organizmy powinny wykazywać oznaki bardzo przyspieszonego starzenia. W rzeczywistości tak nie jest. Ograniczenia, jakim podlega powyższa teoria, są powodem łączenia jej w większą całość z teorią wolnorodnikową. Teorie te mogą się wzajemnie uzupełniać, a co więcej stwierdzono synergizm procesów wolnorodnikowych i procesów opartych na nieenzymatycznych reakcjach z cukrami (KRISTAL i YU 1992, ODETTI i współaut. 1994).

Obydwie powyżej omówione teorie starają się znaleźć przyczyny procesów starzenia się na poziomie molekularnym, wskazując na czynniki, będące źródłem akumulowanych uszkodzeń. Stanowią one dopełnienie teorii, w których większy nacisk kładzie się już na same zmiany prowadzące do obniżenia żywotności organizmu, a nie na to czym te zmiany są wywołane. Spośród tych teorii wyższego rzędu warto wymienić trzy najważniejsze: teorię wiązań sieciujących, teorię mutacji somatycznych oraz lipofuscynową teorię starzenia się. Wszystkie z nich są typowymi teoriami akumulacyjnymi.

TEORIA MUTACJI SOMATYCZNYCH

Zgodnie z zaproponowaną w 1959 roku przez Szilarda teorią mutacji somatycznych (SZILARD 1959), charakterystyczna dla procesu starzenia degeneracja organizmu jest wynikiem gromadzenia się z wiekiem coraz większej liczby uszkodzeń kwasów dezoksyrybonukleinowych. Uszkodzenia te miałyby prowadzić do powstania recesywnych mutacji, które po pewnym czasie ujawniałyby się w fenotypie. Głównego źródła tych uszkodzeń można byłoby upatrywać w reakcjach wolnorodnikowych, aczkolwiek należałoby brać pod uwagę również inne fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne a także błędy, jakie mogą się pojawić w czasie powielania materiału genetycznego. Wyjaśnienie proponowane przez teorię mutacji somatycznych zdaje się być bardzo naturalne, wręcz narzucające się. Materiał genetyczny jest bowiem pierwotnym źródłem informacji w komórce. Wobec braku bezpośrednich dowodów prawdziwości omawianej teorii, korzysta się z danych wskazujących na jej słuszność pośrednio. Zwraca się uwagę przede wszystkim na istnienie mechanizmów naprawy DNA oraz na korelację między ich efektywnością, a długością życia organizmów, które zostały w nie wyposażone (HART i SETLOW 1974). Stwierdzono również niewydolność tych mechanizmów u pacjentów cierpiących na choroby przedwczesnego starzenia się, takich jak progeria, zespół Wernera, zespół Cockayne'a czy też zespół Downa (WEIRICH-SCHWEIGER i współaut. 1994).

Krytyka teorii mutacji somatycznych w dużej mierze pokrywa się z krytyką teorii wolnorodnikowej. Istnieją jednakże oryginalne argumenty przeciwników tej teorii. Część z nich pochodzi z doświadczeń nad zwierzętami mogącymi występować w formach haplo-, diplo- bądź tetraploidalnych. Stwierdzono, że maksymalna długość życia tych organizmów nie zależy od ploidalności (KANUNGO 1980, LAMB 1965), co jest sprzeczne z zakładaną recesywnością szkodliwych mutacji somatycznych. Implikuje ona bowiem stan, w którym formy o niższej ploidalności powinny żyć krócej, jako że właśnie u nich szansa ekspresji mutacji jest wyższa. Także wyniki wielu badań z napromieniowywaniem nie pasują do omawianej teorii. Wynika z niej bowiem, że promieniowanie jonizujące jako źródło mutacji genetycznych powinno być mniej szkodliwe dla organizmów długowiecznych. Wyniki uzyskane dla człowieka, myszy i muszki owocowej całkowicie tym przewidywaniom zaprzeczają — jest wręcz przeciwnie (KANUNGO 1980, LINDROP i ROTHBLAT 1961). Argumentacja powyższa jest zresztą wątpliwa, jako że porównanie zostało przeprowadzone na organizmach różniących się dość znacznie. Co więcej, można wskazać również takie gatunki, u których relatywnie długiemu czasowi życia odpowiada duża odporność na promieniowanie jonizujące. Dobrym przykładem mogą być nietoperze. Oprócz doświadczeń z napromieniowywaniem całych zwierząt badano również odporność na promieniowanie jonizujące poszczególnych tkanek. Rezultaty tych eksperymentów również były kłopotliwe dla zwolenników teorii mutacji somatycznych. W szczególności wyniki uzyskane dla linii komórek rozrodczych mogą być źródłem wątpliwości. Okazało się, że wchodzące w skład tej tkanki komórki, pomimo tego że odpowiadają za nieśmiertelność gatunku, są znacznie bardziej wrażliwe na działanie promie-

niowania od innych (KANUNGO 1980). Jak zatem wyjaśnić sytuację, w której to właśnie one nie miałyby być podatne na proces starzenia?

TEORIA WIAZAŃ SIECIUJĄCYCH

Propagowana przez Bjorkstena (BJORKSTEN 1974) teoria wiązań sieciujących utrzymuje, że zmiany starcze pojawiają się w wyniku powstawania wiązań kowalencyjnych bądź wodorowych między dwiema lub większą liczbą makrocząsteczek. Agregacja taka prowadzi do utraty funkcji przez te cząsteczki, przy jednoczesnej odporności powstałych kompleksów na procesy kataboliczne. W rezultacie pojawiają się mutacje cząsteczek przenoszących informacje, takich jak DNA i RNA, spada liczba aktywnych cząstek nie podlegających wymianie, następuje spowolnienie ruchów cytoplazmy, zmniejsza się przestrzeń dla procesów życiowych, ma miejsce hamowanie czynności komórek wydzielniczych, co jest szczególnie istotne w przypadku układu hormonalnego oraz wzrasta lepkość matriksu zewnątrzkomórkowej. Poza reakcjami Maillarda i procesami wolnorodnikowymi źródłem wiązań sieciujących są również przeciwciała, jony metali wielowartościowych, kwas cytrynowy, czynniki alkilujące i acylujące oraz chinony.

TEORIA LIPOFUSCYNOWA

Trzecią z wymienionych teorii oparto na stwierdzeniu w komórkach nie dzielących się akumulacji pewnego charakterystycznego rodzaju pigmentu zwanego lipofuscyną. Przypuszcza się, że jest ona produktem reakcji aldehydu malonowego z aminokwasami. Powstawanie lipofuscyny byłoby zatem ściśle związane z procesami wolnorodnikowymi, a w szczególności z peroksydacją lipidów. Stwierdzono ponadto, że zawiera ona również kwasy nienasycone, szereg enzymów i chromatoforów, a także inne białka i lipidy (HAYFLICK 1985). Podstawowym argumentem przemawiającym za tą teorią jest to, że udział lipofuscyny w komórce rośnie z wiekiem w sposób liniowy (np. w sercu około 0,3% w ciągu 10 lat), co prowadzi do bardzo wysokiego stężenia w wieku starczym. W komórkach nerwowych u 100-latków procentowy udział w cytoplazmie (w jądrze lipofuscyna nie gromadzi się) może wynieść nawet 75% (STREHLER 1977). Tak wysokie stężenie pigmentu starczego może stanowić istotną przeszkodę w funkcjonowaniu komórki. Jak do tej pory nie stwierdzono jednak w sposób bezpośredni ujemnego wpływu lipofuscyny na komórkę . Na tym głównie opiera się krytyka omawianej teorii. Wielu autorów traktuje gromadzenie się lipofuscyny jako zjawiska towarzyszącego starzeniu się, zachodzącego niejako równolegle i w dużej mierze niezależnie. Stwierdzono, że niedobór witaminy E zwiększa tempo gromadzenia się lipofuscyny, nie wpływając jednocześnie na szybkość starzenia się. Zwraca się również uwagę na to, że pigment starczy pojawia się tylko w niektórych typach komórek, podczas gdy starzenie się można zaobserwować również w innych (KIRKLAND 1992).

TEORIA MITOCHONDRIALNA

Niezwykle atrakcyjną i obecnie bardzo popularną stochastyczną teorią starzenia się, która operuje już na znacznie wyższym bo organellarnym poziomie organizacji życia, jest teoria mitochondrialna. Chociaż badania nad udziałem mitochondriów w procesach starzenia mają raczej krótką historię, pomysł

powiązania tych struktur z postępującą z wiekiem degradacją organizmu nie jest najmłodszy. Wątek ten bowiem możemy odnaleźć już u Harmana (HARMAN 1972). Nie może to specjalnie dziwić, gdyż dla twórcy teorii wolnorodnikowej, mitochondria stanowią wręcz wymarzony obiekt. Przede wszystkim są to organelle odpowiedzialne za oddychanie tlenowe, stanowią zatem newralgiczny punkt procesów energetycznych komórki. Z drugiej strony, ponieważ to w nich dochodzi do redukcji cząsteczki tlenu, właśnie one stanowią główne miejsce generowania wolnych rodników. Co więcej, mitochondria posiadają własne DNA, w którym znajduje się informacja potrzebna między innymi do biosyntezy podjednostek wchodzących w skład kompleksów I, III, IV i V łańcucha oddechowego. Mitochondrialny DNA koduje również tRNA oraz rRNA. Ten organellarny genom znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie źródła wolnych rodników. Na domiar złego, mitochondrialne DNA, w odróżnieniu od DNA jądrowego, nie tworzy kompleksów z histonami, co sprawia, że stanowi znacznie dostępniejszą strukturę. Jakby tego było mało, mitochondria posiadają znacznie uboższy i mniej sprawny aparat naprawy DNA (LE DOUX i współaut. 1992).

W swojej współczesnej wersji mitochondrialna teoria starzenia się została stworzona przez J. Miquela (MIQUEL i współaut. 1980). W odróżnieniu od Harmana, Miquel zwraca uwagę na to, że do postępującej degradacji mitochondriów, w szczególności ich materiału genetycznego, dochodzi wyłącznie w komórkach zróżnicowanych (MIQUEL 1992). Za główne negatywne następstwa mutacji mitochondrialnego DNA uważa się oczywiście utratę zdolności do oksydacyjnej fosforylacji oraz spadek ogólnej liczby mitochondriów. Proponuje się również inne mechanizmy, które mogłyby uczestniczyć w procesach starzenia. Jednym z nich miałyby być mutacje, które nie obniżając zdolności mitochondriów do produkcji ATP mogłyby jednocześnie powodować zachwianie homeostazy całej komórki (SHAY i WERBIN 1987). Inna ciekawa propozycja zwraca uwagę na możliwość insercji mitochondrialnego DNA do DNA jądrowego, co byłoby oczywiście czynnikiem mutagennym. Istnienie takich insercji zostało już potwierdzone eksperymentalnie (SHAY i WERBIN 1992). Spory materiał dowodowy jest drugim obok niezwykle atrakcyjnych przesłanek atutem teorii mitochondrialnej. Zgodnie z przewidywaniami, tempo powstawania uszkodzeń mitochondrialnego DNA jest rzeczywiście wysokie, będąc aż od 10 do 16 razy wyższe niż w jądrze (RICHTER 1988). O łatwości z jaką może dochodzić do mutacji w mitochondriach może świadczyć również znacznie szybszy w porównaniu do jądra proces ewolucji genomu mitochondrialnego (BROWN i współaut. 1979). Gromadzenie się mutacji mitochondrialnego DNA z wiekiem zostało udowodnione także bezpośrednio (ARNHEIM i CORTOPASSI 1992, LEE i współaut. 1994, SIMONETTI i współaut. 1992, WEI 1992). Bardzo często obserwowanymi uszkodzeniami mitochondrialnego DNA są delecje stosunkowo sporych odcinków, spośród których u człowieka najpospolitszą jest delecja odcinka leżącego między 8 469 a 13 447 parą zasad, zwana ze względu na swoją długość delecją 4 977 pz (YANG i współaut. 1994). Znanych jest jeszcze kilka innych charakterystycznych delecji. Stwierdza się ponadto mutacje punktowe, mutacje przesunięcia, powstawanie dimerów oraz insercje (MIQUEL 1992). Obserwowane uszkodzenia miały miejsce zarówno w DNA odpowiedzialnym za ekspresję białka, jak również w odcinkach kodujących tRNA (MÜNSCHER i współaut. 1993). Oprócz uszkodzeń w genomie stare

mitochondria wykazują również zmiany w płynności, elastyczności i przepuszczalności błon oraz zaburzenia w homeostazie wapniowej (MIGUEL 1992).

O szkodliwości uszkodzeń mitochondrialnego DNA może świadczyć szereg dziedzicznych chorób, których cechą wspólną jest wysoka niestabilność tych organelli. Spośród najbardziej znanych można wyróżnić trzy główne typy: postępujące porażenie zewnętrznych mięśni gałki ocznej (CPEO) — grupę chorób dotyczących komórki mięśniowej, a w swojej ostrzejszej postaci, zwanej zespołem Kearnsa-Sayrea (KSS), dodatkowo neurony; MELAS (mitochondrialna miopatia, encefalopatia, kwasica mleczanowa i udar) oraz chorobę Fukuhara (MERRF) — choroby również przejawiające się zaburzeniami neuromuskularnymi. Jak łatwo zauważyć, choroby te atakują głównie tkanki nie posiadające zdolności podziałowych, co zgodne jest z założeniami Miquela.

Mitochondria starszych nie dzielących się komórek oprócz zmian morfologicznych wykazują również zmiany funkcjonalne. W zależności od tkanki obserwuje się większe, bądź mniejsze obniżenie się produkcji ATP w komórce. Przypuszcza się, że oprócz spadku przypadających na komórkę liczby mitochondriów, przyczyną takiego stanu rzeczy jest również coraz większa nieszczelność łańcucha oddechowego pozostałych mitochondriów. To z kolei może być przyczyną zwiększenia generacji wolnych rodników, tym bardziej że mniej wydolne mitochondria, aby dostarczyć komórce dotychczasowe ilości energii, zmuszone są pracować w większym tempie (ARNHEIM i CORTOPASSI 1992).

Ze względu na zachęcające założenia teoretyczne oraz z racji sporego materiału dowodowego mitochondrialna teoria starzenia się należy obecnie do teorii bezsprzecznie cieszących się największym powodzeniem. Jednakże nawet i w jej przypadku można postawić kilka trudnych pytań, na które do dziś jeszcze nie ma jednoznacznych odpowiedzi. Po pierwsze, zgodnie ze swoimi założeniami ogranicza się do komórek zróżnicowanych i nie dzielących się a w szczególności do tych, które proces różnicowania się przeszły na samym początku rozwoju organizmu. Jednocześnie procesy starzenia nie ograniczają się tylko do nich. Co więcej, nawet w tkankach wcześniej zróżnicowanych, pochodzących od osób, które nie cierpią na wspomniane wcześniej choroby mitochondrialne, akumulacji uszkodzeń w mitochondriach poniżej pewnego wieku raczej nie daje się zaobserwować (ARNHEIM i CORTOPASSI 1992, LEE i współaut. 1994). Jeśli byłby to rzeczywisty obraz a nie rezultat niedoskonałości pomiarowej, degeneracja mitochondriów mogłaby się okazać kolejnym procesem, będącym wynikiem a nie przyczyną starzenia się. Źródłem innych wątpliwości może być porównanie stopnia uszkodzenia populacji mitochondriów u ludzi starych i osób cierpiących na choroby o podłożu mitochondrialnym. Okazuje się, że nawet u ludzi w podeszłym wieku względna liczba najbardziej pospolitych mutacji nie jest zbyt duża. Na przykład w przypadku delekcji 4 977 pz, w tkance mięśniowej, wynosi ona od 0,0025% do wyjątkowo 0,26% (CORRAL-DEBRINSKI i współaut. 1991, LEE i współaut. 1994, LEZZA i współaut. 1994, SIMONETTI i współaut. 1992). W innych tkankach wartości te mogą być jeszcze mniejsze (LEE i współaut. 1994, SIMONETTI i współaut. 1992). Tę samą delekcję u pacjentów chorych na MELAS można zaobserwować co najmniej u 27% mitochondriów (LEZZA i współaut. 1994), a zdarzają się przypadki, gdy liczba zmutowanych mitochondriów sięga nawet powyżej 90% (ARNHEIM i CORTOPASSI 1992). Podobnie wysoki stopień uszkodzenia

mitochondrialnego DNA można obserwować również w przypadku innych tego typu zaburzeń (SHOJI i współaut. 1993). Czy jest zatem możliwe, aby tak mała liczba uszkodzeń, jaką obserwujemy u osób zdrowych, mogłaby być głównym powodem starzenia się ich organizmów? Warto wspomnieć także o organizmach, u których stopień uszkodzenia genomu mitochondrialnego zdaje się być względnie stały w ciągu całego życia. W przypadku muszki owocowej wynosi on około 1% (CALLEJA i współaut. 1993). Tak więc procesy starzenia się i degradacji mitochondriów mogłyby zachodzić całkiem niezależnie. Co ciekawe, aktywność enzymów mitochondrialnych u muszki spada z wiekiem. Jest zatem całkiem prawdopodobne, że podobny spadek obserwowany na przykład u człowieka, również może być spowodowany czynnikami leżącymi poza omawianą organellą.

FENOMEN KOMÓREK ROZRODCZYCH

Wszystkie powyżej przedstawione teorie mogą być ze sobą powiązane i wzajemnie się uzupełniać. Jak to już zostało wcześniej wspomniane, istnieje synergia między powstawaniem uszkodzeń wolnorodnikowych a procesami Maillarda. Jedne i drugie brane są pod uwagę w teorii wiązań sieciujących, teorii lipofuscyновой czy też teorii mutacji somatycznych. Wreszcie mitochondrialna teoria starzenia się jest w pewnym sensie niczym więcej, jak rozwinięciem teorii wolnorodnikowej i teorii mutacji somatycznych. Wszystkie są również typowymi teoriami stochastycznymi. Uznają one zatem, że u podstaw procesów starzenia nie ma ani żadnej celowości, ani nawet nie istnieje żaden program odpowiedzialny za gwałtowny wzrost śmiertelności w pewnym, dość ściśle określonym wieku. Zwracają natomiast uwagę na molekularne zdarzenia, które nakładając się na siebie, miałyby prowadzić do coraz większej degeneracji układu żywego. Zdarzenia te chociaż przypadkowe, poprzez swoją masowość, dawałyby w efekcie bardzo charakterystyczny i powtarzalny proces, jakim jest starzenie. Szybkość z jaką by ten proces zachodził uzależniona byłaby zatem od prawdopodobieństwa zaistnienia wspomnianych molekularnych zdarzeń oraz w pewnych przypadkach również od zdolności do naprawy odwracalnych uszkodzeń. W tym momencie pojawia się pytanie o to, czy postulowana akumulacja degeneracyjnych zmian miałyby zachodzić zawsze, czy też jedynie w pewnych specyficznych warunkach. Zdania są podzielone. Część badaczy przyjmuje za bardziej prawdopodobną pierwszą z tych możliwości, uznając, że relacje między czynnikami niszczącymi a mechanizmami obronnymi i naprawczymi wpływałyby jedynie na tempo zmian. Inni zakładają istnienie pewnego progu, poniżej którego uszkodzenia nie gromadziłyby się. Źródeł koncepcji progu można upatrywać w próbach rozwiązania niezwykle interesującej zagadki, jaką jest potencjalna nieśmiertelność linii zarodkowej. Pojawiają się tu jednak dwa istotne problemy. Po pierwsze nie istnieją żadne dane świadczące o wyjątkowych własnościach obronnych komórek pasma płciowego, ani także komórki te nie charakteryzują się szczególnie niskim metabolizmem. Owszem, niektóre komórki są w większym stopniu narażone na przykład na stres oksydacyjny, tak jak ma to miejsce w przypadku włókien mięśniowych, ale procesy starzenia nie ograniczają się tylko do nich, lecz w komórkach somatycznych są zjawiskiem ogólnie pospolitym. Drugi problem ma charakter interpretacyjny. Powstaje bowiem pytanie, czy teorie

powołujące się na istnienie progu można w 100% nazwać teoriami stochastycznymi. Czy wolne rodniki, które mogłyby być przyczyną zmian w jednych komórkach a jednocześnie byłyby niegroźne w innych, można byłoby w dalszym ciągu traktować jako zwykły i nie podlegający kontroli czynnik fizykochemiczny, czy też raczej jako pewien element homeostazy, dający o sobie znać w jednej tkance, a nieaktywny w innej. Nawiasem mówiąc, istnienie progu w teoriach zdecydowanie programowych nie prowadzi do tego typu sprzeczności.

Powyższe problemy nie istnieją również, gdy założymy, że akumulacja uszkodzeń zachodzi zawsze i że żaden próg nie istnieje. Powraca wtedy jednak pytanie o to, co sprawia, że rodzice, czyli osobniki stare, mogą dać początek organizmom młodym. Jaki proces jest w stanie usunąć powstałe w ich komórkach błędy i oczyścić je ze zgromadzonych w okresie dotychczasowego życia śmieci? Pytanie to staje się szczególnie ciekawe, gdy rozważamy uszkodzenia w materiale genetycznym, będącym pierwotnym źródłem informacji komórkowej. Najczęściej spotykaną odpowiedzią jest ogólnikowe stwierdzenie o odnawiającym działaniu procesów płciowych. Szczegóły pojawiają się już rzadziej. Jedni widzą w nich możliwość autentycznej naprawy, w której zmodyfikowane nici DNA powracają do stanu wyjściowego, inni upatrują w mejozie mechanizmu selekcji. W pierwszym przypadku, zwraca uwagę problem matrycy, na bazie której komórka byłaby w stanie dokonać naprawy. Oczywiście w wielu przypadkach wystarczającą byłaby komplementarność nici DNA oraz powstawanie par chromosomów homologicznych. W jaki jednak sposób naprawiane byłyby mutacje, w wyniku których dochodziłoby do podstawienia jednej zasady przez drugą? Co odróżniałoby zasadę właściwą od podmienionej? Druga propozycja również może wzbudzać wątpliwości. Zakłada ona, że w nierozzerwalnie związanej z procesem płciowym fazie haploidalnej ujawniają się wszystkie recesywne mutacje (a zgodnie z teorią mutacji somatycznych, właśnie z takimi mamy do czynienia), co sprawia, że tylko komórki wolne od mutacji szkodliwych przeżyją tę fazę i będą zdolne do zapłodnienia. Koncepcje powyższą należy traktować z rezerwą z kilku powodów. Po pierwsze, opiera się ona na recesywnym charakterze mutacji wywołujących starzenie, co jak to już wcześniej napisaliśmy, wobec doświadczeń z organizmami o różnej ploidalności jest niezbyt przekonujące. Drugie zastrzeżenie wynika z faktu, iż tylko niektóre mutacje szkodliwe dla organizmu wielokomórkowego mogłyby wpływać na żywotność jednokomórkowca, jakim niewątpliwie jest gameta. I wreszcie, nieco dziwną byłaby sytuacja, w której istniałaby populacja komórek zupełnie niezmienionych obok wysoce zmutowanych i to do tego należących do tej samej tkanki. Szczególnie, jeśli odrzucimy istnienie progowej liczby uszkodzeń. Bardziej prawdopodobne byłyby różnice ilościowe. Jedne komórki byłyby zmutowane bardziej, inne mniej.

Omawiając odmładzający charakter procesu płciowego nie sposób nie zatrzymać się na moment przy problemie związanym z istnieniem organizmów rozmnażających się wyłącznie na drodze bezpłciowej. Podobnie jak inne organizmy, one również podlegają procesom starzenia się (MARTINEZ i LEVINTON 1992), jednakże pomimo braku mejozy w ich reprodukcji osobniki nowo powstałe można śmiało określić jako młode. One również zaczynają odmierzać swój biologiczny wiek od nowa. Czy można to wyjaśnić ich niższą pozycją w hierarchii ewolucyjnej i powiązaniem z tym faktem mniej skomplikowanego podłoża gene-

tycznego? Bardziej prawdopodobna jest zależność odwrotna. To rozmnażanie płciowe wpływając na większą zmienność materiału genetycznego stało się przyczyną powstania bardziej złożonych form. Może o tym świadczyć dodatkowo występowanie organizmów wyższych, u których brak procesów płciowych jest zjawiskiem wtórnym. Czy zatem procesy płciowe mają odpowiadać za konserwację informacji biologicznej, czy raczej za jej zmienność? Czy też może ma miejsce jedno i drugie? Paradoks ten nie istnieje w teoriach programowych. Odmłodzenie w czasie procesu płciowego nie musi wiązać się z naprawą uszkodzeń. Jego istotą mogłoby być jedynie przeprogramowanie. Podobnie wygląda poruszana wcześniej kwestia linii i komórek rozrodczych. Tutaj również nie są potrzebne jakieś specjalne mechanizmy konserwacji, lecz istnienie innych algorytmów. W takim ujęciu pasmo płciowe różniłoby się od innych tkanek w ten sam sposób, jak pozostałe tkanki między sobą. Różniłoby się programem. Rola biorących udział w procesach rozmnażania komórek płciowych jest przekazanie następnym pokoleniom pełnej informacji. Dla innych tkanek ta pełna informacja byłaby może niczym więcej, jak zbędnym balastem.

TEORIE PROGRAMOWE

Poglądy uznające starzenie się jako wynik realizacji pewnego programu są, jak to już zostało wcześniej wspomniane, znacznie mniej popularne. Bierze się to zapewne po części z tego, że stworzenie pełnej teorii opartej na powyższym założeniu zdaje się być zadaniem znacznie trudniejszym, a sama teoria bardziej skomplikowaną. Mechanizmy leżące u podstaw tak rozumianego starzenia się mogą być dosyć złożone a co więcej nie muszą być uniwersalne, co stwarza dodatkowe problemy zarówno badawcze, jak i interpretacyjne. Wszystko to razem sprawia, że dowodzenie teorii programowych odbywa się często nie wprost a w oparciu o krytykę teorii stochastycznych (co częściowo było zaprezentowane również w niniejszym opracowaniu). Oczywiście zwolennicy genetycznego podłoża procesów starzenia się nie ograniczają się wyłącznie do tej metody, lecz posiadają również argumenty pozytywne. Nim do nich przejdę, chciałbym najpierw dokładnie sprecyzować, co w dalszej części będzie rozumiane pod pojęciem starzenia się programowego. Otóż nazwa ta będzie stosowana nie tylko w przypadku, w którym starość organizmu i jego śmierć miałyby być zjawiskiem celowym, lecz również we wszystkich innych przypadkach, w których starzenie się jest wynikiem wpisanego w pewien plan pojawienia się ekspresji określonych genów, a nie, jak to ma miejsce w teoriach stochastycznych, w wyniku ciągłej akumulacji różnych szkodliwych zmian.

Porównując dwie przeciwstawne koncepcje starzenia się nie sposób nie zwrócić uwagi na to, że samo pojęcie starzenia się musi być nieco inaczej w nich rozumiane. W teoriach stochastycznych (nie uznających progów) starzenie się zachodzi zawsze: od urodzenia, czy nawet wcześniej, do śmierci. Wraz z wiekiem jego tempo może ulegać zmianie, ale są to jedynie zmiany ilościowe, związane zresztą z wcześniejszymi uszkodzeniami. Inaczej mówiąc, nasz wiek poreprodukcyjny (starość) jest wynikiem starzenia się. W przypadku teorii programowych jest w pewnym sensie na odwrót. Przejsie wieku reprodukcyjnego jest sygnałem

do rozpoczęcia się starzenia. Zgodnie z takim podejściem proces starzenia pojawia się pod koniec życia i jest jednym z jego etapów. Jeśli tak, to istnieje duże prawdopodobieństwo, że proces ten będzie podlegać tym samym mechanizmom i być kontrolowanym przez te same systemy co inne, wcześniejsze etapy. Za słuszością traktowania starzenia się jako integralnej części przemian osobniczych, a zatem jako zjawiska zaprogramowanego, mogą przemawiać dane przedstawiające zależność między długością życia konkretnego gatunku a długością jego okresu dojrzewania. Okazuje się, że u ssaków, w przeważającej mierze, wielkości te są ze sobą w pozytywny sposób skorelowane. Czym dłuższe dojrzewanie, tym dłuższe życie (tab. 1). Sugeruje to istnienie wewnętrznego zegara, który u jednych organizmów może poruszać się szybciej, u innych zaś wolniej. Towarzyszące temu różnice w potencjale obronnym komórki, na których opierał się Cutler, a także różna zdolność naprawy uszkodzonego DNA, mogą być jedynie czymś wtórnym. Organizm mając z góry ustaloną długość życia nie ma powodu inwestować w obronę więcej, niż jest to niezbędne do właściwego funkcjonowania w przewidzianym czasie. Oczywiście można to również zinterpretować w przeciwny sposób – długość życia jest określona czynnikami stocha-

Tabela 1

Porównanie długości rozwoju płodowego, dojrzewania płciowego i maksymalnej długości życia u ssaków (KANUNGO 1998)

Gatunek	Maksymalna długość życia ^a	Długość ciąży ^a	Wiek dojrzewania płciowego ^a
Człowiek	1380	9	144
Wieloryb	960	12	–
Słoń indyjski	840	21	156
Koń	744	11	12
Szympanś	534	8	120
Goryl	472	9	–
Niedźwiedź brunatny	442	7	72
Pies	408	2	7
Bydło domowe	360	9	6
Rezus	348	5,5	36
Kot	336	2	15
Świnia	324	4	4
Owca	240	5	7
Koza	216	5	7
Królik	156	1	12
Świnka morska	90	2	2
Szczur	56	0,7	2
Chomik	48	0,5	2
Mysz	42	0,7	1,5

^a – w miesiącach

stycznymi, natomiast długość okresu dojrzewania jest określona wtórnie poprzez dopasowanie się do przewidywalnej długości życia.

Jednym z argumentów wysuwanych przez zwolenników teorii programowych są dane wskazujące na istnienie dość ściśle, gatunkowo określonej, maksymalnej długości życia (CRISTOFALO i współaut. 1994). Do tej samej klasy argumentów należy również zaliczyć wyniki pochodzące z badań nad bliźniakami jedno-, bądź dwujajowymi, w których stwierdzono występowanie zbliżonej długowieczności, pomimo różnic w trybie życia, czy wreszcie fakt dziedzicznego charakteru chorób przedwczesnego starzenia się. Wysuwanie tych i podobnych argumentów wydaje się jednak być sporym nadużyciem i świadczyć o niezrozumieniu istoty problemu. Jedynym wnioskiem jaki mamy prawo wyciągnąć z powyższych danych jest więc to, że długość życia tak gatunków, jak i poszczególnych osobników jest w dużej mierze uwarunkowana genetycznie. Takie uwarunkowanie może rzeczywiście odzwierciedlać leżący u podstaw procesu starzenia się program, ale równie dobrze może być pochodną szeroko rozumianej odporności organizmu na czynniki stochastyczne.

STARZENIE SIĘ *IN VITRO*

Dziedzina, która w większym od innych stopniu zwróciła uwagę zwolenników programowych teorii starzenia się są badania starzenia się *in vitro*. Początkowo przypuszczano, że chociaż wszystkie organizmy starzeją się, to wchodzące w ich skład pojedyncze komórki są potencjalnie nieśmiertelne. Owszem, umierają, ale w wyniku śmierci całego organizmu – tak jak ginie fauna jednokomórkowców, zasiedlających wysychającą kałużę. Na początku XX wieku poglądy te zdawały się nawet uzyskiwać potwierdzenie w doświadczeniach Carrela (CARREL i BURROWS 1910). Dopiero druga połowa wieku przyniosła wyniki badań Hayflicka i Moorhead'a, którzy wykazali, że sztucznie hodowane fibroblasty ludzkie mają ograniczony i dość dokładnie określony potencjał podziałowy. Od tego czasu pojawiło się wiele publikacji opisujących starzenie się *in vitro* także innych tkanek (HAYFLICK 1989). Jednocześnie eksperymentu Carrela z fibroblastami kurzymi pomimo stosowania podobnych metod nie udało się powtórzyć (HAYFLICK 1991). We wszystkich przypadkach okazało się, że normalne nietransformowane komórki ludzkie i zwierzęce nie są w stanie dzielić się bez ograniczeń. Po początkowym okresie szybkiego wzrostu tempo proliferacji gwałtownie spada. Oznacza to wejście hodowli komórkowej w tak zwaną fazę III, kończącą się całkowitym zahamowaniem podziałów. Zjawisko to jest określane jako starzenie się na poziomie komórkowym, czy też jako starzenie się *in vitro*. Chociaż istnienie tego zjawiska nie pozostawia obecnie już żadnych wątpliwości w dalszym ciągu dyskusyjną pozostaje kwestia tego, czy rzeczywiście obserwowany proces jest odpowiedzialny za degeneracyjne zmiany, ujawniające się na poziomie całego organizmu. Głównym argumentem wysuwany przeciwko takiej interpretacji jest fakt nie osiągania przez komórki w warunkach *in vivo* wyznaczonej w badaniach *in vitro* maksymalnej liczby podziałów. Inaczej mówiąc zwraca się uwagę na to, że komórki wchodzące w skład organizmów starych są w dalszym ciągu zdolne do podziałów. Nie można jednak zapominać o tym, że zahamowanie proliferacji nie jest jedynym objawem starzenia się komórek *in vitro*. Fibroblasty

i inne przebadane komórki ludzkie i zwierzęce wchodząc w fazę trzecią charakteryzują się wyraźnymi zmianami morfologicznymi i anatomicznymi. Ponadto stwierdzono odwrotną korelację między potencjałem podziałowym komórek a wiekiem dawcy (HAYFLICK 1991). Jeszcze silniejszym argumentem jest korelacja między potencjałami podziałowymi konkretnych rodzajów komórek a maksymalnymi długościami życia gatunków, od których zostały pobrane (tab. 2). Podobną zależność stwierdzono porównując te wielkości u ludzi zdrowych i osób cierpiących na choroby przedwczesnego starzenia się (CLARK i WEISS 1993, FARAGHER i współaut. 1993, MURANO i współaut. 1991).

Tabela 2

Zależność między potencjałem podziałowym fibroblastów hodowanych *in vitro* a maksymalną długością życia u wybranych kręgowców (KANUNGO 1980)

Gatunek	Potencjał podziałowy populacji fibroblastów hodowanych <i>in vitro</i>	Maksymalna długość życia (w latach)
Żółw słonowy	90-125	175(?)
Człowiek	40-60	110
Norka	30-34	10
Kura	15-35	30(?)
Mysz	14-28	3,5

Występowanie starzenia się komórek *in vitro* oczywiście, samo z siebie, nie stanowi zaprzeczenia teorii stochastycznych. Teorie te opierają się bowiem na zmianach, do jakich dochodzi na poziomie molekularnym, a zatem poniżej poziomu komórkowego. Wszelkie uszkodzenia, na które powołują się te teorie, mogłyby być bezpośrednią przyczyną degeneracji komórek, a dopiero w drugiej kolejności pośrednio wpływałyby na cały organizm. Istnieje jednakże wiele cech starzenia się komórek *in vitro*, które wyraźnie wskazują na genetyczne i programowe podłoże tego procesu. Jedną z nich jest to, że potencjał podziałowy jest wielkością charakterystyczną i niewrażliwą na wiele czynników fizyko-chemicznych. W szczególności stosowanie różnych temperatur hodowli oraz podawanie antyoksydantów było dla potencjału podziałowego badanych populacji czynnikiem obojętnym (BALIN i współaut. 1977, HAYFLICK 1980). Potencjał podziałowy był również niewrażliwy na tak drastyczne działania, jak zamrażanie kultur komórkowych. Przetrzymywane w ten sposób ludzkie fibroblasty po 20 czy 30 latach dokładnie „pamiętały liczbę podziałów, które miały już za sobą”. Także długotrwałe przetrzymywanie kultur komórkowych w medium nie zawierającym czynników wzrostowych nie zmieniało wartości maksymalnej liczby podziałów, do których były one zdolne. Jest to szczególnie istotne, gdyż w przeciwieństwie do eksperymentów z zamrażaniem w tym przypadku nieaktywne, mitotycznie komórki zachowywały pełny metabolizm, a zatem przez cały czas mogła zachodzić, związana z aktywnością metaboliczną, akumulacja niekorzystnych zmian. Istnieją jednakże obserwacje potwierdzające udział czynników stochastycznych w procesach starzenia się komórkowego. Warto tu wspomnieć o doniesieniu

o hamującym wpływie nadtlenu wodoru na zdolność do proliferacji ludzkich fibroblastów (CHEN i AMES 1994). Co więcej, należy także nadmienić, że stosowane pojęcie potencjału podziałowego jest nieco mylące. Sugeruje ono, że wszystkie należące do badanej populacji komórki dzielą się w sposób dość regularny i że w pewnym momencie podziały te ustają. W rzeczywistości na obserwowane podwojenia masy populacji komórek jedne komórki wpływają w większym stopniu, podczas gdy inne mogą nie dzielić się już wcale. Ta niejednorodność populacji nie znajduje prostego wyjaśnienia i raczej źle komponuje się w koncepcjach programowych.

Jedną z cech przemawiających za genetycznym podłożem starzenia się komórek *in vitro* jest ściśle określenie momentu, w którym cykl komórkowy zostaje przerwany. W większości przypadków stare komórki zatrzymują się w późnej fazie G1 i nie mogą rozpocząć replikacyjnej fazy S (SHERWOOD i współaut. 1988). Czasami zatrzymanie cyklu może mieć miejsce również w fazie G2 (GONOS i współaut. 1992). Mechanizmy odpowiadające za blokowanie tych dwóch przejść mogą się częściowo pokrywać, aczkolwiek nie są tożsame. Czynniki umożliwiające przełamanie blokady między fazami G1 i S nie zawsze wystarczają do rozpoczęcia mitozy (STEIN 1989).

Bardzo ważnym argumentem zwolenników istnienia wewnętrznego programu w procesach starzenia się *in vitro* jest fakt istnienia komórek rakowych. W przypadku wielu z nich ograniczenia stwierdzone przez Hayflicka nie mają miejsca. Nadzwyczajną zdolność komórek rakowych do nieograniczonej liczby podziałów raczej trudno byłoby wyjaśnić jakimiś nadprzeciętnymi możliwościami obrony przed czynnikami stochastycznymi. W rzeczywistości, porównując na przykład aktywność enzymów biorących udział w obronie przed wolnymi rodnikami, w przeważającej mierze, porównanie to wychodzi na niekorzyść dla komórek rakowych (OBERLEY i OBERLEY 1988).

Jeszcze ciekawszych danych dostarczają eksperymenty polegające na fuzji komórek młodych mających wysoki potencjał podziałowy z komórkami starymi, które swoje zdolności podziałowe już wyczerpały. Jeśli zahamowanie procesów podziałowych miałyby być rezultatem zakumulowania w określonej objętości pewnej liczby uszkodzeń, można byłoby oczekiwać, że fuzja prowadziłaby do jakiegoś uśrednienia zdolności podziałowych komórek młodych i starych. Okazuje się jednak, że powstałe heterokarionty zachowują się tak, jak komórki stare, będące zupełnie nie zdolnymi do jakichkolwiek podziałów (PEREIRA-SMITH i SMITH 1982). Świadczyć to może o istnieniu aktywnych czynników w procesie starzenia się *in vitro*. Co więcej, powyższe dane sugerują, że gen lub geny odpowiedzialne za ten proces byłyby niewątpliwie dominujące. Potwierdzają to dodatkowo fuzje przeprowadzane między normalnymi a transformowanymi, nieśmiertelnymi liniami komórkowymi. Powstające hybrydy nie posiadały zdolności do nieograniczonej liczby podziałów (PEREIRA-SMITH i SMITH 1983). Podobne rezultaty uzyskiwano również dodając do genomu nieśmiertelnych linii komórkowych pojedyncze chromosomy pochodzące z komórek nietransformowanych. W przypadku komórek ludzkich ograniczenie zdolności podziałowych obserwowano przy mikroiniekcji ludzkich chromosomów 1 i 4 (HENSLEY i współaut. 1994, PEREIRA-SMITH i współaut. 1985). Obecność genów, które mogłyby brać udział w hamowaniu proliferacji w starszych kulturach komórkowych, stwierdzono

również na chromosomach 6 i 11 (GUALANDI i współaut. 1994, SABBIONI i współaut., 1994, SANDHU i współaut. 1994). Można byłoby zatem powiedzieć, że unieśmiertelnienie się komórki nie odbywa się na drodze nabycia jakichś specjalnych mechanizmów, lecz polega raczej na utracie zdolności do ekspresji pewnych genów.

Wiele przemawia za tym, iż czynników odpowiedzialnych za hamowanie podziałów komórkowych należy szukać w cytoplazmie. Wyniki fuzji przeprowadzanych między całymi komórkami młodymi a pozbawionymi jąder starymi fibroblastami były takie same, jak w przypadku pełnych komórek (DRESCHER-LINCOLN i SMITH 1983). Krótkie podziały trypsyną na biorące udział w fuzji cytoplasty starych komórek nieco łagodziło ich inhibujące działanie (PEREIRA-SMITH i współaut. 1985), co mogłoby świadczyć o białkowym charakterze uczestniczących w tym procesie czynników. Co ciekawsze, zniesienie antyproliferacyjnego działania starych cytoplastów uzyskiwano również stosując inhibitory syntezy białka, takie jak na przykład cykloheksimid (DRESCHER-LINCOLN i SMITH 1984). Sugeruje to istnienie w cytoplazmie starych komórek specyficznego mRNA, odpowiedzialnego za syntezę wspomnianych wyżej, białkowych inhibitorów podziałów komórkowych. Zostało to udowodnione w dalszych eksperymentach polegających na wstrzykiwaniu RNA pochodzącego z komórek starych do młodych, co również prowadziło do zahamowania syntezy DNA (LUMPKIN i współaut. 1986). Z badań, w których hamowano translację mRNA wynika jeszcze jeden, bardzo ważny wniosek. Otóż do pełnego zniesienia powodowanej przez stare fibroblasty inhibicji syntezy DNA wystarczała jedynie dwugodzinna inkubacja z cykloheksimidem, co może świadczyć o tym, że czynniki hamujące proliferację są białkami o małej trwałości. Tak więc wzrost ich aktywności nie mógłby być rezultatem długotrwałej akumulacji lecz raczej efektem wzmożonej ekspresji odpowiadających im genów.

Badania prowadzone *in vitro* nad populacjami komórek ludzkich i zwierzęcych a także badania oparte na niższych organizmach eukariotycznych stały się źródłem wielu cennych informacji, które pozwoliły zrozumieć niektóre mechanizmy regulujące cykl komórkowy, w tym również takie, które mają swój udział w procesach starzenia. W dalszym jednak ciągu uzyskany obraz jest niepełny a co ważniejsze nie daje odpowiedzi na podstawowe pytanie, o to co rozpoczyna łańcuch przemian w starzejącej się komórce; które zmiany można uznać za pierwotne. Jak do tej pory wiele wskazuje na to, że omawiane mechanizmy mogą mieć wielostopniową strukturę, co dodatkowo komplikuje cały obraz. Przemawiają za tym badania, w których przeprowadzano fuzję między różnymi nieśmiertelnymi liniami komórkowymi. Okazało się, że tylko niektóre hybrydy zachowały właściwości rodziców. Wyodrębniono cztery grupy linii komórkowych, między którymi fuzje nie prowadziły do utraty proliferacyjnej nieśmiertelności (SMITH i PEREIRA-SMITH 1989). Świadczyć to może o tym, że recesywna mutacja prowadząca do uwolnienia się spod kontroli mechanizmów regulujących podziały komórkowe mogłaby dotyczyć czterech różnych genów, bądź czterech grup genów. W komórkach ludzkich dochodzi do dalszych komplikacji związanych z istnieniem dwóch, a nie jednego progu oddzielającego zwykle komórki od tych, które są już w pełni nieśmiertelne (WRIGHT i SHAY 1992). Progi te są określane jako M₁ i M₂. Wiadomo już, że mechanizmy odpowiedzialne za hamowanie

prolifracji w tych miejscach nie są tożsame, o czym może świadczyć to, że czynniki umożliwiające przeskoczenie progu M_1 (np. transfekcja wirusem SV40) nie są w stanie usunąć kolejnej bariery, jaką jest próg M_2 .

Na podstawie dotychczasowych badań, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że spowolnienie tempa powielania się materiału genetycznego w starych populacjach następujące głównie na skutek zmian jakie zachodzą w mechanizmach inicjacji replikacji, aczkolwiek aktywność polimerazy α — podstawowego odpowiedzialnego za replikację DNA enzymu u organizmów eukariotycznych również wyraźnie spada (NORWOOD i współaut. 1992). Większość czynników biorących udział w procesie inicjacji w komórkach starych wykazuje podobną ekspresję, co w komórkach młodych. Nieznaczny spadek stężenia daje się zauważyć w przypadku cykliny A oraz białka $p34^{cdc2}$ (RIABOWOL 1992). Znacznie drastyczniej spada stężenie białka c-Fos, którego dimery z białkami z grupy Jun tworzą niezbędny dla inicjacji kompleks AP-1 (RIABOWOL i współaut. 1988). Niestety, podawanie tych białek do starych komórek nie wystarczyło do reinicjacji podziałów. Fakt ten jednakże nie deprecjonuje całkowicie roli c-Fos w zdarzeniach, jakie mają miejsce w starzejących się komórkach *in vitro*. Trzeba bowiem pamiętać, że oprócz zmian ilościowych na zdolność wiązania się c-Fos z białkami z grupy Jun mają również wpływ zmiany post-translacyjne, w szczególności jego ufosforylowanie (RIABOWOL 1992). Innym białkiem uczestniczącym w procesach regulacji replikacji DNA, a którego aktywność również zależy od stopnia ufosforylowania, jest produkt genu retinoblastomy ($p110^{Rb}$). Stwierdzono, że charakterystyczny dla starych fibroblastów, nieufosforylowany $p110^{Rb}$ blokuje proces inicjacji. Chociaż i w tym przypadku inaktywacja tego białka nie wystarczała do przekroczenia pierwszego progu w drodze do proliferacyjnej nieśmiertelności białko to rzeczywiście może uczestniczyć w procesach starzenia się *in vitro*. Okazuje się bowiem, że jednoczesna inaktywacja białka $p110^{Rb}$ i innego białka supresorowego p53 pozwala na przekroczenie progu M_1 (WRIGHT i SHAY 1992). Oczywiście nadal pozostaje problem zmian pierwotnych, jako że nieufosforylowanie $p110^{Rb}$ oraz zmiany w ekspresji p53 znajdują się raczej bliżej końca łańcucha przemian prowadzących do inhibicji replikacji DNA. Znalezienie początkowych ogniw byłoby zapewne wielkim krokiem na drodze do zrozumienia mechanizmów prowadzących do mitotycznej śmierci komórki. Jednakże nawet wtedy pozostałby otwarty problem istnienia komórkowego zegara, odpowiedzialnego za liczenie kolejnych podziałów i za nadanie pierwotnej informacji o tym, że już nadszedł czas się zatrzymać. Stochastyczne wyjaśnienie starzenia się *in vitro* nie wymaga specjalnego licznika — każda biomolekuła akumulująca uszkodzenia może pełnić taką rolę. Wyjaśnienie programowe wymaga zegara z prawdziwego zdarzenia. Zgodnie z tym, co już wcześniej było powiedziane, zegar taki nie mierzyłby czasu chronologicznego, lecz czas wewnętrzny, związany z następującymi po sobie cyklami komórkowymi.

ROLA TELOMERÓW

Jednym z najbardziej popularnych kandydatów na funkcję komórkowego zegara jest telomer. Mianem tym oznaczamy nukleoproteinową strukturę, będącą naturalnym zakończeniem chromosomów organizmów eukariotycznych. Ce-

chą charakterystyczną telomerowego DNA jest prosta, powtarzająca się sekwencja o wysokiej konserwatywności. U człowieka, podobnie jak u innych kręgowców, ma ona postać TTAGGG, dając w sumie cząsteczkę o długości od 2 do 30 tysięcy par zasad (DE LANGE 1992). Telomery stanowią ochronę mechaniczną chromosomu, jak również, co w tym przypadku istotniejsze, rozwiązują problem replikacji charakterystycznej dla organizmów eukariotycznych — liniowej cząsteczki DNA. Cząsteczka ta jest replikowana wyłącznie w kierunku $5' \rightarrow 3'$, przy czym zawsze jest wymagany rybonukleinowy starter, co prowadzi do ciągłego skracania się nici DNA. Obecność telomeru sprawia, że nie odbywa się to kosztem istotnych sekwencji kodujących. Możliwość ciągłego skracania się telomerowego DNA stała się przesłanką do stworzenia przez Olovnikowa teorii upatrującej w omawianej strukturze molekularnego licznika podziałów komórkowych (OLOVNIKOV 1973). Późniejsze badania wykazały, że rzeczywiście skracanie się telomerów jest regułą we wszystkich komórkach somatycznych (HARLEY 1991) oraz że ich brak może prowadzić do aberracji chromosomalnych, a w szczególności do powstawania chromosomów dicentrycznych (PATHAK i współautorzy 1994). Co więcej, w komórkach linii generatywnej telomery nie tylko mogą nie tracić swojej długości, lecz nawet niejednokrotnie ulegają wydłużeniu (HARLEY 1991). To ostatnie zjawisko jest tłumaczone istnieniem aktywności telomerazowej — enzymu będącego rybonukleino-białkową odwrotną transkryptazą. Podobnie aktywność telomerazową stwierdza się również u organizmów jednokomórkowych (GREIDER i BLACKBURN 1985), a także, co szczególnie interesujące, w transformowanych, nieśmiertelnych liniach komórek rakowych (DE LANGE 1994). Używając organizmów jednokomórkowych przeprowadzono eksperymenty, które bezpośrednio mogą wskazywać na związek między długością telomeru a zdolnościami proliferacyjnymi. Zablokowanie w komórkach drożdżowych ekspresji genu *EST 1*, który jak się przypuszcza jest odpowiedzialny za aktywność telomerazy, prowadziło do postępującego spadku długości telomeru i pojawienia się symptomów starości (LUNDBLAD i SZOSTAK 1989). Podobne rezultaty otrzymywano pozbawiając telomeru chromosomy drożdżowe w sposób mechaniczny. O roli telomerów w procesach starzenia się mogłyby świadczyć również obserwacje wskazujące na to, że jedyną aberracją chromosomową w znaczący sposób wzrastającą u człowieka z wiekiem jest powstawanie chromosomów dicentrycznych.

Nie ulega wątpliwości, że telomer jest strukturą bardzo ważną dla zachowania genetycznej stabilności. Można nawet powiedzieć, że konieczną. Z tego powodu również aktywność telomerazy jest bezsprzecznie niezbędna w tkankach, w których komórki dzielą się w sposób nieograniczony. Nie jest już jednak tak oczywiste, czy to właśnie telomer i jego zanik jest odpowiedzialny za pojawianie się w kulturach komórkowych fazy III i związanej z nią bariery M_1 . Już samo porównanie telomerów pochodzących z komórek należących do różnych tkanek może budzić spore wątpliwości. Niejednokrotnie komórki, które osiągnęły fazę M_1 , mają dłuższe telomery od innych, jeszcze dzielących się komórek. Podobny brak zależności możemy napotkać analizując długości telomerów i zdolności replikacyjne komórek pochodzących od różnych gatunków. Dobrym przykładem może być porównanie dokonane między człowiekiem a myszami domowymi, u których długość telomeru była mniej więcej 10 razy dłuższa

od ludzkiej (KIPLING i COOKE 1990). Myszy te nie tylko nie miały zamiaru odebrać człowiekowi jego pierwszeństwa w długowieczności wśród ssaków, ale również nie różniły się pod tym względem od innych pokrewnych sobie gatunków, które nie były obdarzone tak cennym ładunkiem. Źródłem innych wątpliwości są fakty wskazujące na to, że w wielu przypadkach komórki, które przekroczyły próg M_1 , w dalszym ciągu tracą swoje telomerowe DNA. A zatem, jeśli telomer miałby spełniać rolę zegara i licznika podziałów komórkowych, jego długość byłaby jedynie pewnym wskaźnikiem. Nie wpływałaby natomiast w sposób bezpośredni na zdolność komórki do podziałów. W takim ujęciu przejście przez niektóre komórki progu M_1 byłoby wynikiem nie odczytania zawartej w telomerze informacji, bądź jej obejścia. Z drugiej jednak strony, nie stwierdzono istnienia dzielących się komórek ludzkich, których sekwencja telomerowa byłaby krótsza niż 1,5 tys. par zasad. Co więcej, taka długość jest charakterystyczna dla komórek, które zatrzymały się w punkcie M_2 (DE LANGE 1994). Być może, właśnie ten drugi punkt jest wyznaczony długością telomeru. W takim jednakże przypadku rola telomerów w procesach starzenia się zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* byłaby raczej nieistotna.

ASPEKT EWOLUCYJNY PROCESÓW STARZENIA

Dotychczasowe rozważania polegały głównie na analizie proponowanych wyjaśnień natury starzenia się. Warto również na chwilę zatrzymać się nad podstawowym dla całego problemu pytaniem o sens istnienia tego zjawiska. Jeśli bowiem mielibyśmy mieć do czynienia z procesem programowym, jego powszechne występowanie sugerowałoby istnienie kryjących się za tą powszechnością, niezwykle silnych presji ewolucyjnych. Sprawa ta stała się obiektem żywej dyskusji prowadzonej zarówno w kręgach gerontologicznych, jak i wśród ewolucjonistów. Już samo to sugeruje, że dyskusja ta jest wielowątkowa. Główna linia podziału między stronami w toczącym się sporze jest jednak wyraźna. Z jednej strony zwolennicy teorii adaptatywnych widzący w procesach starzenia zjawisko celowe i korzystne dla gatunku oraz ich przeciwnicy uważający, że nawet jeśli starzenie się powstało na drodze ewolucji, to stało się to jak gdyby przypadkiem i przy okazji (KIRKLAND 1989). Nietrudno zauważyć, że środek ciężkości dyskusji między adaptywiłami a nonadaptywiłami leży w nieco innym miejscu niż w sporze zaprezentowanym w niniejszym opracowaniu. O ile słuszność koncepcji adaptatywnych raczej jednoznacznie przemawiałaby za programowym podłożem procesów starzenia się (choćaż też nie do końca), o tyle przyjęcie koncepcji nonadaptatywnej nie wyklucza ani teorii programowych ani stochastycznych.

KONCEPCJE ADAPTATYWNE

U podstaw koncepcji adaptatywnej leży założenie, zgodnie z którym starzenie się jest zjawiskiem jak najbardziej korzystnym dla gatunku, gdyż daje możliwość wprowadzania do populacji młodych osobników, co z kolei może pociągać za sobą większą zmienność, a przez to większe zdolności przystosowawcze gatunku. Niestety, założenie powyższe musi wystarczać niemal za dowód prawdziwości koncepcji, jako że raczej trudno podać inne istotne argumenty przemawiające

za jej prawdziwością. Jednym z nich miałyby być występowanie gatunków, u których obserwuje się nagłe pojawienie się i szybki przebieg procesu starzenia się. Gatunki takie nazywamy semelparatywnymi (COLE 1954) i klasycznym ich przedstawicielem jest łosoś — ryba, która bez względu na wiek, ginie zazwyczaj wkrótce po odbyciu tarła. Argument ten jest niezbyt przekonujący, a jeśli już to raczej przeciwko teoriom adaptatywnym. Starzenie gatunków semelparatywnych rzeczywiście sprawia wrażenie celowego. Jest jednak zjawiskiem unikalnym. A przecież, jeśli ewolucja promowałaby eliminację osobników starszych, to właśnie taki semelparatywny model wydawałby się najwłaściwszy i najkorzystniejszy. Znacznie mocniejsze argumenty można przedstawić przeciwko koncepcjom adaptatywnym. Po pierwsze, dożywanie późnego wieku w warunkach naturalnych jest rzadkim zjawiskiem (COMFORD 1979). Większość osobników wobec zagrożeń płynących ze środowiska nie ma szans dożyć starości. A zatem, te nieliczne, którym by się to udało i tak nie miałyby większego wpływu na kondycje populacji i przebieg ewolucji. Tak jak rzadkość starzenia się semelparatywnego, tak również pospolitość występowania samego zjawiska starzenia się zdaje się być argumentem przeciwko tezie celowości. Czy byłoby bowiem możliwe, aby przy tak wielkiej różnorodności organizmów żywych i środowisk ich występowania nie napotkalibyśmy wielokomórkowców mających nieograniczony potencjał życiowy. Byłoby to ewenementem wśród najróżniejszych przystosowań, jakie możemy zaobserwować w świecie istot żywych. Jakiegokolwiek sfery życia byśmy nie badali, odnajdujemy organizmy, które nie wykształciły pewnych przystosowań, inne, które takie przystosowania nabyły i jeszcze inne, które z nich zrezygnowały. Natomiast starzenie się jest uniwersalne. Istnieją co prawda doniesienia wskazujące na pewne wyjątki od tej reguły (koralowce, niektóre ryby chrzęstnoszkieletowe) (KIRKLAND 1992), ale przypuszczalnie wynika to z faktu nieodróżniania pojedynczego osobnika od kolonii, bądź po prostu opierania się na nie sprawdzonych do końca danych.

TEORIE NONADAPTATYWNE

Teorie nonadaptatywne, jak łatwo się z powyższego domyślić, cieszą się znacznie większą popularnością. Z drugiej jednak strony, stanowią zdecydowanie mniej homogenną grupę. Co więcej, stosując nasze kryteria dokonujemy dalszych podziałów. Cechą wspólną tych teorii jest założenie, że starzenie się i śmierć organizmów nie jest czynnikiem specjalnie pożądanym. Do teorii nonadaptatywnych cieszących się największym powodzeniem można zaliczyć teorię akumulowanych mutacji, teorię antagonistycznej plejotropii oraz teorię jednorazowej somy. Pierwsze dwie, zaproponowane w połowie XX wieku przez Medawera są nieco do siebie zbliżone, a ich wspólną podstawę stanowi wspomniane już wcześniej założenie mówiące o tym, że los, jaki spotyka starsze osobniki wobec ich niewielkiej liczebności, nie ma większego wpływu na przebieg ewolucji (MEDAWAR 1957). Zgodnie z tym cechy ujawniające się fenotypowo w starszym wieku nie podlegałyby żadnej selekcji, w tym w szczególności nie istniałby mechanizm umożliwiający usuwanie szkodliwych mutacji o opóźnionym działaniu. Mutacje te zaś byłyby odpowiedzialne za to, co postrzegamy jako starzenie. Można powiedzieć, że teoria akumulowanych mutacji na tym się już kończy.

Jednakże w odróżnieniu od teorii adaptatywnych istnieje w jej przypadku sporo obserwacji i eksperymentów, które rzeczywiście mogą potwierdzać stworzoną przez Medawera teorię. Bezpośrednio wpływającym z niej wnioskiem jest to, że populacje i gatunki pochodzące z bezpieczniejszych środowisk będą charakteryzowały się większą długowiecznością. Przykładem mogą być zwierzęta latające, takie jak ptaki, czy nietoperze, duże nie zagrożone przez drapieżniki gatunki ssaków, czy też wreszcie człowiek — gatunek, który wyeliminował wiele zagrożeń mogących być przyczyną przedwczesnej śmierci (PARTRIDGE i BARTON 1993). Opisane zjawisko dało się zaobserwować także w warunkach laboratoryjnych. Populacje muszek owocowych, w których do reprodukcji przeznaczano wyłącznie starsze osobniki, charakteryzowały się wyraźnie większą maksymalną długością życia (LUCKINBILL 1993). W zgodzie z teorią akumulowanych mutacji są również obserwacje wskazujące na długowieczność gatunków, u których wraz z wiekiem zwiększają się zdolności rozrodcze. Skutkiem tego osobniki starsze, chociaż mniej liczne, nadal mają duży wpływ na przenoszoną z pokolenia na pokolenie informację genetyczną. Dobrym przykładem takiej zależności może być karp — ryba, która swoją nazwę zawdzięcza wysokiej płodności, znana jednocześnie jako gatunek długowieczny (WILLIAMS 1957).

Chociaż gromadzenie się ujawniających się w starszym wieku szkodliwych mutacji może nie mieć ujemnego wpływu na kondycję gatunku, to jednak trudno uznać ten fakt za szczególnie korzystny. Można mieć zatem wątpliwości co do tego, czy możliwość ta byłaby czymś wystarczającym do wyewoluowania procesów starzenia się. Wątpliwość ta stanowi przesłankę drugiej wspomnianej teorii, zgodnie z którą akumulowanie w czasie filogenezy genów będących przyczyną starzenia się wiąże się z ich dwojakim, pleiotropowym działaniem (MEDAWAR 1957). Chociaż byłyby one szkodliwe dla osobników starszych, to w młodości zwiększałyby szansę na przeżycie. Jak już wcześniej zaznaczyłem, analogia dychotomi programowe-stochastyczne i adaptatywne-nonadaptatywne jest pozorna. Zaprogramowana sekwencja zdarzeń postrzeganych jako starzenie się nie musi koniecznie wynikać z dążenia gatunków do unicestwiania starszych osobników. Już sam fakt tego, że omawiając teorię akumulowanych mutacji i pleiotropowego antagonizmu często mówimy o istnieniu letalnych genów, może wyrażać pewne niewypowiedziane założenie, że mamy do czynienia z procesem jak najbardziej genetycznie programowanym. Oczywiście również przedstawienie interpretacji stochastycznej powyższego obrazu nie jest rzeczą trudną. Czymś najbardziej narzucającym się może być stwierdzenie, że przyczyną starzenia się są uszkodzenia wywołane przez aktywne formy tlenu, a oddychanie tlenowe jest na obecnym etapie rozwoju świata istot żywych warunkiem koniecznym pomyślnego uczestnictwa w toczonym wśród organizmów wyższych współzawodnictwie. Ocieramy się w tym miejscu o bardzo ważną kwestię interpretacji tego, co można nazwać pierwotnym czynnikiem w procesach starzenia. W powyższym przypadku sprawa jest dosyć jasna. Można by jednak podać takie przykłady, które już nie są tak oczywiste. Z analogicznymi problemami spotykamy się również rozważając kolejną nonadaptatywną teorią zwaną teorią jednorazowej somy, zwracającą uwagę na to, że istotnymi dla gatunku i jego przetrwania są tylko komórki rozrodcze, podczas gdy komórki somatyczne pełnią rolę podrzędną i wtórną w stosunku do poprzednich, polegającą na stworzeniu im jak najwię-

kszych możliwości przeżycia i rozprzestrzeniania się (KIRKWOOD 1977). Można zatem przypuszczać, że tkanki somatyczne będą traktowane po macoszemu, otrzymując jedynie pewne minimum niezbędne do prawidłowego wykonania swojego zadania. Każde dodatkowe nakłady poniesione na rzecz linii somatycznej musiałyby się negatywnie odbić na konkurencyjności gatunku. Reasumując, starzenie się byłoby wynikiem pewnej strategii, której celem byłoby osiągnięcie jak największego sukcesu reprodukcyjnego. Jednorazowa soma nie jest alternatywą do wcześniej opisanych teorii nonadaptatywnych. Stanowi do nich po części uzupełnienie, stąd niejednokrotnie może opierać się na podobnych argumentach. Dobrym tego przykładem może być analiza cyklu życiowego myszy workowatej. W niekorzystnych warunkach środowiskowych jest to szybko rozmnażające się i krótko żyjące zwierzę semelparatywne, natomiast w sprzyjających warunkach zachowuje się jak typowy iteroparus — rozmnaża się powoli i długo żyje (KIRKLAND 1989). Podobnie jest z niektórymi kontrargumentami, do których można na przykład zaliczyć wnioski płynące z doświadczeń Schnebela i Grossfielda, w których trzy badane gatunki muszek z rodzaju *Drosophila* wykazywały pozytywną korelację między długością życia a wczesną rozrodczością (SCHNEBEL i GROSSFIELD 1988). Istnieją również obserwacje popierające teorię akumulowania mutacji, a zdecydowanie nie pasujące do teorii jednorazowej somy. Tak jest w przypadku wspomnianego uprzednio karpia, u którego wysokiej rozrodczości towarzyszy długowieczność. Teoria jednorazowej somy zdaje się zdecydowanie popierać teorie stochastyczne, chociaż i w jej przypadku ostateczne wnioski zależą od interpretacji. Jeśli przyjmiemy, że ochrona przed uszkodzeniami jest niezwykle energochłonna, a co za tym idzie utrzymanie komórek generatywnych może mieć miejsce wtedy i tylko wtedy, gdy poświęcimy komórki innych tkanek, to rzeczywiście starzenie się jawi nam się jako ciągła i co najważniejsze nierozzerwalnie związana z procesami żywymi akumulacja zniszczeń. Jeśli jednak koszty konserwacji komórek nie są tak wysokie, a tkanki somatyczne starzeją się, gdyż nie ma to większego znaczenia, podłoże programowe tego procesu byłoby prawdopodobne.

PRÓBA SYNTEZY

Stopień zagmatwania i liczba wzajemnych interakcji między różnymi koncepcjami w badaniach nad starzeniem się są jak widać niemałe. Jak zawsze najciekawszą sprawą jest istnienie argumentów, silnie przemawiających za teoriami będącymi do siebie w opozycji. Bardzo jednak możliwe, że wypływające z tego faktu sprzeczności dają się łatwo wyjaśnić, a obserwowany paradoks jest w rzeczywistości pozorny. Po części może on wynikać z pewnych niejasności w stosowanych definicjach, jak również być rezultatem wyrywkowego potraktowania całego problemu. Możliwe jest bowiem, aby elementy programowe i stochastyczne mogły ze sobą współistnieć. Próbę pogodzenia stochastycznej i programowej wizji procesów starzenia można odnaleźć, na przykład, w koncepcji Dannera, zakładającej, że odpowiednio wysoki stopień proliferacji jest czynnikiem koniecznym a może nawet wystarczającym dla zapobieżenia degeneracji metabolizujących komórek (DANNER 1992). Każda komórka posiadałaby zatem pewien

bagaż uszkodzeń, którego liczba byłaby wypadkową między tempem akumulowania tych uszkodzeń, a szybkością z jaką dochodziłoby do podziałów komórkowych. Danner dowodzi swojej koncepcji opierając się na obserwacjach dotyczących rozmnażania organizmów jednokomórkowych, wegetatywnego rozmnażania się roślin oraz procesów regeneracyjnych u zwierząt. Warto zwrócić uwagę na to, że powyższa koncepcja dobrze się komponuje z niektórymi wcześniej zaprezentowanymi danymi, takimi jak stosunkowo niskie tempo powstawania trwałych mutacji w jądrowym DNA (które ze zrozumiałych względów nie ulegałyby rozcieńczeniu) oraz fakt ograniczenia się akumulacji uszkodzeń w mitochondriach wyłącznie do komórek zróżnicowanych i nie dzielących się. Wydaje się całkiem prawdopodobną sekwencja zdarzeń, w której początkowe etapy starzenia się polegające na zahamowaniu podziałów komórkowych, co miałoby zdecydowanie programowy charakter, były przyczyną przesunięcia równowagi między akumulacją a rozcieńczaniem uszkodzeń. Prowadziłoby to do wewnętrznej niewydolności komórek, w tym między innymi do załamania się mechanizmów obronnych a przez to do wzmożenia tempa degeneracji. Tak powstałe dodatnie sprzężenie zwrotne w skali całego organizmu objawiałoby się właśnie jako starzenie. Powyższa propozycja oprócz pogodzenia programowych i stochastycznych wyjaśnień przyczyn starzenia się dawałaby również odpowiedź na zagadkę, jaką jest fenomen niestarzenia się (przynajmniej w pewnych granicach) linii komórek płciowych oraz ciągłego odmładzania się, jakie ma miejsce z pokolenia na pokolenie. Istotny byłby w tym kontekście brak mechanizmów limitujących podziały w tkance zarodkowej, jak również niezwykle rozrost komórek jajowych oraz to, że to właśnie one stanowią źródło mitochondrialnego DNA u potomstwa organizmów anizogamicznych. Pozostają jeszcze do wyjaśnienia powody, dla których liczba podziałów miałaby być ograniczona. Jedną z możliwości mogłoby być zabezpieczanie się organizmu przed nowotworami. Jeśli byłoby tak istotnie, mielibyśmy do czynienia z pięknym przykładem antagonizmu pleiotropowego. Inna przyczyna zahamowania proliferacji mogłaby wynikać z istoty procesów rozwoju i różnicowania się organizmów wielokomórkowych. Zakładając, że los komórek w procesie ontogenezy zależy zarówno od ich przeszłości i informacji zawartej w nich samych, jak i od ich umiejscowienia oraz interakcji między nimi, można przypuszczać, że skoordynowanie tak ogromnej liczby komórek musi podlegać pewnym ograniczeniom. Rozwiązaniem mogłoby być zahamowanie w określonym czasie proliferacji, co miałoby za zadanie zakonserwowanie powstałej sytuacji. Problemy jakie wynikają z konieczności zsynchronizowania poszczególnych komórek w procesach rozwoju oraz później, w już rozwiniętych organizmach, mogą być również wyłącznym źródłem prowadzących do śmierci zaburzeń homeostazy. Byłby to wtedy proces niewątpliwie stochastyczny, jednakże zupełnie odmienny od tych, które zostały przedstawione na początku niniejszej dyskusji. Wszystkie one odnosiły do poziomu subkomórkowego, natomiast ten zachodziłby na poziomie całego organizmu.

Powyższa próba powiązania zjawisk programowych ze stochastycznymi w procesach starzenia nie jest oczywiście jedyną. Również wcześniej przedstawione koncepcje są wynikiem pewnego wyboru. Powstało ich w rzeczywistości znacznie więcej. Ze zrozumiałych względów na zaprezentowanie większości z nich nie było już miejsca. Selekcja została w głównej mierze oparta na popularności i aktualności teorii. Nie znalazły się jednak w artykule tak popularne koncepcje, jak te

odwołujące się do zmian, do jakich dochodzi w układzie hormonalnym, czy też immunologicznym. W ich przypadku zaważył fakt, że są to teorie wyższego rzędu i zmiany, które są w nich omawiane mogą mieć podłoże zarówno o charakterze programowym, jak i stochastycznym. Nie wniosłyby zatem wiele do naszych rozważań.

PROGRAM OR IMPERFECTION — UNSOLVED QUESTION OF GERONTOLOGY

Summary

Despite the great development of gerontology in the XX century, one of the most important and fascinating questions of this branch of science remains unsolved. At present almost all gerontologists could be divided into two groups. The first believes that aging is due to stochastic events whereas the second interpret this phenomenon as a programmed process. The more important statements representing opinions of those main groups are presented.

LITERATURA

- AMES B. N., 1989. *Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer*. Free Rad. Res. Commun. 7, 121–128.
- ARNHEIM N., CORTOPASSI G., 1992. *Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues*. Mutation Res. 257, 157–167.
- BALIN A.K., GOODMAN D. B. P., RASMUSSEN H., CRISTOFALO V. J., 1977. *The effect of oxygen and vitamin E on the lifespan of human diploid cells in vitro*. J. Cell Biol. 74, 58–67.
- BAYNES J. W., WATKINS N.G., FISHER C. I., HULL C. J., PATRICK J.S., AHMED M. U., DUNN J. A., 1989. *Thorpe. The Amadori product on protein: structure and reactions*. Alan R. Liss, Inc., 43–67.
- BARET P., FOUARGE A., BULLENS P., LINTS F. A., 1994. *Life-span of Drosophila melanogaster in highly oxygenated atmospheres*. Mech. Ageing. Dev. 76, 25–31.
- BELLAVITE P., 1988. *The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes*. Free Rad. Biol. Med. 4, 225–261.
- BJORKSTEN J., 1974. *Crosslinkage and the aging process*. w *Theoretical aspects of aging*. Acad. Press New York 43–59.
- BROWN W. M., GEORGE M. J. R., WILSON A. C., 1979. *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1967–1971.
- CALLEJA M., PENALTA P., UGALDE C., MARCO R., GARESSE R., 1993. *Mitochondrial DNA remains intact during Drosophila aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced*. J. Biol. Chem. 268, 18891–18897.
- CARREL A., BURROWS M. T., 1910. *Cultivation of adult tissues and organs outside of the body*. JAMA 55, 1379–1381.
- CERAMI A., 1985. *Hypothesis: glucose as a mediator of aging*. J. Am. Geriatr. Soc. 33, 626–634.
- CHEN Q., AMES B. N., 1994. *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4130–4134.
- CLARK M. A., WEISS A. S., 1993. *Elevated levels of glycoprotein gp200 in progeria fibroblasts*. Mol. Cell. Biochem. 120, 51–60.
- COLE L. C., 1954. *The population consequence of life history phenomena*. Q. Rev. Biol. 29, 103–137.
- COMFORT A., 1979. *The biology of senescence*. Wydanie trzecie. Elsevier. New York.
- CORRAL-DEBRINSKI M., STEPIEN G., SHOFFNER J. M., LOTT M. T., KANTER K., WALLACE D. C., 1991. *Hypoxemia is associated with mitochondria DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease*. J. Am. Med. Assoc. 266, 1812–1816.
- CRISTOFALO V. J., GERHARD G. S., PIGNOLO R. J., 1994. *Molecular biology of aging*. Surgical Clin. N. Am. 74, 1–21.
- CUTLER R. G., 1984. *Antioxidants and longevity*. Free Radical in Mol. Biol., Aging and Disease 239–266.
- CUTLER R. G., 1991. *Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging*. Arch. Gerontol. Geriatr. 12, 75–98.
- DANNER D. B., 1992. *The proliferation theory of Rejuvenation*. Mech. Ageing Dev. 65, 85–107.

- DE LANGE T., 1992. *Human telomeres are attached to the nuclear matrix*. EMBO J. 11, 717-724.
- DE LANGE T., 1994. *Activation of telomerase in a human tumor*. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 2882-2885.
- DRESCHER-LINCOLN C. K., SMITH J. R., 1983. *Inhibition of DNA synthesis in proliferating human diploid fibroblasts by fusion with senescent cytoplasm*. Exp. Cell Res. 144, 445-462.
- DRESCHER-LINCOLN C. K., SMITH J. R., 1984. *Inhibition of DNA synthesis in senescent-proliferating human cybrids is mediated by endogenous proteins*. Exp. Cell Res. 153, 208-217.
- EMANUEL N. M., 1976. *Free radicals and the action of inhibitors of radical processes under pathological states and aging in living organisms and man*. Q. Rev. Biophys. 9, 283-308.
- FARAGHER R. G. A., KILL I. R., HUNTER J. A. A., POPE F. M., TANNOCK C., SHALL S., 1993. *The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 12030-12034.
- GAFNI A., 1990. *Altered protein metabolism in aging*. Annu. Rev. Gerontol. Geriatr. 10, 117-131.
- GARLICK R. L., BUNN H. F., SPIRO R. G., 1988. *Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources*. Diabetes 37, 1144-1150.
- GONOS E. S., POWELL A. J., JAT P. S., 1992. *Human and rodent fibroblast: Model systems for studying senescence and immortalisation*. Inter. J. Oncol. 1, 209-213.
- GREIDER C. W., BLACKBURN, 1985. *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell 43, 405-413.
- GUALANDI F., MORELLI C., PAVAN J. V., RIMESSI P., SENSI A., BONFATTI A., GRUPPIONI R., POSSATI L., STANBRIDGE E. J., BARBANTI-BRODANO G., 1994. *Induction of senescence and control of tumorigenicity in BK virus transformed mouse cells by human chromosome 6*. Genes Chromosom. Cancer 10, 77-84.
- HARLEY C. B., 1991. *Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?* Mutation Res. 256, 271-282.
- HARMAN D., 1956. *A theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11, 298-300.
- HARMAN D., 1972. *The biologic clock: the mitochondria?* J. Am. Geriatr. Soc. 20, 145-147.
- HARMAN D., 1978. *Free radical theory of aging: nutritional implications*. Age 1, 145-152.
- HARMAN D., 1992. *Role of free radicals in aging and disease*. Ann. New York Acad. Sci. 673, 126-141.
- HART R. W., SETLOW R. B., 1974. *Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and life-span in a number of mammalian species*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2169-2173.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp. Cell. Res. 25, 585-621.
- HAYFLICK L., 1980. *Cell aging*. Ann. Rev. Gerontol. Geriatr. 1, 26-27.
- HAYFLICK L., 1985. *Theories of biological aging*. Exp. Gerontol. 20, 145-159.
- HAYFLICK L., 1989. *Antecedents of cell aging research*. Exp. Gerontol. 24, 355-365.
- HAYFLICK L., 1991. *Aging under glass*. Mutation res. 256, 69-80.
- HENSLEY P. J., ANNAB L. A., BARRETT J. C., PEREIRA-SMITH O. M., 1994. *A gene involved in control of human cellular senescence on human chromosome 1q*. Molec. Cell. Biol. 14, 2291-2297.
- HOSOKAWA H., ISHII N., ISHIDA H., ICHIMORI K., NAKAZAWA H., SUZUKI K., 1994. *Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant mev-1 of Caenorhabditis elegans*. Mech. Ageing. Dev. 74, 161-170.
- KANUNGO M. S., 1980. *Theories of aging*. w Biochemistry of ageing. Acad. Press Inc. London 242-275.
- KIPLING D., COOKE H. J., 1990. *Hypervariable ultra-long telomeres in mice*. Nature 346, 400-402.
- KIRKLAND J. L., (1989) *Evolution and ageing*. Genome. 31, 398-405.
- KIRKLAND J. L., 1992. *The biochemistry of mammalian senescence*. Clin. Biochem. 25, 61-75.
- KIRKWOOD T. B. L., 1977. *Evolution of ageing*. Nature 270, 301-304.
- KLOEK G., RIDGEL G., RALLIN D., 1976. *Survivorship and life expectancy of Drosophila melanogaster populations in abnormal oxygen-normal pressure regimes*. Aviat. Space Environ. Med. 47, 1174-1176.
- KRISTAL B. C., YU B. P., 1992. *An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions*. J. Gerontol. 47, B107-B114.
- LAMB M. J., 1965. *The effects of X-irradiation on the longevity of triploid and diploid female Drosophila melanogaster*. Exp. Gerontol. 1, 181-187.
- LE DOUX S. P., WILSON K., BOHR V. A., 1992. *Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells*. Carcin. 13, 1967-1973.
- LEE A. T., CERAMI A., 1992. *Role of glycation in aging*. Ann. New York Acad. Sci. 663, 63-71.
- LEE H. C., PANG C. Y., HSU H. S., WEI Y. H., 1994. *Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing*. Biochem. Biophys. Acta 1226, 37-43.

- LEZZA A. M. S., BOFFOLI D., SCACCO S., CANTATORE P., GADALETA M. N., 1994. *Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 205, 772-779.
- LINDROP P. J., ROTHBLAT J., 1961. *Long term effects of a single whole-body exposure of mice to ionizing radiation*. *Proc. R. Soc. London B.* 154, 332-368.
- LUCKINBILL L. S., 1993. *Prospective and retrospective tests of evolutionary theories of senescence*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 16, 17-32.
- LUMPKIN C. K. J., MCCLUNG J. K., PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R., 1986. *Existence of high abundance antiproliferative mRNA's in senescent human diploid fibroblasts*. *Science* 232, 393-395.
- LUNDBLAD V., SZOSTAK J.W., 1989. *A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast*. *Cell* 57, 633-643.
- LYNN W. S., WALLWORK J. C., 1992. *Does food restriction retard aging by reducing metabolic rate?* *J. Nutr.* 122, 1917-1918.
- MARTINEZ D. E., LEVINTON J. S., 1992. *Asexual metazoans undergo senescence*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9920-9923.
- MASORO E. J., 1992. *Retardation of aging processes by nutritional means*. *Ann. New York Acad. Sci.* 673, 29-35.
- MCCARTER R., MASORO E. J., YU B. P., 1985. *Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate?* *Am. J. Physiol.* 248, E488-E490.
- MEDAWAR P. B., 1957. *The uniqueness of the individual*. Basic Books, New York 17-70.
- MIQUEL J., LUNDGREN P. R., BENSCHE K. G., 1975. *Effects of oxygen-nitrogen (1:1) at 760 Torr on the life span and fine structure of Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing. Dev.* 4, 41-57.
- MIQUEL J., ECONOMOS A. C., 1979. *Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of Drosophila and mice*. *Exp. Gerontol.* 14, 279-285.
- MIQUEL J., ECONOMOS A. C., FLEMING J., JOHNSON J. E., 1980. *Mitochondrial role in cell aging*. *Exp. Gerontol.* 15, 575-591.
- MIQUEL J., 1992. *An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging*. *Mutation Res.* 275, 209-216.
- MÜNSCHER C., MÜLLER-HÖCKER J., KADENBACH B., 1993. *Human aging is associated with various point mutations in tRNA genes of mitochondrial DNA*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 1099-1104.
- MURANO S., THWEATT R., SHMOOKLER REIS R. J., JONES R.A., MOERMAN E. J., GOLDSTEIN S., 1991. *Diverse gene sequences are overexpressed in Werner syndrome fibroblast undergoing premature replicative senescence*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3905-3914.
- NOHL H., 1993. *Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence*. *British Med. Bull.* 49, 653-667.
- NORWOOD T. H., PENDERGRASS W. R., SAULEWICZ A., HANAOKA F., 1992. *A somatic genetic approach to the analysis of senescence in human diploid fibroblasts in vitro: from heterocarions to molecules*. *Exp. Gerontol.* 27, 391-395.
- OBERLEY L. W., OBERLEY T. D., 1988. *Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation*. *Mol. Cell Biochem.* 84, 147-153.
- ODETTI P., PRONZATO M.A., NOBERASCO G., COSSO L., TRAVERSO N., COTTALASO D., MARINARI U.M., 1994. *Relationships between glycation and oxidation related fluorescences in rat collagen during aging*. *Lab. Invest.* 70, 61-67.
- OLOVNIKOV A. M., 1973. *A theory of marginotomy*. *J. Theor. Biol.* 41, 181-190.
- PARTRIDGE L., BARTON N. H., 1993. *Optimality, mutation and the evolution of ageing*. *Nature* 362, 305-311.
- PATHAK S., RISIN S., BROWN N. W., BERRY K., 1994. *Telomeric association of chromosomes is an early manifestation of programmed cell death*. *Int. J. Oncol.* 4, 323-328.
- PEREIRA-SMITH O. M., 1992. *Molecular genetic approaches to the study of cellular aging*. *Exp. Gerontol.* 27, 441-445.
- PEREIRA-SMITH O. M., FISHER S. F., SMITH J. R., 1985. *Senescent and quiescent cell inhibitors of DNA synthesis. Membrane-associated proteins*. *Exp. Cell Res.* 160, 297-306.
- PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R., 1982. *Phenotype of low proliferative potential is dominant in hybrids of normal human fibroblast*. *Som. Cell Genet.* 8, 731-742.
- PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R., 1983. *Evidence for the recessive nature of cellular immortality*. *Science* 221, 964-966.

- PEREZ-CAMPO K., LOPEZ-TORRES M., ROJAS C., CADENAS S., BARJA G., 1994. *Longevity and antioksidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study*. J. Comp. Physiol. B. 163, 682-689.
- PRYOR W. A., 1987. *The free-radical theory of aging revisited: a critique and a suggested disease-specific theory*. Modern Biol. Theories Aging. 89-111.
- RIABOWL K. T., 1992. *Transcription factor activity during cellular aging of human diploid fibroblasts*. Biochem. Cell. Biol. 70, 1064-1072.
- RIABOWL K. T., DRAETTA G., BRIZNELA L., VANDRE D., BEACH D., 1989. *The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells*. Cell 57, 393-401.
- RIABOWL K. T., VOSATKA R. J., ZIFF E. B., LAMB N. J., FERAMISCO J. R., 1988. *Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblasts cells*. Mol. Cell Biol. 8, 1670-1676.
- RICHTER C., 1988. *Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?* FEBS Lett. 241, 1-5.
- SABBIONI S., NEGRINI M., POSSATI L., BONFATTI A., CORALLINI A., SENSI A., STANBRIDGE E. J., BARBANTI-BRODANO G., 1994. *Multiple loci on human chromosome 11 control tumorigenicity of BK virus transformed cells*. Int. J. Cancer 57, 185-191.
- SAGAI M., ICHINOSE T., 1980. *Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene butane and pentane in respired gases of rats*. Life Sci. 7, 731-738.
- SANDHU A. K., HUBBARD K., KAUR G. P., JHAK K., OZER H. L., ATHWAL R. S., 1994. *Senescence of immortal human fibroblasts by the introduction of normal human chromosome 6*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5498-5502.
- SCHNEBEL E. M., GROSSFIELD J., 1988. *Antagonistic pleiotropy: an interspecific Drosophila comparison*. Evolution 42, 306-311.
- SHAY J. W., WERBIN H., 1987. *Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process?* Mut. Res. 186, 149-160.
- SHAY J. W., WERBIN H., 1992. *New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging*. Mutation Res. 275, 227-235.
- SHERWOOD S. W., RUSH D., ELLSWORTH J. L., SCHIMKE R. T., 1988. *Defining cellular senescence in IMR-90 cells: A flow cytometric analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9086-9090.
- SHOJI Y., SATO W., HAYASAKA K., TAKADA G., 1993. *Tissue distribution of mutant mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)* J. Inher. Metab. Dis. 16, 2730.
- SIMONETTI S., CHEN X., DIMAURO S., SHON E. A., 1992. *Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR*. Biochem. Biophys. Acta 1180, 113-122.
- SMITH J. R., PEREIRA-SMITH O. M., 1989. *Further studies on the genetic and biochemical basis of cellular senescence*. Exp. Gerontol. 24, 377-381.
- SPENCER R. P., 1993. *Life prolongation with dietary restriction: protection of genome nad core metabolism and the role of glycosylation*. Med. Hyp. 40, 102-104.
- STEIN G. H., 1989. *Inhibitors of DNA synthesis in senescent and quiescent human diploid fibroblasts. w Growth control during cell aging*. CRC Press 137-147.
- STREHLER B. L., 1977. *Time, cells and aging*. Acad. Press. New York;
- SWAMY M. S., ABRAHAM E. C., 1987. *Lens protein composition, glycation and high molecular weight aggregation in aging rats*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28, 1693-1701.
- SZILARD L., 1959. *On the nature of aging process*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 30-45.
- UPTON A. C., 1957. *Ionizing radiation and the aging process: A review*. J. Gerontol. 12, 306-313.
- VLAASARA H., BUCALA R., STRIKER L., 1994. *Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging*. Lab. Invest. 70, 138-151.
- WEI Y. H., 1992. *Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events*. Mutation Res 275, 145-155.
- WEIRICH-SCHWEIGER H., WEIRICH H. G., GRUBER B., SCHWEIGER M., HIRSCH-KAUFFMANN M., 1994. *Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes*. Mut. Res. 316, 37-48.
- WILLIAMS G. C., 1957. *Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence*. Evolution 11, 398-411.
- WRIGHT W. E., SHAY J. W., 1992. *The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization*. Exp. Gerontol. 27, 383-389.
- YANG J. H., LEE H. C., LIN K. J., WEI Y. H., 1994. *A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin*. Arch. Dermatol. Res. 286, 386-390.
- YU B. P., 1987. *Update on food restriction and aging*. Rev. Biolog. Res. Aging. 3, 495-505.