

GRZEGORZ BARTOSZ

*Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, WSP,
Rejtana 16C, 35-310 Rzeszów,
Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego,
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
e-mail: gbartosz@biol.uni.lodz.pl*

TLEN A STARZENIE SIĘ

WOLNORODNIKOWA TEORIA STARZENIA SIĘ

Wiele teorii usiłuje wyjaśnić przyczyny starzenia się komórek i organizmów. Jedną z najbardziej popularnych obecnie jest teoria wolnorodnikowa. Teoria ta, sformułowana w latach pięćdziesiątych przez DENHAMA HARMANA (1956), postulowała, że — podobnie jak w przypadku uszkodzeń obiektów biologicznych przez promieniowanie jonizujące — pierwotną przyczyną zmian starczych są reakcje wolnych rodników powstających w organizmach żywych jako nieuniknione, lecz niebezpieczne produkty pośrednie przemian metabolicznych. W tym czasie właśnie wykryto występowanie wolnych rodników w organizmach żywych (COMMONER i współaut. 1954), jednak znaczącym argumentem na poparcie wolnorodnikowej teorii starzenia się stało się dopiero stwierdzenie powszechnego wytwarzania w komórkach aerobowych reaktywnych form tlenu (RFT), zapoczątkowane odkryciem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (McCORD i FRIDOVICH 1969). Dalsze badania wykazały istnienie w komórkach aerobowych wielu źródeł RFT, spośród których najistotniejszym dla większości komórek jest mitochon-

drialny proces oddychania. Redukcja cząsteczki tlenu w tym procesie nie przebiega bowiem całkowicie czteroelektronowo; pewna część tlenu (szacowana przez różnych autorów na 1–5%) jest zredukowana jednoelektronowo wytwarzając anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, a w następstwie jego dysmutacji także nadtlenek wodoru. Można wyliczyć, że typowa komórka człowieka metabolizuje w ciągu doby około 10^{12} cząsteczek tlenu wytwarzając około 3×10^9 cząsteczek H_2O_2 w ciągu godziny (MARTIN i współaut. 1996). Źródłem RFT są też między innymi procesy utleniania cukrów i glikozylowanych białek. Dalsze reakcje anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru mogą prowadzić do powstania bardzo szybko i niespecyficznie reagującego rodnika wodorotlenowego $\bullet OH$, a także innych niespecyficznymi oksydantów, między innymi nadtlenuoazotynu $ONOO^-$ i podchlorynu OCl^- . Reakcje RFT prowadzą do uszkodzenia makrocząsteczek, między innymi białek i kwasów nukleinowych, co — w myśl teorii wolnorodnikowej — może być molekularnym podłożem procesu starzenia się.

AKUMULACJA USZKODZEŃ OKSYDACYJNYCH

Ciągle wytwarzanie RFT w komórkach aerobowych oznacza narażenie składników komórek na nieustanny atak tych czynników. Liczba oksydacyjnych uszkodzeń DNA w przeciętnej komórce człowieka oceniana jest na około 10000 w ciągu doby (AMES i współaut. 1993). Większość z tych uszkodzeń ulega naprawie, jednak część akumuluje się. Wiele badań wykazało gromadzenie się produktów oksydacyjnych uszkodzeń DNA, białek i lipidów w tkankach

wraz z wiekiem. Oksydacyjne uszkodzenia gromadzą się dużo szybciej w mitochondrialnym niż w jądrowym DNA, co jest skutkiem lokalizacji mitochondrialnego DNA w bezpośredniej bliskości głównego źródła RFT w komórce, brakiem ochrony tego DNA przez histony i ograniczonymi możliwościami naprawy jego uszkodzeń (JOHNS 1995). Poziom 8-hydroksydeoksygwanozyny w mitochondrialnym DNA jest około 16 razy wyższy niż w DNA jądrowym

(RICHTER i współaut. 1988 oraz artykuł M. JURGOWIAKA i R. OLIŃSKIEGO w tym numerze KOSMOSU).

Szybkość wydalania gazowych produktów peroksydacji lipidów, takich jak etan czy *n*-pentan, wzrasta wraz z wiekiem (SOHAL i WEINDRUCH 1996). Spośród wielu rodzajów uszkodzeń oksydacyjnych białek najczęstszym obiektem badań jest zawartość grup karbonylowych, powstających głównie w wyniku oksydacyjnej dezaminacji. Wzrost zawartości grup karbonylowych wraz z wiekiem zwierząt doświadczalnych i ludzi stwierdzono w różnych tkankach, między innymi erytrocytach i fibroblastach (OLIVER i współaut. 1987), hepatocytach (STARKE-REED i OLIVER 1989), soczewce oka (GARLAND i współaut. 1988) i mózgu (SMITH i współaut. 1991). Obserwowano go także podczas starzenia się, komórek *in vitro*; stwierdzono przy tym, że szybkość akumulacji oksydacyjnych uszkodzeń białek jest wyższa w fibroblastach osób dotkniętych zespołami przyspieszonego starzenia, się takimi jak zespół Wernera czy Hutchinsona-Gilforda (OLIVER i współaut. 1987). Oksydacyjne uszkodzenia białek zwykle prowadzą do inaktywacji cząsteczek i gromadzenia się nieaktywnych białek w komórkach. Proces ten zachodzi, mimo iż w komórkach obecne są proteazy trawiące w znacznym stopniu wybiórczo białka uszkodzone oksydacyjnie. W hepatocytach młodych szczurów oksydacyjnie zainaktywowane formy syntetazy glutaminianowej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej stanowią około 10% całości tych białek enzymatycznych, podczas gdy w hepatocytach starych szczurów około 25–40% (STADTMAN i

współaut. 1992). Oksydatywne uszkodzenia białek zachodzą w znacznym stopniu selektywnie (różne białka są w różnym stopniu podatne na te uszkodzenia). Głównymi białkami mitochondriów muchy domowej wykazującymi znaczny wzrost liczby grup karbonylowych w procesie starzenia się owadów są: akonitaza (YAN i współaut. 1997) i translokaza nukleotydów adenylowych (YAN i SOHAL 1998). Szereg badań wskazuje na wzrost szybkości gromadzenia się uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach starych zwierząt; wykres zależności poziomu tych uszkodzeń od wieku bardziej zbliżony jest do funkcji wykładniczej niż liniowej (AGARWAL i SOHAL 1994).

W komórkach różnych zwierząt nie ulegających podziałom wraz z wiekiem gromadzi się starczy barwnik — lipofuscyna. Znajduje się on w „granulach lipofuscynowych” (ciałach rezerwowych czyli niefunkcjonalnych lizosomach) i zawiera składniki zarówno lipidowe, jak i białkowe. Pobudzona światłem niebieskim lub promieniowaniem nadfioletowym lipofuscyna fluoreskuje w kolorze żółtym. Jej widmo fluorescencji jest charakterystyczne dla związków typu zasad Schiffa. Lipofuscyna powstaje, jak się uważa, w wyniku reakcji pomiędzy grupami aminowymi białek a aldehydowymi produktami peroksydacji lipidów. Powstawanie lipofuscyny w komórkach hodowanych *in vitro* wzmacnia się w wyniku działania czynników utleniających (jony Fe^{3+}), a zmniejsza przy zmniejszeniu ciśnienia parcjalnego tlenu. Powstawanie „starczego barwnika” *in vivo* jest również skutkiem uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek (MARZABADI i współaut. 1992).

TEORIA „TEMPA ŻYCIA”

W 1908 roku Max Rubner zwrócił uwagę na odwrotną relację pomiędzy długością życia kilku gatunków ssaków a ilością energii zużywanej w ciągu życia przez te zwierzęta w ramach podstawowej przemiany metabolicznej, w przeliczeniu na gram masy ciała. W oparciu o tę obserwację sformułowana została hipoteza „tempa życia” (ang. rate of living) postulująca istnienie stałej ilości energii, jaką mogą zużytkować w ciągu życia różne ssaki w przeliczeniu na jednostkę masy ciała (Tabela 1); gatunki o intensywniejszym metabolizmie zużywają ją szybciej i żyją krócej (PEARL 1928). Do reguły tej stosuje się większość gatunków ssaków o bardzo różnej maksymalnej długości życia, od 3–4 lat (mysz) do 70 lat (słoń); wartość tempa przemiany podstawowej wszystkich tych zwierząt pomnożona przez maksymalną długość ich ży-

cia i podzielona przez masę ciała daje wartość około 800–900 kJ/g. Na gruncie wolnorodnikowej teorii starzenia się prawidłowość ta jest interpretowana w terminach uszkodzeń składników komórek przez RFT, tworzone jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego, w podobnej proporcji w stosunku do zużywanego tlenu (i uwalnianej energii) u różnych organizmów. Stała ilość energii, jaka może być zużyta na jednostkę masy ciała oznacza podobny poziom uszkodzeń składników różnych organizmów przez RFT, jakie zgromadzą się na przestrzeni życia, we wszystkich lub w krytycznych komórkach ciała. Szersze porównania wykazały, że reguła Rubnera nie obowiązuje wszystkich zwierząt stałocieplnych; naczelne zużywają w ciągu życia więcej energii (w przeliczeniu na jednostkę masy ciała) niż inne ssaki (około

2040 kJ/g), a lemur, kapucynka i człowiek — jeszcze więcej (3110, 3370 i 3410 kJ/g) (CUTLER 1976). Podobnie, zużycie energii na jednostkę masy ciała jest wyższe u ptaków niż u ssaków. Również i te prawidłowości dają się wytłumaczyć na gruncie wolnorodnikowej teorii starzenia się: uwalnianie RFT przez mitochondria jest niższe w tkankach ptaków niż ssaków (KU i SOHAL 1993, SASTRE i współaut. 1996), a szybkość uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru przez mitochondria ssaków różnych gatunków jest tym niższa, im dłużej żyją osobniki badanego gatunku (SOHAL i współaut. 1989, 1990b). W szczególności, zna-

Tabela 1. Ilość energii odpowiadająca przemianie podstawowej wytworzona w ciągu życia różnych gatunków ssaków i niektórych innych grup zwierząt.

Gatunek ssaka	Energia [kJ/g masy ciała]	Źródło
Koń	686	(RUBNER 1908)
Krowa	591	(RUBNER 1908)
Pies	687	(RUBNER 1908)
Kot	937	(RUBNER 1908)
Świnka morska	1109	(RUBNER 1908)
Średnia dla tych ssaków	802	
Ssaki naczelne	2040	(CUTLER 1976)
Człowiek	3040	(RUBNER 1908)
Ptaki	6730	(SOHAL i WEINDRUCH 1996)
Owady: muchówki	105	(SOHAL i WEINDRUCH 1996)

cznie większa długość życia (ok. 8 lat) *Peromyscus leucopus*, gryzonia o porównywalnych rozmiarach i biologii podobnej do myszy domowej *Mus musculus* (żyjącej nie dłużej niż 4 lata) można przypisać niższej szybkości wytwarzania RFT w mitochondriach *P. leucopus* (odpowiednio o 40% i 80% w mitochondriach serca i mózgu). Krócej żyjąca mysz domowa wykazuje też wyższy o 80% w porównaniu z *Peromyscus*

poziom grup karbonylowych w białkach mózgu (SOHAL i współaut. 1993). Porównanie zawartości dwu homologów ubichinonu różniących się liczbą reszt izoprenowych, CoQ₉ i CoQ₁₀ u dziewięciu gatunków ssaków o różnej długości życia wykazało, że w miarę zwiększania się długości życia w mitochondriach serc tych ssaków maleje zawartość CoQ₉, a zwiększa się zawartość CoQ₁₀. Nie jest jednak jasne, czy zmiana proporcji obu form ubichinonu jest odpowiedzialna za obniżenie szybkości wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach ssaków żyjących dłużej (LASS i współaut. 1997).

Znaleziono ujemną korelację pomiędzy długością życia ssaków a całkowitą zawartością cytochromu P-450, innego istotnego źródła RFT, w wątrobie osobników tych gatunków ssaków (CUTLER 1985, AYALA i CUTLER 1997). Mniejsza szybkość wytwarzania RFT winna oznaczać wolniejsze gromadzenie się uszkodzeń makrocząstek; istotnie, stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy długością życia a zawartością jednego z głównych produktów oksydacyjnego uszkodzenia DNA, 8-hydroksydeoksygwanozyny w wątrobie ssaków (CUTLER 1991).

Zgodnie z koncepcją „tempa życia”, długość życia muchy domowej *Musca domestica* można zwiększyć dwukrotnie, jeśli uniemożliwi się owadom lot (zużywający bardzo dużo energii) (SOHAL i BRUNK 1992).

W myśl przewidywań wolnorodnikowej teorii starzenia się, długość życia muszki owocowej jest mniejsza, jeśli jest ona hodowana w atmosferze o podwyższonej zawartości tlenu (MIQUEL i współaut. 1975, BARET i współaut. 1994). Mucha domowa żyje krócej w temperaturze 28°C, niż w temperaturze 20°C. Wytwarzanie RFT przez mitochondria muchy jest wyższe w temperaturze 28°C, natomiast aktywność SOD jest podobna, a aktywność katalazy niższa u owadów żyjących w wyższej temperaturze. Skrócenie długości życia a wyższych temperaturach może więc mieć u podłoża stres oksydacyjny (FARMER i SOHAL 1987).

CZY W MIARĘ STARZENIA SIĘ NASILA SIĘ STRES OKSYDACYJNY?

Niebył precyzyjnie zdefiniowane pojęcie stresu oksydacyjnego oznacza zaburzenie równowagi pomiędzy induktorami reakcji niekontrolowanego utleniania a przeciwdziałającymi im antyoksydantami i enzymami antyoksydacyjnymi (SIES 1991). Jeśli reakcje RFT miałyby być przyczyną starzenia się, należałoby oczekiwać ich nasilania się wraz z wiekiem; tłuma-

czyłoby to zwiększanie się tempa gromadzenia się uszkodzeń oksydacyjnych.

O nasilaniu się stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się mogłoby decydować osłabienie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i spadek aktywności antyoksydantów lub wzrost tempa wytwarzania RFT.

Liczne badania nie potwierdziły tezy, że stężenia antyoksydantów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych obniżają się wraz z wiekiem (ARTUR i współaut. 1982). Zmiany tych parametrów są zróżnicowane i często przebiegają odmiennie w różnych tkankach jednego organizmu (RIKANS i HORNBROOK 1997). Wprawdzie donoszono, że potencjały redoks głównych układów utleniająco/redukujących komórek ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, NADH/NAD^+ , glutation utleniony/glutation zredukowany) wzrastają (SOHAL i WEINDRUCH 1996) oraz, że wydajność indukcji oksydacyjnych uszkodzeń białek przez promieniowanie jonizujące (co jest miarą całkowitej „zdolności antyoksydacyjnej”) wzrasta w tkankach starych zwierząt (AGARWAL i SOHAL 1996), jednak danych tych jest ciągle zbyt mało, by pozwalały na szersze uogólnienia.

Wiadomo natomiast, że szybkość wytwarzania O_2^\bullet i H_2O_2 przez mitochondria wzrasta wraz z wiekiem (SOHAL i BRUNK 1992). Szybkość wytwarzania O_2^\bullet przez mitochondria muchy domowej *M. domestica* wzrasta 2,3-krotnie pomiędzy ósmym a piętnastym dniem życia *imago* (FARMER i SOHAL 1989) i jest wyższa odpowiednio o 67% w wątrobie, o 125% w sercu i o 49% w mózgu 18-miesięcznych szczurów w porównaniu z 3-miesięcznymi (SOHAL i współaut. 1990a). Przyczyną tego zjawiska może być za-

chodzący w procesie starzenia się spadek aktywności oksydazy cytochromowej. Jeśli aktywność tego enzymu jest ogniwem limitującym szybkość działania łańcucha oddechowego, to spadek jego aktywności sprzyja zwiększeniu wytwarzania RFT wskutek spowolnionego przekazywania elektronów na tlen przez ten enzym. Argumentem za słusznością tego poglądu wydaje się być zależność pomiędzy długością życia różnych muchówek a aktywnością oksydazy cytochromowej w tkankach tych owadów (SOHAL i współaut. 1995b).

Dane te wydają się wskazywać na występowanie i nasilanie się stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się organizmu. Należy jednak wziąć pod uwagę, że wniosek taki nasuwa się na podstawie zestawienia fragmentarycznych badań różnych obiektów cechujących się znacznym stopniem zmienności. Szereg badań dokumentuje wzrost zawartości antyoksydantów i aktywności niektórych enzymów antyoksydacyjnych w tkankach zwierząt doświadczalnych wraz z wiekiem (FIEBIG i współaut. 1996). Rzadko mamy do czynienia z równoczesnymi badaniami wytwarzania RFT i efektywności mechanizmów antyoksydacyjnych w tym samym materiale; dopiero większa ilość badań tego typu pozwoli na sformułowanie wiarygodnych uogólnień.

POZIOM ENDOGENNYCH ANTYOKSYDANTÓW A DŁUGOŚĆ ŻYCIA

Porównawcze badania w laboratorium Cutlera wskazały na odwrotną zależność pomiędzy szybkością „samoutleniania” (ta nieco myląca nazwa oznacza po prostu utlenianie przez obecny w układzie tlen) homogenatów mózgu różnych ssaków a długością życia ssaków. Późniejsze badania pozwoliły na stwierdzenie analogicznej zależności pomiędzy podatnością na utlenianie homogenatów mózgu i serca ssaków a długością ich życia (AGARWAL i SOHAL 1996). Stosowana metoda laboratoryjnie ocenia w istocie „całkowitą zdolność antyoksydacyjną” tkanek ssaków, czyli zdolność tkanek do przeciwdziałania reakcjom niekontrolowanego utleniania wywołanym przez czynniki zewnętrzne. Analogiczne zależności zostały stwierdzone pomiędzy długością życia a stężeniem bądź aktywnością poszczególnych antyoksydantów i enzymów antyoksydacyjnych. Znalezione dodatnią korelację pomiędzy długością życia różnych gatunków ssaków a aktywnością SOD w mózgu i wątrobie, stężeniami — tokoferolu, karotenoidów i retinolu w osoczu oraz askorbinianu w wątrobie i mózgu (choć zależność pomiędzy stężeniem askorbinianu w niektórych tkankach a

długością życia okazała się odwrotna) (CUTLER 1984a, 1984b, 1985, 1986). Znaczenie tych stwierdzeń wydaje się jednak problematyczne w świetle wykazania ujemnej korelacji pomiędzy długością życia ssaków a aktywnością takich enzymów antyoksydacyjnych jak katalaza i peroksydaza glutationowa oraz stężeniem glutationu w ich tkankach (CUTLER 1985). Zdaniem Cutlera, istnieją „dobre” i „złe” antyoksydanty. Te „dobre” sprzyjają długowieczności gatunku, „złe” niekoniecznie. W toku ewolucji Naczelnych niektóre ze „złych” antyoksydantów zostały zastąpione przez „dobre”: miała miejsce utrata zdolności biosyntezy askorbinianu, natomiast stężenie kwasu moczowego w osoczu krwi uległo podwyższeniu (CUTLER 1984a, 1984b). Czyżby jednak glutation, główny antyoksydant wewnątrzkomórkowy, miałby być „złym antyoksydantem”?

Co więcej, badania prowadzone przez zespół Barji wskazały na odwrotną zależność pomiędzy długością życia różnych gatunków kręgowców (płazów, ssaków i ptaków) a stężeniem glutationu i askorbinianu oraz aktywnościami SOD, katalazy, peroksydazy glutationowej i redukta-

zy glutationowej w płucach zwierząt. Autorzy ci również interpretują swoje stwierdzenie na gruncie wolnorodnikowej teorii starzenia się, uważając, że zasadniczym parametrem determinującym długość życia zwierząt jest tempo wytwarzania RFT, a poziom antyoksydantów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest tylko wynikiem odpowiedzi adaptacyjnej na generację RFT. Niskie tempo wytwarzania RFT u osobników gatunków długo żyjących winno więc indukować niski poziom stężeń czy aktywności elementów obrony antyoksydacyjnej (PÉREZ-CAMPO i współaut. 1994).

Inna sugestia oparta na danych porównawczych dotyczy ewolucyjnego wyboru mniej niebezpiecznych mechanizmów detoksykacyjnych przez gatunki żyjące dłużej. Epoksydy ksenobiotyków powstające w fazie I detoksykacji mogą być sprzęgane z glutationem przez S-transferazę glutationową, bądź zredukowane do *trans*-dioli przez hydrolazę epoksydów. Ta pierwsza droga detoksykacji jest mniej bezpieczna, bowiem zużywając glutation przyczynia się do obniżenia zdolności antyoksydacyjnej komórek. Porównanie aktywności obu enzymów w wątrobie ssaków o różnej długości życia wykazało słabą ujemną korelację aktywności S-transferazy glutationowej, a wyraźną dodatnią korelację aktywności hydrolazy epoksydów z długością życia ssaków różnych gatunków (AYALA i CUTLER 1997).

Wcześniejsze badania wykazały, że transgeniczne muszki owocowe *Drosophila melanogaster* cechujące się nadekspresją SOD (REVEILLAUD i współaut. 1992) lub katalazy (ORR i SOHAL 1992) są bardziej odporne na stres oksydacyjny, lecz długość ich życia nie ulega znaczącemu wydłużeniu (choć w przypadku SOD stwierdzono zwiększenie długości życia o około 10%) (REVEILLAUD i współaut. 1991). Natomiast muszki, których genom został wzbogacony o dodatkowe kopie genów zarówno SOD, jak i katalazy, co zwiększa aktywność obu enzymów o około 30%, żyją dłużej, gromadzą mniej oksydacyjnych uszkodzeń DNA (8-hydroksydeoksyguanozyny), a wolniej tracą aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (SOHAL i współaut. 1995a) mimo, iż w ciągu życia zużywają o 30% więcej tlenu niż muszki kontrolne. Do wyników tych doświadczeń wysuwano jednak szereg zastrzeżeń. Maksymalna długość życia owadów wykazujących nadekspresję SOD i katalazy nie jest wyższa w porównaniu z dzikimi muszkami (szczep wyjściowy, używany do manipulacji genetycznych, miał mniejszą długością życia w stosunku do dzikich muszek). Fakt, że spośród 15 linii muszek wykazujących nade-

kspresję enzymów ochronnych uzyskanych w tych badaniach tylko osiem cechowało się większą długością życia, sześć niezmienioną, a jedna linia zmniejszoną długością życia świadczy, że zależność pomiędzy zwiększoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych a długością życia niekoniecznie jest jednoznaczna. Ostatnie prace wskazują jednak na zwiększenie długości życia muszki owocowej w wyniku nadekspresji samej SOD. Muszki, zawierające gen *Cu,ZnSOD* człowieka, eksprymowany u *imagines* w neuronach motorycznych, żyły o około 10% dłużej niż szczep wyjściowy (PARKES i współaut. 1998). Inne doświadczenia wykazały wydłużenie życia *D. melanogaster* (średniej długości życia o 48%) w wyniku nadekspresji *Cu,ZnSOD*, podczas gdy nadekspresja katalazy nie miała wpływu na długość życia owadów (SUN i TOWER 1999).

Na związek pomiędzy aktywnościami enzymów antyoksydacyjnych (zwłaszcza SOD) a długością życia wskazują także wyniki badań innych organizmów. Mutant *age-1* nicienia *Caenorhabditis elegans*, którego średnia długość życia jest zwiększona o 75%, a maksymalna długość życia o 110% (FRIEDMAN i JOHNSON 1988, JOHNSON 1990), cechuje się podwyższeniem aktywności SOD i katalazy, a obniżeniem tempa akumulacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Gen *age-1* nie koduje wprawdzie żadnego enzymu antyoksydacyjnego, jest jednak położony na chromosomie II nicienia, w bezpośredniej bliskości genu *sod-1* (LARSEN 1993). Być może więc zachodzi współindukcja genu *sod-1*. Mutanty *age-1* cechują się jednak także podwyższeniem tempa metabolizmu tlenowego; nie można więc wykluczyć, że przyrosty aktywności SOD i katalazy są jedynie odpowiedzią adaptacyjną na zwiększenie tempa wytwarzania RFT (LITHGOW 1996).

Dane dotyczące wpływu braku obniżenia poziomu endogennych antyoksydantów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych są zróżnicowane. Transgeniczne myszy pozbawione mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) żyją krócej (LEBOVITZ i współaut. 1996). Mutacje prowadzące do znacznego obniżenia lub nawet zupełnego braku aktywności katalazy nie mają wpływu na długość życia *D. melanogaster* (ORR i współaut. 1992), natomiast muszki o obniżonym poziomie istotnego antyoksydanta, kwasu moczowego, żyją krócej (HILLIKER i współaut. 1992). Badania prowadzone przez zespół Bilińskiego dotyczące genetycznego starzenia się drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wskazują na znaczne zmniejszenie liczby podziałów, do jakiej zdolne są komórki drożdży pozbawione dysmutaz ponadtlenko-

wych, w porównaniu do szczepów wyjściowych. Brak katalazy nie powoduje podobnych następstw (WAWRYN i współaut. 1997); interesują-

ce, że te wyniki odpowiadają wynikom doświadczeń nad muszką owocową.

WPLYW EGZOGENNYCH ANTYOKSYDANTÓW NA DŁUGOŚĆ ŻYCIA

Doświadczalnym dowodem słuszności teorii wolnorodnikowej winna być, jak się wydaje, możliwość interwencji w proces starzenia się poprzez podawanie antyoksydantów. Donoszono o zwiększeniu długości życia bezkręgowców poprzez podawanie przeciwutleniaczy. Podawanie prekursora cysteiny przeciwdziało spadkowi zawartości glutationu i przedłużało życie komarów (RICHIE i współaut. 1987), a podawanie N-acetylocysteiny zwiększało długość życia *D. melanogaster* (BRACK i współaut. 1997). Nie osiągnięto jednak takich sukcesów w przypadku ssaków. Podawanie stosunkowo dużych dawek antyoksydantów powodowało umiarkowane zwiększenie średniej długości życia zwierząt, lecz nie wpływało w sposób znaczący na maksymalną długość życia (HARMAN 1968, CUTLER 1984a). Wynik ten tłumaczono w sposób następujący: organizm wykazuje zdolność utrzymywania równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej. Długotrwałe podawanie egzogennych

antyoksydantów powoduje adaptacyjne obniżenie produkcji endogennych antyoksydantów, wskutek czego osiągnięcie zamierzonego efektu podwyższenia całkowitej puli antyoksydantów nie zostaje osiągnięte (CUTLER 1984a).

Często cytowany jest wynik doświadczenia, w którym podawanie starym myszokoczkom pułapki spinowej, *tert*-butylo- α -fenylnitronu obniżało poziom grup karbonylowych w białkach mózgu, podwyższało aktywności syntetazy glutaminianowej i obojętnej proteinazy i zmniejszało starczą utratę pamięci (CARNEY i współaut. 1991). Trudno jednak powiedzieć, jakie byłyby efekty jeszcze bardziej długotrwałego podawania pułapki spinowej. Poza tym, wyciąganie na podstawie tych obserwacji wniosku, że uszkodzenia oksydacyjne są odpowiedzialne za starczą utratę pamięci nosi znamiona pochopności; taka teza wymagałaby bardziej rygorystycznego uzasadnienia.

RESTRYKCJA KALORYCZNA

Jedynym, jak dotychczas, skutecznym i niekontrowersyjnym sposobem zwiększenia maksymalnej długości życia ssaków (i innych zwierząt) jest restrykcja kaloryczna. Już w latach trzydziestych i czterdziestych wykazano, że ograniczenie ilości pożywienia podawanego myszom i szczurom (nie prowadzące jednak do drastycznego niedożywienia) powoduje zwiększenie maksymalnej długości życia zwierząt do około 30% (McCay i współaut. 1935, 1943). Jeśli szczurom nie ograniczano ilości pożywienia, lecz obniżano masę ich ciała o 40% poprzez zmuszanie do wysiłku fizycznego, średnia długość życia zwierząt ulegała zwiększeniu, lecz procedura ta nie wpływała na maksymalną długość życia szczurów (WEINDRUCH i SOHAL 1997). Analogiczny efekt restrykcji kalorycznej stwierdzano u zwierząt należących do różnych grup systematycznych (ryby, pajaki, rozwielitka, perwotniaki) (SOHAL i WEINDRUCH 1996, WEINDRUCH i SOHAL 1997). Doświadczenia dotyczące wpływu restrykcji kalorycznej na ssaki naczelne są z natury rzeczy dużo bardziej czasochłonne, jednak uzyskane dotychczas wyniki wskazują na to, że fizjologiczne skutki restrykcji kalorycznej (np. obniżenie poziomu glukozy i insuliny we krwi i obniżenie temperatury ciała)

są u tych zwierząt podobne, jak u gryzoni (LANE i współaut. 1996).

Podobne skutki wywołuje również ograniczenie ilości białka w diecie (restrykcja białkowa). O ile propozycje zastosowania restrykcji kalorycznej w odniesieniu do organizmu człowieka spotykają się z dużą rezerwą, o tyle możliwości stosowania alternatywnej restrykcji białkowej (przy zachowaniu pełnowartościowości diety w stosunku do niezbędnych metabolicznych czynników egzogennych) wydają się być bardziej realne (YOUNGMAN i współaut. 1992).

Wolnorodnikowa teoria starzenia się przypisuje wpływ restrykcji kalorycznej na długość życia obniżeniu tempa metabolizmu i tym samym szybkości wytwarzania RFT (SOHAL i WEINDRUCH 1996). Większość badań (choć nie wszystkie) istotnie wykazała obniżenie tempa metabolizmu ssaków w następstwie restrykcji kalorycznej (WEINDRUCH i SOHAL 1997). Istotnie, procedura ta również zmniejsza towarzyszący starzeniu się wzrost szybkości wytwarzania RFT w mitochondriach (SOHAL i WEINDRUCH 1996) i tempo gromadzenia się uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach zwierząt (YOUNGMAN i współaut. 1992). Procedura analogiczna do re-

strykcji kalorycznej, pozwalająca również na wydłużenie życia *imago D. melanogaster* polegająca na hodowaniu larw owadów w dużym zagęszczeniu indukuje transkrypcję szeregu białek o funkcji antyoksydacyjnej (DUDAS i ARKING 1995). Wydaje się jednak, że sprowadzenie skutków restrykcji kalorycznej do jednego tylko aspektu — wolnorodnikowego — byłoby zbyt-
nim uproszczeniem. Z pewnością to drastyczne oddziaływanie na organizm musi powodować całościową adaptację metaboliczną, obejmują-

ca modulację procesów wytwarzania RFT i obrony przed nimi, ale rozciąga się także na wiele rozległych mechanizmów regulacyjnych (między innymi zmiany behawioralne, modyfikacje funkcji układu odpornościowego i zmiany aktywności enzymów w różnych tkankach) (JAŻWINSKI 1996, SOHAL i WEINDRUCH 1996). W szczególności, restrykcja kaloryczna zapobiega rozwojowi schorzeń o charakterze autoimmunologicznym oraz opóźnia występowanie nowotworów (WEINDRUCH i SOHAL 1997).

UWAGI KOŃCOWE

Popularność wolnorodnikowej teorii starzenia się jest w znacznej mierze wynikiem aktualności problematyki roli RFT w fizjologii i patologii. Wydaje się, że skoro RFT są mediatorami uszkodzenia składników organizmu indukowanych przez różnorodne czynniki endogenne i egzogenne, to winny też leżeć u podstaw procesu starzenia się. Teoria wolnorodnikowa jest teorią zakładającą stochastyczny mechanizm starzenia się, zależny od akumulacji uszkodzeń krytycznych składników komórek. Nie stoi ona jednak w sprzeczności z założeniem o genetycznych uwarunkowaniach procesu starzenia się, bowiem zarówno tempo wytwarzania RFT, jak i poziom obrony antyoksydacyjnej są w znacznym stopniu określone przez czynniki genetyczne. Teoria ta jest weryfikowalna doświadczalnie — choć złożoność regulacji metabolicznej sprawia, że wyniki uzyskane dotychczas w doświadczeniach nie poddają się jednoznacznej interpretacji. Przyjmując słuszność wolnorodnikowej teorii starzenia się i opierając się na obecnym stanie wiedzy o naturze procesów wolnorodnikowych w komórkach, w których decydującą rolę odgrywają RFT, można byłoby oczekiwać, że komórki i organizmy nie powinny się starzeć w warunkach anaerobowych. Rozważania takie mają czysto akademicki charakter w odniesieniu do organizmów wyższych, ale są weryfikowalne w przypadku względnych anaerobów, jakimi są na przykład drożdże *S. ce-*

revisiae. Dane doświadczalne nie wskazują na to, by generatywne starzenie się dzikich szczepów *S. cerevisiae* ulegało drastycznemu spowolnieniu w warunkach beztlenowych. Przeciwnie, średnia i maksymalna liczba podziałów ulega nawet obniżeniu (co można wyjaśnić specyficznymi warunkami hodowli beztlenowej). Liczba podziałów szczepów defektywnych względem istotnych elementów obrony antyoksydacyjnej zwiększa się w nieobecności tlenu, lecz szczepy te nie stanowią modelu fizjologicznego sprawnej komórki aerobowej (WAWRYN i współaut. 1997). Z drugiej strony, mutanty *petite S. cerevisiae*, pozbawione funkcjonalnych mitochondriów i tym samym głównego źródła RFT, żyją jednak dłużej (SHAMA i współaut. 1998).

Popularnym morałem wynikającym z wolnorodnikowej teorii starzenia się jest przekonanie o dobroczynnym wpływie zażywania antyoksydantów (zwłaszcza witamin antyoksydacyjnych) na długość życia i sprawność organizmu. Jakkolwiek teza ta nie ma pełnej podbudowy doświadczalnej, z pewnością przyczynia się do lansowania modelu zdrowego życia i zdrowego odżywiania się (przyczyniając się do zmniejszenia zachorowalności na choroby układu krążenia i nowotwory), co należy uznać za sukces wolnorodnikowej teorii starzenia się, niezależnie od tego, jakie światło rzuca na jej słuszność dalsze badania.

OXYGEN AND AGEING

Summary

The free radical theory of ageing is the most popular contemporary theory of ageing of living organisms. In its present-day formulation, it ascribes a critical role in ageing

to reactions of reactive oxygen species. Arguments supporting the free radical theory of ageing are critically reviewed in this paper.

LITERATURA

- AGARWAL S., SOHAL R. S., 1994. *DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 12332-12335.
- AGARWAL S., SOHAL R. S., 1996. *Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species*. Exptl. Gerontol. 31, 387-392.
- AMES B. N., SHIGENAGA M., HAGEN T. M., 1993. *Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7915-7922.
- ARTUR Y., HERBETH B., GUÉMOURI L., LECOMTE E., JEANDEL C., SIEST G., 1982. *Age-related variations of enzymatic defenses against free radicals and peroxides*. [W:] *Free Radicals and Aging*, EMERIT J., CHANCE B. (red.), Basel, Boston, Berlin: Birkhauser, str. 359-367.
- AYALA A., CUTLER R. G., 1997. *Preferential use of less toxic detoxification pathways by long-lived species*. Arch. Gerontol. Geriatr. 24, 87-102.
- 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.
- BRACK C., BECHTER-THÜRING E., LABUHN M., 1997. *N-Acetylcysteine slows down ageing and increases life span of Drosophila melanogaster*. Cell. Mol. Life Sci. 53, 960-966.
- CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., LANDUM R. W., CHENG M. S., WU J. F., FLOYD R. A., 1991. *Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitron*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3633-3636.
- COMMONER B., TOWNSEND J., PAKE G. E., 1954. *Free radicals in biological materials*. Nature 174, 689-691.
- CUTLER R. G., 1976. *Evolution of longevity in primates*. J. Hum. Evol. 5, 169-204.
- CUTLER R. G., 1984a. *Antioxidants, aging, and longevity*. [W:] *Free Radicals in Biology*, Pryor W. (red.), New York: Academic Press 6, 371-428.
- CUTLER R. G., 1984b. *Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity in mammalian species*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7627-7631.
- CUTLER R. G., 1985. *Antioxidants and longevity of mammalian species*. [W:] *Molecular biology of aging*, WOODHEAD A. D., BLACKETT A. D., HOLLANDER A. (red.), New York: Plenum Press, str. 15-74.
- CUTLER R. G., 1986. *Aging and oxygen radicals*. [W:] *Physiology of oxygen radicals*, TAYLOR A. E., MATALON S., WARD P. (red.), Bethesda, MD: American Physiological Society, str. 251-285.
- CUTLER R. G., 1991. *Antioxidants and aging*. Am. J. Clin. Nutr. 53, 373S-379S.
- DUDAS S. P., ARKING R., 1995. *A coordinate upregulation of antioxidant gene activities is associated with the delayed onset of senescence in a long-lived strain of Drosophila*. J. Gerontol. Biol. Sci. 50A, B117-B127.
- FARMER K. J., SOHAL R. S., 1987. *Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, Musca domestica*. Exp. Gerontol. 22, 59-65.
- FARMER K. J., SOHAL R. S., 1989. *Relationship between superoxide anion generation and aging in the housefly, Musca domestica*. Free Radical Biol. Med. 7, 23-29.
- FIEBIG R., GORE M. T., CHANDWANAY R., LEEUWENBURGH C., JI L. L., 1996. *Alteration of myocardial antioxidant enzyme activity and glutathione content with aging and exercise training*. Age 19, 83-89.
- FRIEDMAN D. B., JOHNSON T. E., 1988. *Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, Caenorhabditis elegans, define the age-1 gene*. J. Gerontol. Biol. Sci. 28, B102-B109.
- GARLAND D., RUSSELL P., ZIGLER J. S., Jr., 1988. *The oxidative modification of lens proteins*. Basic Life Sci. 49, 347-352.
- HARMAN D., 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11, 298-300.
- HARMAN D., 1968. *Free radical theory of aging: Effects of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice*. J. Gerontol. 23, 475-482.
- HILLIKER A. J., DUFY B., EVANS D., PHILLIPS J. P., 1992. *Urate-null rosy mutants of Drosophila melanogaster are hypersensitive to oxygen stress*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 4343-4347.
- JAZWINSKI S. M., 1996. *Longevity, genes, and aging*. Science 273, 54-59.
- JOHNS D. R., 1995. *Mitochondrial DNA and disease*. New Engl. J. Med. 333, 638-644.
- JOHNSON T. E., 1990. *Increased life-span of age-1 mutants of Caenorhabditis elegans and lower Gompertz rate of aging*. Science 249, 908-912.
- KU H.-H., SOHAL R. S., 1993. *Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential*. Mech. Ageing Dev. 72, 67-76.
- LANE M. A., BAER D. J., RUMPLER W. V., WEINDRUCH R., INGRAM D. K., TILMONT E. M., CUTLER R. G., ROTH G. S., 1996. *Caloric restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 4159-4164.
- LARSEN P. L., 1993. *Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 8905-8909.
- LASS A., AGARWAL S., SOHAL R. S., 1997. *Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species*. J. Biol. Chem. 272, 19199-19204.
- LEBOVITZ R. M., ZHANG H., VOGEL H., CARTWRIGHT J., Jr., DIONNE L., LU N., HUANG S., MATZUK M. M., 1996. *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 9782-9787.
- LITHGOW G. J., 1996. *Invertebrate gerontology: the age mutations of Caenorhabditis elegans*. BioEssays 18, 809-815.
- MARTIN G. M., AUSTAD S. N., JOHNSON T. E., 1996. *Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses*. Nature Genetics 13, 25-34.
- MARZABADI M. R., YIN D., BRUNK U. T., 1992. *Lipofuscinogenesis in a model system of cultured cardiac myocytes*. [W:] *Free Radicals and Aging*, EMERIT J., CHANCE B. (red.), Basel, Boston, Berlin: Birkhauser, str. 78-88.
- MCCAY C. M., CROWELL M. F., MAYNARD L. A., 1935. *The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size*. J. Nutrition 10, 63-79.
- MCCAY C. M., SPERLING G., BARNES L. L., 1943. *Growth, aging, chronic diseases and life span in rats*. Arch. Biochem. Biophys. 2, 469-.
- MCCORD J. M., FRIDOVICH I., 1969. *Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- MIQUEL J., LUNDGREN P. R., BENSCH 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.
- OLIVER C. N., AHN B. W., MOERMAN E. J., GOLDSTEIN S., STADTMAN E. R., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. J. Biol. Chem. 262, 5488–5491.
- ORR W. C., SOHAL R. S., 1992. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. Arch. Biochem. Biophys. 297, 35–41.
- ORR W. C., ARNOLD L. A., SOHAL R. S., 1992. Relationship between catalase activity, life span and some parameters associated with antioxidant defenses in *Drosophila melanogaster*. Mech. Ageing Dev. 63, 287–296.
- PARKES T. L., ELIA A. J., DICKSON D., HILLIKER A. J., PHILLIPS J. P., BOULIANNE G. L., 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. Nature Genet. 19, 171–174.
- PEARL R., 1928. The rate of living. Knopf, New York.
- PÉREZ-CAMPO R., LÓPEZ-TORRES M., ROJAS C., CADENAS S., BARJA G., 1994. Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study. J. Comp. Physiol. B 163, 682–689.
- REVEILLAUD I., NIEDZWIEDZKI A., BENSCH K. G., FLEMING J. E., 1991. Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance to oxidative stress. Mol. Cell. Biol. 11, 632–640.
- REVEILLAUD I., KONGPACHITH A., PARK R., FLEMING J. E., 1992. Stress resistance of *Drosophila* transgenic for bovine CuZn superoxide dismutase. Free Radical Res. Comm. 17, 73–85.
- RICHIE J. P. J., MILLS B. J., LANG C. A., 1987. Correction of a glutathione deficiency in the aging mosquito increases its longevity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 184, 113–117.
- RICHTER C., PARK J. W., AMES B. N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 6465–6467.
- RIKANS L. E., HORN BROOK K. R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. Biochim. Biophys. Acta 1362, 116–127.
- RUBNER M., 1908. Probleme des Wachstums und der Lebensdauer. Mitteilungen des Gesellschaft fuer Innere Medizin und Kinderheilkunde (Wien) 7, 58–72.
- SASTRE J., PALLARDÓ F. V., VINA J., 1996. Glutathione, oxidative stress and aging. Age 19, 129–139.
- SHAMA S., LAI C.-Y., ANTONIAZZI J. M., JIANG J. C., JAŻWINSKI S. M., 1998. Heat stress-induced life span extension in yeast. Exptl. Cell Res. 245, 379–388.
- SIES H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J. Med. 91, 31S–38S.
- SMITH C. D., CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., STADTMAN E. R., FLOYD R. A., MARKESBERY W. R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 10540–10543.
- SOHAL R. S., BRUNK U. T., 1992. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. Mutat. Res. 275, 295–304.
- SOHAL R. S., WEINDRUCH R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273, 59–63.
- SOHAL R. S., ARNOLD L. A., SOHAL B. H., 1990a. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. Free Radical Biol. Med. 10, 495–500.
- SOHAL R. S., SVENSSON I., BRUNK U. T., 1990b. Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. Mech. Ageing Dev. 53, 209–215.
- SOHAL R. S., KU H.-H., AGARWAL S., 1993. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. Biochem. Biophys. Res. Comm. 196, 7–12.
- SOHAL R. S., AGARWAL A., AGARWAL S., ORR W. C., 1995a. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 270, 15671–15674.
- SOHAL R. S., SOHAL B. H., ORR W. C., 1995b. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. Free Radical Biol. Med. 19, 499–504.
- SOHAL R. S., SVENSSON I., SOHAL B. H., BRUNK U. T., 1989. Superoxide anion production in different animal species. Mech. Ageing Dev. 49, 129–135.
- STADTMAN E. R., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., CARNEY J. M., FLOYD R. A., 1992. Protein modification in aging. [W:] Free Radicals and Aging. EMERIT I., CHANCE B. (red.), Basel, Boston, Berlin: Birkhauser, str. 64–72.
- STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., 1989. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. Arch. Biochem. Biophys. 275, 559–657.
- SUN J. O., TOWER J., 1999. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase: Transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. Mol. Cell. Biol. 19, 216–228.
- WAWRYN J., KRZEPILKO A., MYSZKA A., BILIŃSKI T., 1997. Free radical theory of aging. A model study. SFRR Europe Summer Meeting, Abano Terme.
- WEINDRUCH R., SOHAL R. S., 1997. Caloric intake and aging. New Engl. J. Med. 337, 986–994.
- YAN L.-J., LEVINE R. L., SOHAL R. S., 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 11168–11172.
- YAN L.-J., SOHAL R. S., 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 12896–12901.
- YOUNGMAN L. D., PARK J.-Y. K., AMES B. N., 1992. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 9112–9116.