

MAREK JURGOWIAK i RYSZARD OLIŃSKI

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej
Akademia Medyczna im. L. Rydygiera
Kartowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
e-mail: marek@aci.amb.bydgoszcz.pl
ryszardo@aci.amb.bydgoszcz.pl

*„.....każdy potrafi wydrzeć człowiekowi życie,
lecz nikt nie wydrze mu śmierci: tysiąc dróg prowadzi do niej.”
L.A. Seneka (4 p.n.e. - 65)*

USZKODZENIA JĄDROWEGO I MITOCHONDRIALNEGO DNA W PROCESACH STARZENIA

WSTĘP

Przyczyny zmian prowadzących do starzenia organizmu i rozwoju chorób wieku starczego są nadal słabo poznane. W ujęciu biomedycznym śmierć organizmu jest wynikiem rozwoju jednej z jednostek chorobowych, bądź złożonego zespołu chorób. Co ciekawe, proces starzenia jest przez wielu badaczy postrzegany jako długotrwały proces chorobowy, różniący się jednak od innych tym, że jest zjawiskiem uniwersalnym dla wszystkich organizmów wielokomórkowych.

Zadziwiający jest fakt, że organizm powstający w złożonym procesie morfogenezy nie potrafi sprostać wydawało by się prostszemu zadaniu — utrzymać się w stanie, w jakim już funkcjonuje. Rozwój i funkcjonowanie organizmu odbywa się według programu zapisanego w genach każdej komórki. Jakiegokolwiek naruszenie stabilności materiału genetycznego może mieć dramatyczne konsekwencje.

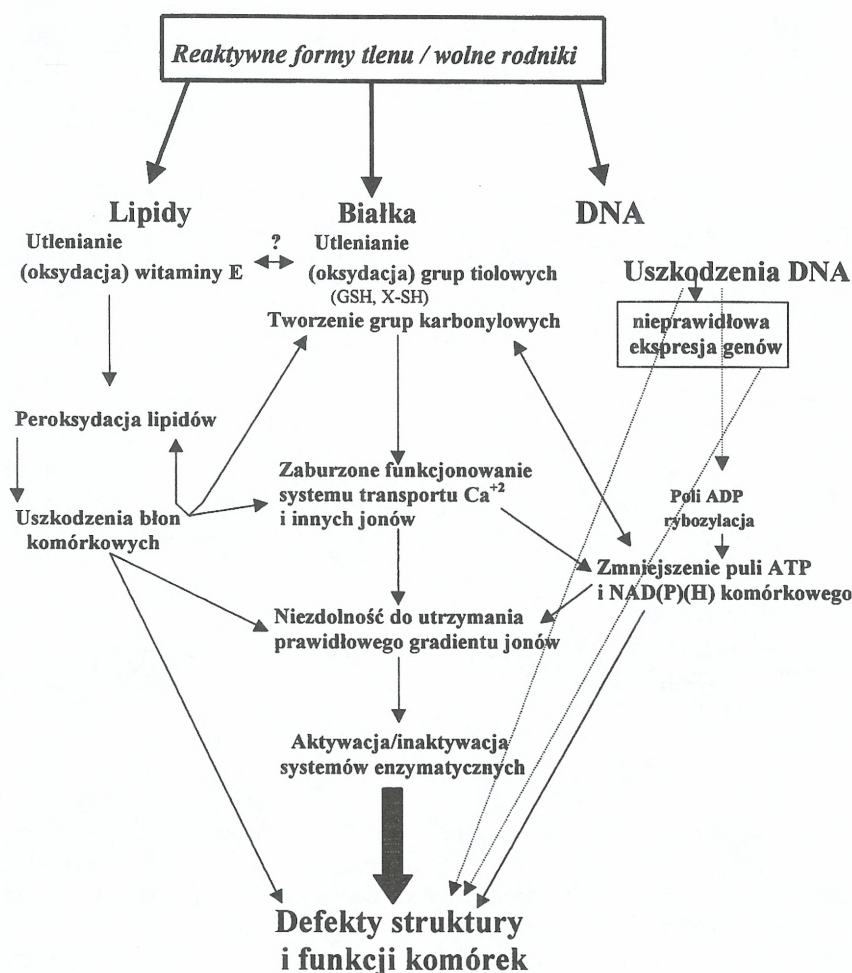
Jedna z teorii zakłada, że starzenie się organizmu jest konsekwencją akumulowania w komórkach oksydacyjnych uszkodzeń DNA, lipidów i białek (Ryc. 1). Te same czynniki stanowią przyczynę chorób wieku starczego (nowotwory, miażdżycę, choroba Alzheimera i inne). Za uszkodzenia te odpowiedzialne są przede wszystkim wolne rodniki tlenowe (WRT). Wolnorodnikową teorię starze-

nia zaproponował HARMAN (1956, 1994). Obecnie wskazuje się na mitochondria, jako jedno z głównych miejsc generowania wolnych rodników w komórce, a tym samym struktury uszkodzane przez wolne rodniki, co może być przyczyną rozwoju zmian starczych i chorobowych (JURGOWIAK i OLIŃSKI 1997a, b; SHIGENAGA i współaut. 1994; WALLACE 1992).

Oksydacyjne uszkodzenia DNA są jednym z ważniejszych czynników branych obecnie pod uwagę w wyjaśnieniu fizjologicznych zmian związanych ze starzeniem i chorobami degeneracyjnymi wieku starczego (AMES 1989). Jedną z lepiej poznanych wolnorodnikowych modyfikacji DNA jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) (KASAI i NISHIMURA 1991). 8-OHdG uznana jest jako swoisty biomarker oksydacyjnych uszkodzeń DNA (SHIGENAGA i AMES 1991), który może być analizowany z zastosowaniem między innymi metod wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) i chromatografii gazowej (GC/MS).

Wyniki wielu badań wskazują na akumulację wraz z wiekiem oksydacyjnych uszkodzeń zarówno w obrębie jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA (mtDNA) (FRAGA i współaut. 1990, MECOCCHI i współaut. 1993).

Stosowane skróty: 8-OHdG — 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna; mtDNA — mitochondrialny DNA; RFT — reaktywne formy tlenu; WRT — wolne rodniki tlenowe; Cu,Zn SOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk; -SH — grupa tiolowa; GSH — zredukowany glutation.



Ryc 1. Mechanizmy prowadzące do wolnorodnikowych uszkodzeń komórek.

Oddziaływanie wolnych rodników z lipidami, białkami i DNA komórkowym prowadzi do licznych zmian struktury i funkcji komórek (dane różnych autorów, a głównie na podstawie pracy KEHRERA 1993).

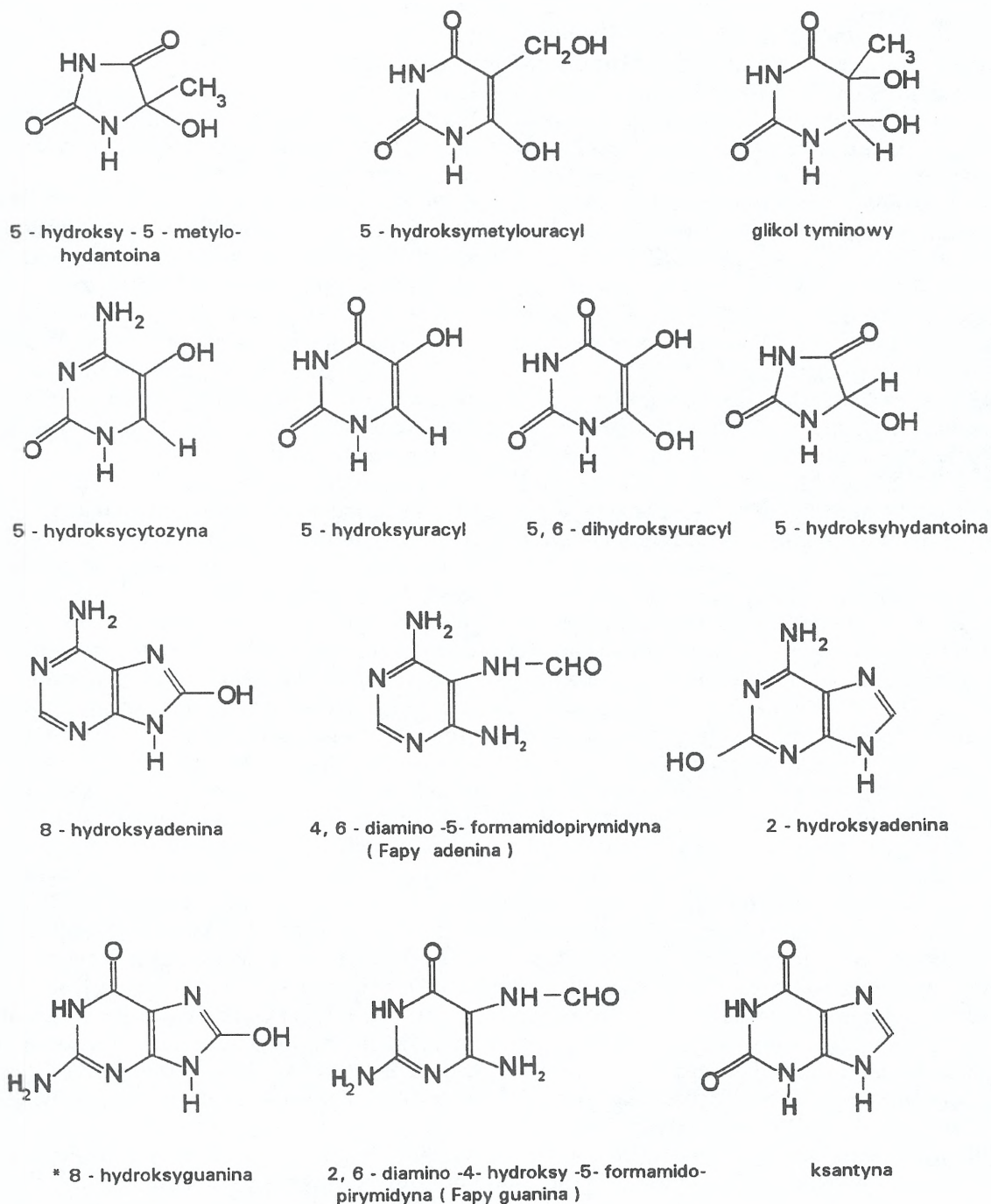
PATOGENNE EFEKTY ODDZIAŁYWANIA RFT Z DNA

USZKODZENIA DNA A STARZENIE

W roku 1967 ALEXANDER jako pierwszy zasugerował, że uszkodzenia DNA mogą być pierwotną przyczyną starzenia się. Reaktywne formy tlenu (RFT, pojęcie to obejmuje zarówno rodniki, jak i nie będące rodnikami aktywne formy tlenu np. H_2O_2 , $HOCl$) są czynnikiem uszkadzającym komórkowy DNA. Podatność DNA na działanie WRT (np. $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) jest obecnie dobrze udokumentowana (DIZDAROGLU i współaut. 1993, HAYAKAWA i współaut. 1992, TAKASAWA i współaut. 1993, OLIŃSKI 1993). Częste RFT obecne w komórkach pochodzą ze źródeł zarówno endo-, jak i egzogennych (BARTOSZ 1995, OLIŃSKI i JURGOVIK 1996). RFT są przyczyną szerokiego spektrum uszkodzeń DNA. Indukowane działaniem RFT uszkodzenia DNA obejmują: pęknięcia pojedynczej i pęknię-

cia obu nici w helisie DNA, powstanie miejsc apurynowych i apirymidynowych (AP) oraz modyfikacje zasad (FRIEDBERG i współaut. 1995) (Ryc. 2). Pomimo obecności komórkowych systemów antyoksydacyjnych, w komórkach utrzymuje się pewien poziom oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA (RICHTER i współaut. 1988, ZASTAWNY i współaut. 1998), który wzrasta w starzejących się komórkach. Stały poziom 8-OHdG w DNA jest o około 35% wyższy w starych komórkach w porównaniu do młodych komórek w hodowli (CHEN i współaut. 1995). W starzejących się w hodowli fibroblastach człowieka powstaje 4-krotnie więcej 8-OHdG każdego dnia, w porównaniu do młodych komórek.

HAYFLICK już kilkadziesiąt lat temu wykazał, że hodowane *in vitro* fibroblasty człowieka mają pewien ściśle określony i ograniczony potencjał podziałowy. Następnie w wielu pracach wyka-

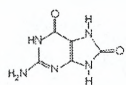


Ryc. 2. Zmodyfikowane formy zasad azotowych, będące wynikiem oddziaływania z rodnikiem $\cdot\text{OH}$

ziano, że dotyczy to także innych tkanek (HAY-FLICK 1989). Po okresie szybkiego wzrostu *in vitro* tempo proliferacji komórek gwałtownie

spada. Komórki ostatecznie wchodzi w fazę całkowitego zahamowania podziałów. Zjawisko to określa się jako starzenie na poziomie komór-

* W piśmiennictwie utrzymała się nazwa 8-hydroksyguanina, natomiast według nowszych badań przeważającą formą tautomeryczną jest 6,8-diketo (8-oksyguanina).



kowym lub jako starzenie *in vitro*. Jednakże w organizmach starych wiele komórek jest w dalszym ciągu zdolnych do podziałów. Charakterystyczna jest odwrotna korelacja między liczbą podziałów komórek a wiekiem organizmu dawcy (HAYFLICK 1991). Wykazano również, że liczba podziałów fibroblastów hodowanych jest wyższa w przypadku gatunków długo — niż krótko żyjących. Na przykład u człowieka wynosi od 40 do 65 podziałów przy maksymalnej długości życia około 120 lat, a u myszy 14–28 podziałów przy maksymalnej długości życia 3,5 lat (KANUNGO 1980). W tym aspekcie interesujące są wyniki badań poziomu 8-OHdG w DNA diploidalnych fibroblastów (TIG-1) człowieka w różnych stadiach starzenia *in vitro* (HOMMA i współaut. 1994). Mianowicie stwierdzono znaczący wzrost zawartości 8-OHdG w DNA starzejących się komórek. Poziom ten oznaczono na $0,5 \times 10^{-6}$ i $1,6 \times 10^{-6}$ 8-OHdG /dG odpowiednio w młodych (22 podziały) i starszych (50 cykli podziałowych) komórkach. W tych samych badaniach stwierdzono, że znacząco obniżyła się aktywność mechanizmów naprawczych podczas starzenia komórkowego. Zjawisko to może tłumaczyć wzrost poziomu 8-OHdG, wraz z wiekiem komórek. Podobnie do opisanych powyżej badań, FRAGA i współaut. (1990) wykazali wzrost poziomu 8-OHdG w różnych narządach szczura podczas starzenia się. Dane te wskazują na istnienie podobnych mechanizmów starzenia *in vitro* i na poziomie organizmowym.

W tkankach organizmu człowieka i wielu zwierząt doświadczalnych zaobserwowano wraz z wiekiem nasilenie oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA na przykład w mózgu człowieka (MECOCCI i współaut. 1993) i wątrobie szczura (RICHTER i współaut. 1988). Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA był w tych przypadkach 10-krotnie wyższy w mitochondriach w porównaniu do DNA jądrowego. Co ciekawe, wyższy z wiekiem poziom uszkodzeń DNA odnotowano u szczurów, których dieta pozbawiona była witaminy E (witamina E wykazuje działanie antyoksydacyjne) w porównaniu do zwierząt, których dieta zawierała tę witaminę (SUMMERFIELD i TAPPEL 1984).

Wzrost poziomu markera wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, jakim jest 8-OHdG, związany jest z upośledzeniem funkcji organów (np. mózgu czy wątroby) i wzrostem podatności komórek na zmiany mutagenne (KANEKO i współaut. 1996). Interesujące są wyniki badań dotyczących poziomu 8-OHdG w moczu gryzoni i człowieka. Wykazano w nich, że ze wzrastającym wiekiem organizmu obniża się poziom wydalanego w moczu 8-OHdG (FRAGA i współaut. 1990). Jednocześnie poziom oksydacyjnych

uszkodzeń DNA u osobników starych jest wysoki. Dane te wskazują, że wraz z wiekiem obniża się znacząco aktywność enzymów odpowiedzialnych za naprawę 8-OHdG. Obecnie powszechnie przyjmuje się, że usuwana z komórkowego DNA 8-OHdG jest wydalana z moczem. Warto w tym miejscu przypomnieć, że w starzejących się organizmach znacząco wzrasta poziom grup karbonylowych białek, na przykład w mózgu człowieka i zwierząt (MECOCCI i współaut. 1999). Są to produkty oksydacyjnych uszkodzeń białek komórkowych. Jedną z przyczyn zmian starczych w komórkach może być zatem upośledzenie działania mechanizmów chroniących komórki przed toksycznym działaniem RFT. Ponieważ 8-OHdG indukuje mutacje, powstawanie tej modyfikacji w DNA komórki podlega kontroli z udziałem endogennych systemów naprawczych.

W badaniach przeprowadzonych na *Drosophila melanogaster* (SOHAL i współaut. 1995) i muchach domowych (AGARWAL i SOHAL 1994) wykazano, że tempo starzenia się organizmu zależy od tempa metabolizmu (potencjału metabolicznego). Tempo starzenia można modulować przez wpływ na tempo metabolizmu (aktywność fizyczną). Działanie na młode muchy promieniowania X i ekspozycja na wysokie stężenie tlenu podwyższa znacznie poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w mitochondriach i jądrach komórkowych zbliżając ten poziom do wartości podobnej, jak w przypadku starzejących się osobników muchy domowej. Indykatorem oksydacyjnych uszkodzeń DNA był w tym przypadku poziom 8-OHdG. W mtDNA stwierdzono 3-krotnie więcej oksydacyjnych uszkodzeń niż w DNA jądrowym starzejących się osobników. Interesujące jest, że ograniczenie aktywności fizycznej much wiązało się z wydłużeniem długości życia i obniżeniem poziomu 8-OHdG w mitochondrialnym i jądrowym DNA. Tak więc, poziom 8-OHdG w komórkach muchy domowej wykazywał odwrotną korelację z długością życia badanych organizmów. Ponadto związany z wiekiem wzrost poziomu 8-OHdG skorelowany był ze wzrostem poziomu białkowych grup karbonylowych. Dane te zdają się popierać hipotezę, że oksydacyjne uszkodzenia makrocząsteczek stanowią znaczący czynnik w procesach starzenia się.

SOHAL i współaut. (1995) przeprowadzili badania transgeniczných muszek *D. melanogaster* zawierających dodatkowy gen dysmutazy ponadtlenkowej (Cu, ZnSOD) i katalazy. Nadekspresja Cu,ZnSOD oraz katalazy hamuje akumulację 8-OHdG u starzejących się muszek, a także u osobników ekspozowanych na działanie promieniowania X. Jednocześnie u transge-

nicznych osobników zaobserwowano ograniczenie oksydacyjnych uszkodzeń białek. Wiekowozależne obniżenie aktywności Glu-6-P dehydrogenazy (jednego z enzymów w ochronie antyoksydacyjnej) i wzrost tempa generowania w mitochondriach H_2O_2 był niższy u zwierząt transgenicznych w porównaniu do kontrolnych muszek. Konsumpcja tlenu była jednocześnie wyższa u zwierząt transgenicznych. Potencjał metaboliczny, czy też całkowity poziom konsumpcji tlenu, podczas przeciętnej długości życia był około 30% wyższy u zwierząt eksperymentalnych w porównaniu do kontroli. Wyniki te wskazują, że nadekspresja enzymów ochrony antyoksydacyjnej ogranicza akumulację oksydacyjnych uszkodzeń makrocząsteczek i wrażliwość komórek na stres oksydacyjny, przedłużając jednocześnie okres życia badanych muszek. Potwierdzają też koncepcję, że stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem w procesie starzenia się.

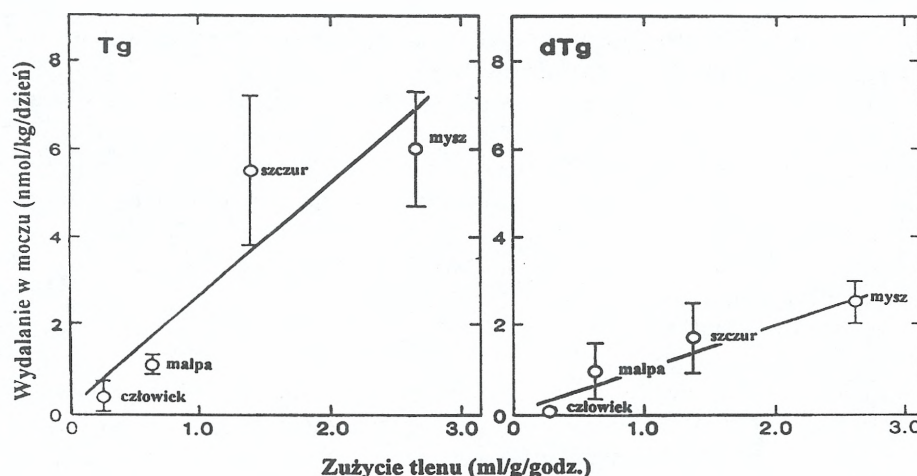
W badaniach przeprowadzonych na szczurach SAI i współaut. (1992) wykazali, że 8-OHdG gromadzi się w różnych narządach podczas starzenia i poziom tej modyfikacji DNA różni się w zależności od płci.

Poziom oksydacyjnych modyfikacji w DNA organizmów różnych gatunków zależy od tempa metabolizmu (ml O_2 konsumowanego na gram masy ciała w ciągu godziny) i ma wpływ na długość życia (ADELMAN i współaut. 1988). Oksydowane zasady są wycinane z DNA przez enzymy naprawcze i wydalone z organizmu wraz z moczem. W moczu myszy wykazano wydalanie 6,04 nmoli glikolu tyminy /kg/dzień i 2,58 nmoli glikolu tymidyny/kg/dzień. W moczu małpy (*Macaca fascicularis*) stwierdzono wydalanie dziennie 1,12 nmola glikolu tyminy/kg masy ciała i 0,95 nmola glikolu tymidyny/kg. Biorąc pod uwagę masę ciała, z organizmu myszy wydalana jest 18-krotnie większa

ilość glikolu tyminy i glikolu tymidyny w porównaniu do organizmu człowieka. Z organizmu małpy wydalana jest 4-krotnie większa ilość glikolu tyminy i glikolu tymidyny w porównaniu do organizmu człowieka. Dane te potwierdzają, że tempo metabolizmu i charakterystyczna dla gatunku długość życia koreluje z poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Ryc. 3).

W tym aspekcie interesujące są wyniki badań LOFTA i współaut. (1994), którzy wykazali związek pomiędzy tempem metabolizmu, a tym samym generowania rodników tlenowych w organizmie człowieka, a stopniem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Stwierdzono występowanie zależności pomiędzy ilością wydalonej w moczu 8-OHdG i konsumpcją tlenu u kobiet w okresie premenopauzy. Wzrost konsumpcji tlenu (w litrach/24 godz.) związany był z podniesieniem poziomu wydalonej w moczu 8-OHdG. U kobiet palących tytoń, ilość wydalonej w moczu 8-OHdG wzrosła o 35% przy wzroście konsumpcji tlenu tylko o 10%, w porównaniu do kobiet nie palących. Wykazano zatem, że tempo oksydacyjnych uszkodzeń DNA wzrasta wraz z nasileniem procesów oddychania komórkowego i w dużym stopniu zależne jest od używania tytoniu. Wiadomo jest obecnie, że palenie tytoniu wzmacnia generowanie RFT w mitochondriach, co potwierdzone zostało w badaniach mitochondriów mięśnia sercowego królika ekspozowanego na działanie dymu tytoniowego (GVOZDIAKOVA i współaut. 1992). Wiadomo również, że dym tytoniowy zawiera dużą ilość oksydantów i indukuje uszkodzenia DNA *in vitro* (LEANDERSON i współaut. 1992). Palący nałogowo tytoń posiadają w osoczu krwi obniżony poziom antyoksydantów (DORGAN i SCHATZKIN 1991).

Okazuje się, że liczba uszkodzeń DNA znacząco wzrasta po osiągnięciu przez organizm określonego wieku. Opisano dwukrotny wzrost poziomu 8-OHdG w jądrowym DNA (mózgu,



Ryc. 3. Poziom glikolu tyminy (Tg) i glikolu tymidyny (dTg) w moczu pochodzącym od czterech gatunków organizmów.

Wartości te wyrażone są jako funkcja tempa metabolizmu poszczególnych gatunków (zużycie tlenu/gram masy ciała/godzinę). Według ADELMANA i współaut. 1988 — zmodyfikowane.

serca, wątroby, nerki) u samców szczurów w wieku 30 miesięcy w porównaniu do osobników w wieku od 2 do 24 miesięcy. Znaczna akumulacja 8-OHdG jądrowego DNA rozpoczyna się u badanych zwierząt w wieku powyżej 24 miesięcy (KANEKO i współaut. 1996). U człowieka w tkance mózgu opisano znaczący, bo aż 10-krotny wzrost poziomu 8-OHdG w mtDNA w porównaniu do DNA jądrowego osobników w wieku 42–97 lat. Ciekawe jest, że opisany wzrost poziomu 8-OHdG był aż 15-krotnie wyższy w mtDNA u osobników powyżej 70 roku życia (MECOCCI i współaut. 1993).

Intensyfikacja w ostatnich latach badań nad mtDNA wynika ze stwierdzenia faktu stopniowej utraty przez te organelle starych komórek zdolności do wytwarzania energii (LINNAE i współaut. 1989). Mitochondria są największym źródłem wolnych rodników, a tempo utleniania DNA tych struktur jest znacznie wyższe niż DNA w jądrze komórkowym. Szacuje się, że poziom markera wolnorodnikowych modyfikacji DNA (8-OHdG) jest 16-krotnie wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym, co odpowiada poziomowi uszkodzeń 1 na 8000 zasad (RICHTER i współaut. 1988, HALLIWELL i ARUOMA 1991).

Z przeprowadzonych ostatnio badań porównawczych wynika, że tak zwany endogenne poziom oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad DNA jest wyższy w mtDNA w porównaniu do DNA jądrowego (ZASTAWNY i współaut. 1998). Badania dotyczyły komórek wątrobowych świni w wieku 9 miesięcy. Ciekawe jest, że stosunek ilościowy mtDNA/jądrowy DNA dla zasad o znaczeniu promutagennym (8-OHdG, 5-OHCyt) jest niższy niż w przypadku innych zmodyfikowanych zasad (5-OHHyd, 5-OHMeHyd, 5-OHMeUra). Wartości te mogą jednak ulegać zmianie w starych organizmach.

MtDNA jest szczególnie podatny na działanie RFT ponieważ:

a) mitochondria konsumują ~90% tlenu przetwarzanego przez organizm, a 1–2% metabolizowanego tlenu (choć wielkość ta jest obecnie kwestionowana) ulega konwersji do form wolnorodnikowych;

b) cząsteczki mtDNA znajdują się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej, w której system transportu elektronów generuje RFT;

c) DNA mitochondriów nie jest związany z białkami histonowymi;

d) geny mitochondrialne są słabiej chronione niż jądrowe przez system naprawy DNA, który jest jednak w nich obecny, a ostatnie badania wskazywać mogą na większą jego wydajność, niż sądzono dotychczas (ROTEAU i BOHR 1997).

Liczne badania wykazały obecność mutacji punktowych i delecji w mtDNA oraz ich związek z procesami starzenia i rozwoju wielu chorób (RICHTER 1992, MIGUEL 1992, WALLACE 1992, MECOCCI i współaut. 1993).

W szczególny sposób dwa typy tkanek narażone są na oksydacyjne uszkodzenia. Są to tkanka mięśniowa i tkanka nerwowa. Oba typy tkanek zawierają postmitotyczne komórki, w których stale akumulowane są oksydacyjne uszkodzenia DNA. Ponadto tkanki mięśniowa i nerwowa zużywają duże ilości tlenu.

Wykazany został wzrost delecji mtDNA w mięśniach szkieletowych człowieka wraz z wiekiem (COOPER i współaut. 1992, BOFFOLI i współaut. 1994). Wzrost liczby delecji koreluje ze spadkiem aktywności enzymów łańcucha oddechowego w mięśniach szkieletowych człowieka (LEZZA i współaut. 1994).

W mięśniu sercowym i mięśniu przepony człowieka wzrasta z wiekiem poziom 8-OHdG mitochondrialnego DNA (HAYAKAWA i współaut. 1991, 1992). Białka mitochondriów mięśni szkieletowych człowieka są także podatne na uszkodzenia indukowane przez RFT. Zaobserwowano, że tempo syntezy białek mitochondrialnych w mięśniach szkieletowych człowieka znacząco obniża się w starszych organizmach (ROOYACKERS i współaut. 1996). W jednym z najnowszych badań potwierdzono wiekowo-zależny wzrost poziomu 8-OHdG, dialdehydu malonowego (MDA, markera peroksydacji lipidów) i grup karbonylowych białek (markera oksydacji białek) w biopsjach mięśni człowieka (MECOCCI i współaut. 1999). Cytowani autorzy wykazali także akumulację oksydacyjnych uszkodzeń DNA w jądrze i mitochondriach mózgu człowieka w starszym wieku (MECOCCI i współaut. 1993).

W świetle powyższych danych można przypuszczać, że atak utleniaczy na DNA, jak i białka oraz lipidy, jest przyczyną postępującego z wiekiem spadku wydolności mitochondriów. Gdy liczba uszkodzonych w ten sposób mitochondriów przekroczy pewną wartość krytyczną zrozumiemy stąd fakt niedostatku energii w komórkach starzejącego się organizmu (Ryc. 4). W trakcie życia człowieka pogłębia się nie miażdżycowa dysfunkcja serca i innych tkanek organizmu, co w konsekwencji prowadzi do zmian starczych i śmierci organizmu.

USZKODZENIA DNA A CHOROBY

Wiele danych wskazuje na to, że utlenione makrocząsteczki stanowią jeden z czynników wywołujących wiele schorzeń charakterystycz-

nych dla wieku starczego, takich jak: nowotwory, miażdżyca, dysfunkcje mózgu, zapalenie stawów, cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego (Tabela 1). Dotyczy to także wielu chorób dotyczących ludzi w młodszy wieku, takich na przykład jak miopatie, encefalomiopatie, encefalopatie. Jest to grupa tak zwanych chorób mitochondrialnych o podłożu dziedzicznym.

Tabela 1. Wykaz chorób (głównie wieku starczego lub związanych z przyspieszonym starzeniem), których etiopatogeneza powiązana jest z działaniem RFT (dane różnych autorów).

Choroba Alzheimer	Reumatoidalne zapalenie stawów
Choroba Parkinsona	Zaćma
Cukrzyca	Zawał
Miażdżyca	Zespoły przyspieszonego starzenia (np. Progeria)
Retinopatie	Choroba niedokrwienna serca
Nowotwory	Stwardnienie rozsiane
Choroba Keshan (niedobór selenu)	Stwardnienie zanikowe boczne
Zespół Downa	

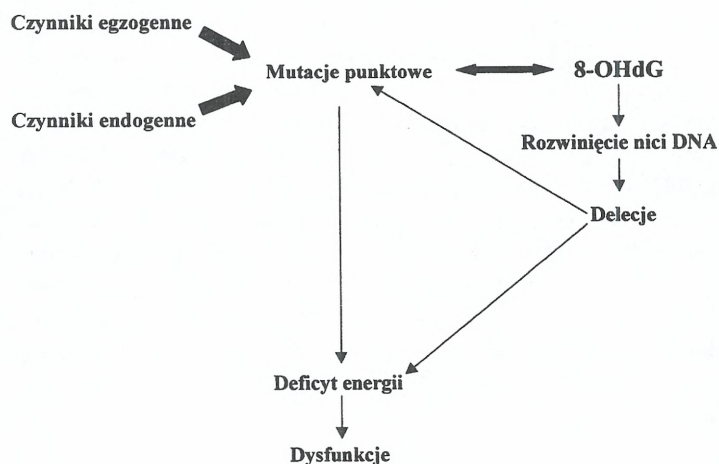
Do często występujących chorób wieku podeszłego należą nowotwory. Wkład RFT w proces karcynogenezy jest bogato udokumentowany. Ze względu na duży potencjał mutageny szczególne znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórki mogą mieć oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe (OLIŃSKI i współaut. 1998) (zagadnienie to szerzej zostanie omówione w następnym zeszycie KOSMOSU). Progresja zmian prowadzących do uzłośliwienia komórki zachodzi w przeciągu długiego okresu, nierzadko rozciągającego się

na dziesięciolecia, co sugeruje akumulację wielorakich mutacji.

Zidentyfikowano i opisano dotychczas wiele chorób czy też stanów patologicznych powiązanych z uszkodzeniami DNA, a szczególnie mtDNA. Często są to przypadłości charakterystyczne dla osobników starzejących się (choroby degeneracyjne wieku starczego). Większość danych cytowanych w tej części pracy pochodzi z artykułów znajdujących się w bibliografii zamieszczonej w pracach OLIŃSKIEGO i JURGO-WIAKA (1996) oraz JURGO-WIAKA i OLIŃSKIEGO (1997b). W badaniach patogenyzy chorób powiązanych z defektami procesu fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach i uszkodzeniami mtDNA zwraca się uwagę na tkanki, które w sposób szczególnie zależne są od podaży dużych ilości ATP zapewniającego ich prawidłowe funkcjonowanie. Są to tkanki ośrodkowego układu nerwowego, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, nerki, wątroby oraz siatkówki i komórek wysepek trzustki. Mózg człowieka, stanowiąc około 2% masy ciała, konsumuje aż 20% tlenu zużywanego przez organizm. Dla porównania, mięśnie szkieletowe stanowiąc około 30% masy ciała zużywają tylko 40% tlenu wykorzystywanego przez organizm. Niemniej istotny jest fakt, że konsumpcja tlenu w mięśniach znacznie wzrasta podczas wysokiej aktywności fizjologicznej i w różnych stanach patologicznych osiągając poziom zużycia aż 90% tlenu w organizmie.

Choroby układu sercowo-naczyniowego

Jak wykazano, chronicznemu niedokrwieniu mięśnia sercowego towarzyszą delecje (5-kz) mtDNA, jak również kompensacyjna indukcja niektórych genów mitochondrialnych. Stwierdzone delecje mtDNA i zahamowanie aktywności enzymów procesu fosforylacji oksydacyjnej w starzejącym się mięśniu sercowym stanowią mogą przyczynę zachwiania równowagi oksyda-



Ryc. 4. Konsekwencją mutacji w mtDNA są defekty enzymów łańcucha oddechowego, co prowadzi do deficytu energii w komórkach. Powoduje to pogłębienie dysfunkcji na przykład serca, a także innych tkanek, co przedstawić można według HAYAKAWY i współaut. 1992.

cyjno/antyoksydacyjnej (co nasila szok tlenowy) z bardzo rozległymi konsekwencjami biologicznymi. Objawia się to odkładaniem płytek miażdżycowych i rozwojem chorób mięśnia sercowego na przykład kardiomiopatii rozstrzeniowej i zespołu niedokrwienia układu sercowo-naczyniowego. Według niektórych autorów w tych przypadkach niezbędne jest określenie poziomu antyoksydantów w płynach ustrojowych pacjentów i w razie jego obniżenia podanie dużych, terapeutycznych dawek koenzymu Q.

Cukrzyca

Insulino-niezależna cukrzyca (NIDDM, ang. non-insulin dependent diabetes mellitus) jest schorzeniem często występującym u osobników w wieku starszym. Z patogenezą tej choroby związane są między innymi mutacje w obrębie mtDNA. U pacjentów dotkniętych NIDDM stwierdzone zostały bardzo duże delecje (10,4 kb) mtDNA, które zaburzają replikację łańcucha lekkiego tej makrocząsteczki. NIDDM, którą dotkniętych jest duży odsetek populacji cukrzyków związana może być zatem ze specyficznymi mutacjami mtDNA. Również obniżenie wydajności procesu fosforylacji oksydacyjnej wraz ze wszystkimi tego konsekwencjami, jakie obserwuje się wraz ze wzrastającym wiekiem, wydaje się odgrywać znaczącą rolę w patofizjologii cukrzycy. Podobne znaczenie mają czynniki środowiskowe związane ze stylem życia. Wiele tak zwanych czynników diabetogennych atakujących genom mitochondrialny wyzwała w tych organellach szok tlenowy. Do czynników tych należą interleukina-1 β , interferon- γ , TNF- α , alloskan i streptozotocyna. Działanie wymienionych czynników w układach biologicznych jest hamowane przez antyoksydanty, co stwierdzono zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych, jak i w przypadku człowieka. Powyższe obserwacje dały podstawę do założenia, że czynniki o działaniu diabetogennym indukują pęknięcia łańcucha mtDNA komórek — wysepek trzustki, co stanowi jedną z przyczyn śmierci tych komórek, chociaż niektórzy autorzy kwestionują uniwersalność tej hipotezy. Uszkodzenia genomu mitochondrialnego brane są także pod uwagę jako jeden z czynników w patogenezie cukrzycy insulino-zależnej (IDDM, ang. insulin-dependent diabetes mellitus). Niektóre dane kliniczne zdają się potwierdzać rolę uszkodzonego mtDNA w rozwoju cukrzycy. Otóż pacjenci z zespołem Kearns-Sayrea (KSS) i chroniczną postępującą zewnętrzną oftalmoplegią (CPEO) zapadają na cukrzycę znacznie częściej niż przeciętny osobnik populacji.

Oprócz wspomnianej wyżej delecji, w rodzinach cukrzyków opisane zostały tranzycje A do G na przykład w parze nukleotydów 3243 mitochondrialnego genu dla tRNA^{Leu} (UUR). Mutacje tego typu są przyczyną zaburzeń terminacji transkrypcji mitochondrialnej skutkiem czego są defekty syntezy białek mitochondrialnych.

Choroby ośrodkowego układu nerwowego

Komórki ośrodkowego układu nerwowego konsumują w procesach metabolicznych duże ilości tlenu (głównie podczas produkcji energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej). Zmiany degeneracyjne w obrębie neuronów prawdopodobnie mogą być wynikiem zaburzenia równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej, co wyzwała w komórce szok tlenowy. Konsekwencją tego stanu są akumulowane w komórce uszkodzenia DNA, białek i lipidów. Podkreślić należy, że nasilenie uszkodzeń makromolekuł komórkowych obserwuje się nie tylko w przypadku zaburzeń w funkcjonowaniu układu antyoksydacyjnego, ale i podczas starzenia się organizmu. Implikacje związane z szokiem tlenowym odnosi się obecnie do niektórych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. amyotrophic lateral sclerosis), choroba Huntingtona i choroba Alzheimerera. Wszystkie wymienione stany patologiczne charakteryzują się występowaniem delecji, bądź mutacji mtDNA oraz nieprawidłowym funkcjonowaniem kompleksów łańcucha oddechowego. W opisanych przypadkach szok tlenowy stanowić może jedną z przyczyn postępującej degeneracji neuronów, co jest charakterystycznym objawem chorób ośrodkowego układu nerwowego. Mitochondria pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimerera wykazują defekty kompleksu IV łańcucha oddechowego; nie do końca jest jednak wyjaśnione, czy przyczyną tego są mutacje mtDNA. Podobnie jest w przypadku choroby Huntingtona. Defekty kompleksów I i IV stwierdzone zostały w zwojach podstawy mózgu i mitochondriach płytek krwi pacjentów. U osób cierpiących na chorobę Huntingtona obserwuje się 5–11-krotny wzrost delecji mtDNA neuronów korowych w porównaniu do osób tej samej grupy wiekowej stanowiących kontrolę. W przypadku choroby Parkinsona niektórzy autorzy opisali chorobowo-specyficzne delecje mtDNA w mózgu pacjentów, nie zostało to jednak potwierdzone przez innych badaczy. Stwierdzono natomiast akumulację delecji (podobnego typu) w mózgach osób w podeszłym wieku.

SANCHEZ-RAMOS i współaut. (1994) opisali podwyższony poziom 8-OHdG w mózgu osobników cierpiących na chorobę Parkinsona w po-

równaniu do osobników zdrowych w podeszłym wieku.

ZAKOŃCZENIE

W organizmach osobników zdrowych generowanie RFT zachodzi pod kontrolą sprawnego systemu antyoksydacyjnego, chociaż i w tym przypadku dochodzić może do akumulacji tlenowych uszkodzeń komórek i tkanek, co przyczynia się do rozwoju procesów starzenia i pewnych stanów patologicznych często charakterystycznych dla wieku starczego, jak chociażby chorób nowotworowych i chorób ośrodkowego układu nerwowego.

W jednej z bardziej atrakcyjnych hipotez wyjaśnienie takiego stanu rzeczy opiera się na

obserwowanej wraz z wiekiem kumulacji uszkodzeń wolnorodnikowych różnych struktur komórkowych i powiązania ich z patogenezą dużej liczby schorzeń. Stres oksydacyjny towarzyszy wielu jednostkom chorobowym i związany jest z procesami naturalnego starzenia. Nie wiemy jednakże z całą pewnością, czy stres oksydacyjny jest skutkiem czy też pierwotną przyczyną toczących się zmian starczych i chorobowych.

NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL DNA DAMAGE IN AGEING

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are generated in cells as a byproduct of cellular metabolism. ROS can react with various cell components: proteins, lipids and DNA, resulting in damage to these biomolecules and in cell dysfunction. These lesions accumulate with age and have been postu-

lated to be a major type of endogenous damage leading to ageing. This review is an attempt to summarize our present knowledge on the free radical-induced DNA damage involved in ageing and degenerative diseases.

LITERATURA

- AMES B. N., 1989. *Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer*. Free Radic. Res. Commun. 7, 121-128.
- ADELMAN R., SAUL R.L., AMES B. N., 1988. *Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 206-208.
- AGARWAL S., SOHAL R.S., 1994. *DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 12332-12335.
- ALEXANDER P., 1967. *The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice*. Symp. Soc. Exp. Biol. 21, 29-50.
- BARTOSZ G., 1995. *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BOFFOLI D., SCACCO S. C., VERGARI R., SOLARINO G., SANTACROCE G., PAPA S., 1994. *Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle*. Biochim. Biophys. Acta. 1226, 73-82.
- CHEN Q., FISCHER A., REAGAN J. D., YAN L.-J., AMES B. N., 1995. *Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 4337-4341.
- COOPER J. M., MANN V. M., SCHAPIRA A. H. V., 1992. *Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of aging*. J. Neurol. Sci. 113, 91-98.
- CROTEAU D. L., BOHR V. A., 1997. *Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells*. J. Biol. Chem. 272, 25409-25412.
- DIZDAROGLU M., OLIŃSKI R., DOROSHOW J. H., AKMAN S., 1993. *Modification of DNA bases in chromatin of intact human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes*. Cancer Res. 53, 1269-1272.
- DORGAN J. F., SCHATZKIN A., 1991. *Antioxidant micronutrients in cancer prevention*. Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 5, 43-68.
- FRAGA C. G., SHIGENAGA M. K., PARK J.-W., 1990. *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 4533-4537.
- FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SIEDE W., 1995. *DNA repair and mutagenesis*. Am. Soc. Microbiol. (Washington, DC).
- GVOZDIAKOVA A., KUCHARSKA J., GVOZDIAK J., 1992. *Effect of smoking on the oxidative processes of cardiomyocytes*. Cardiology 81, 81-84.
- HALLIWELL B., ARUOMA O. I., 1991. *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*. FEBS Lett. 281, 9-19.
- HARMAN D., 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11, 298-300.
- HARMAN D., 1994. *Free radical theory of aging. Increasing the functional life span*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 717, 1-15.
- HAYAKAWA M., TORII K., SUGIYAMA S., 1991. *Age-associated accumulation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1023-1029.
- HAYAKAWA M., HATTORI K., SUGIYAMA S., OZAWA T., 1992. *Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 979-985.
- HAYFLICK L., 1989. *Antecedents of cell aging research*. Exp. Gerontol. 24, 355-365.
- HAYFLICK L., 1991. *Aging under glass*. Mutation Res. 256, 69-80.

- HOMMA Y., TSUNODA M., KASAI H., 1994. Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1063–1068.
- JURGOWIAK M., OLIŃSKI R., 1997a. Mitochondria a choroby i starzenie się. *Gerontologia Polska* 5, 12–16.
- JURGOWIAK M., OLIŃSKI R., 1997b. Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się. *Post. Biochem.* 43, 30–40.
- KANEKO T., TAHARA S., MATSUO M., 1996. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutation Res.* 316, 277–285.
- KANUNGO M. S., 1980. *Theories of aging*. [W:] *Biochemistry of ageing*. Acad. Press. Inc. London, 242–275.
- KASAI H., NISHIMURA S., 1991. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. [W:] *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. Sies H (red.). Academic Press, London, str. 96–116.
- KEHRER J. P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev. Toxicol.* 23, 21–48.
- LOFT S., ASTRUP A., BUEMANN B., POULSEN H. E., 1994. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* 8, 534–537.
- LEANDERSON P., TAGESSON C., 1992. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem.-Biol. Interact.* 810, 197–208.
- LINNANE A. W., MARZUKI S., OZAWA T., TANAKA M., 1989. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* 1, 642–645.
- LEZZA A. M. S., BOFFOLI D., SCACCO S., CANTATORE P., GDALETA M. N., 1994. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 772–779.
- MECOCCHI P., USHA MacGARVEY M. S., KAUFMAN A. E., KOONTZ D., 1993. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34, 609–616.
- MECOCCHI P., FANO G., FULLE S., SHINOBU L., POLIDORI M. C., 1999. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free. Rad. Biol. Med.* 26, 303–308.
- MIQUEL J., 1992. An update on the mitochondrial DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutation Res.* 275, 209–216.
- OLIŃSKI R., 1993. Uszkodzenia DNA indukowane działaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 47, 463–474.
- OLIŃSKI R., JURGOWIAK M., 1996. *Reaktywne formy tlenu – uniwersalny czynnik patogeny? [W:] Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*. BARCISZEWSKI J., ŁASTOWSKI K., TWARDOWSKI T. (red.). Wydawnictwo Sorus, Poznań, str. 373–400.
- OLIŃSKI R., JARUGA P., ZASTAWNY T. H., 1998. Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim. Polon.* 45, 561–572.
- RICHTER C., 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Res.* 275, 249–255.
- 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.
- ROOYACKERS O. E., ADEY D. B., ADES P. A., NAIR K. S., 1996. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15364–15369.
- SAI K., TAKAGI A., UMEMURA T., HASEGAWA R., KUROKAWA Y., 1992. Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11, 139–143.
- SANCHEZ-RAMOS J. R., OVERIK E., AMES B. N. 1994. A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinsons disease brain. *Neurodegeneration* 3, 197–204.
- SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M., AMES B. N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10771–10778.
- SHIGENAGA M. K., AMES B. N., 1991. Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Rad. Biol. Med.* 10, 211–216.
- SOHAL R. S., AGARWAL A., AGARWAL S., ORR W. C., 1995. Simultaneous overexpression of copper- and zink-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 270, 15671–15674.
- SUMMERFIELD F. W., TAPPEL A. L., 1984. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 408–416.
- TAKASAWA M., HAYAKAWA M., SUGIYAMA S., HATTORI K., ITO T., OZAWA T., 1993. Age-associated damage in mitochondrial function in rats hearts. *Exp. Gerontol.* 28, 269–280.
- WALLACE D. W., 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256, 628–632.
- ZASTAWNY T. H., DĄBROWSKA M., JASKÓLSKI T., KLIMARCZYK M., KULIŃSKI L., KOSZELA A., SZCZĘŚNIEWICZ M., ŚLIWIŃSKA M., WITKOWSKI P., OLIŃSKI R., 1988. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 722–725.