

Agnieszka Piotrowska^{1,✉}

Ewa Bartnik^{1,2}

¹Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

²Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

✉Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel.: (22) 592 22 39, e-mail: apiotrowska@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 28 marca 2014 r.

Artykuł zaakceptowano 2 kwietnia 2014 r.

Słowa kluczowe: wolne rodniki, reaktywne formy tlenu, wolnorodnikowa teoria starzenia, uszkodzenia oksydacyjne, mitochondria, starzenie

Wykaz skrótów: GPx – peroksydaza glutationowa; mtDNA – mitochondrialny DNA; RFT – reaktywne formy tlenu; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa; MCAT – peroksysomalna katalaza kierowana do mitochondriów

STRESZCZENIE

Starzenie jest biologicznym fenomenem, wpisanym w historię życia organizmów wielokomórkowych. Od czasu podjęcia pierwszych prób wyjaśnienia przyczyn starzenia aż do dnia dzisiejszego przeprowadzono wiele badań w celu zrozumienia mechanizmów starzenia i zaproponowano wiele teorii wyjaśniających to zjawisko. Jedną z nich, wolnorodnikowa teoria starzenia, postuluje, że za proces starzenia odpowiedzialne są wolne rodniki, niezwykle reaktywne chemicznie cząsteczki, powstające głównie w mitochondriach komórek w wyniku redukcji tlenu cząsteczkowego. Toksyczny efekt reaktywnych form tlenu na składniki komórkowe prowadzi do akumulacji uszkodzeń oksydacyjnych i nieprawidłowego funkcjonowania komórek. Teoria wolnorodnikowa była przez wiele lat jedną z najpopularniejszych teorii starzenia. Lata badań przeprowadzanych na różnych organizmach modelowych, mających na celu szczegółową weryfikację tej teorii, dostarczyły ogromną ilość danych, zarówno stojących w zgodzie z teorią, jak i przedstawiających silne dowody przeciw niej. Obecnie, teoria ta jest uznawana za fałszywą.

WPROWADZENIE

Problem starzenia się żywych organizmów od wieków budzi szczególne zainteresowanie w świecie naukowym. Uniwersalność tego zjawiska sugeruje, że procesy leżące u jego podłoża są w istocie takie same u wszystkich organizmów, ale dokładne przyczyny są słabo zrozumiane. Starzenie jest złożonym procesem biologicznym, który trudno zdefiniować jednoznacznie, ale podstawowe obserwacje wskazują, że organizmy starzeją się, ponieważ starzeją się komórki, z których są zbudowane, osiągając limit swoich podziałów [1]. Ogólna definicja starzenia proponuje, że jest to proces degeneracyjny spowodowany akumulacją z upływem czasu różnych uszkodzeń na różnych poziomach w komórce, prowadzących do zaburzenia utrzymania integralności i funkcjonalności wszystkich jej składników, a w efekcie nieprawidłowego funkcjonowania, stopniowej niewydolności tkanek i śmierci organizmu [1]. Pesymistyczne spojrzenie na proces starzenia ujmuje więc to zjawisko jako stopniowy spadek biologicznych funkcji organizmu z upływem czasu, co prowadzi również do zwiększenia wrażliwości na czynniki środowiskowe [2]. Wydaje się, że na procesy zachodzące w starzejących się komórkach wpływ ma wiele czynników, zarówno wewnętrznych, genetycznych, jak i środowiskowych, co potwierdzają liczne badania. Od czasu podjęcia pierwszych prób wyjaśnienia przyczyn starzenia aż do dnia dzisiejszego przeprowadzono wiele badań w celu zrozumienia mechanizmów starzenia i zaproponowano wiele teorii wyjaśniających to zjawisko. Wydaje się, że każda z nich niesie część prawdy, jednak żadna nie tłumaczy wszystkich aspektów starzenia. Dokładna przyczyna bądź przyczyny i mechanizm rozwoju fenotypu starczego nadal nie są poznane [1]. Wśród najważniejszych i najbardziej znanych hipotez na temat starzenia należy wymienić teorię wolnorodnikową, znaną także jako teoria stresu oksydacyjnego.

REAKTYWNE FORMY TLENU I WOLNORODNIKOWA TEORIA STARZENIA

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym komórkom organizmów tlenowych do szeregu reakcji enzymatycznych, w wyniku których substancje organiczne utleniane są ostatecznie do dwutlenku węgla i wody z uwolnieniem energii niezbędnej do przeprowadzania licznych procesów metabolicznych. Są to reakcje znane jako oddychanie komórkowe. Z drugiej strony tlen jest dla komórek w pewnym stopniu związkem toksycznym – wolne rodniki, powstające jako produkty uboczne reakcji tlenowych, uszkadzają składniki komórkowe [3].

Reaktywne formy tlenu (RFT) są produktami kolejnych stopni redukcji cząsteczki tlenu. Redukcja ta może przebiegać poprzez sukcesywne przekazywanie elektronów na tlen, w etapach jedno- lub dwuelektronowych, bądź w jednym czteroelektronowym. Produkty redukcji i wzbudzenia tlenu cząsteczkowego, takie jak nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy oraz

formy im pokrewne, są bardziej reaktywne niż cząsteczka tlenu w podstawowym, trypletowym stanie [3].

MITOCHONDRIA A RFT

Mitochondria są cytoplazmatycznymi organellami, niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Są one odpowiedzialne za oddychanie komórkowe – ich podstawowym zadaniem jest przeprowadzanie fosforylacji oksydacyjnej przy udziale łańcucha oddechowego, który tworzą cztery wielopodjednostkowe kompleksy enzymatyczne i syntaza ATP zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W wyniku tego procesu powstaje trifosforan adenozyliny (ATP), podstawowy nośnik energii biologicznej. Obecnie wiadomo, że mitochondria pełnią wiele innych ważnych funkcji związanych z utrzymaniem homeostazy w komórce. Regulują rozmaite szlaki metaboliczne i sygnałowe (zaangażowane są m.in. w metabolizm nukleotydów, aminokwasów i lipidów), odgrywają ważną rolę w gospodarce wapniowej, a także programowanej śmierci komórki. Zaburzenia funkcjonowania mitochondriów prowadzą do szeregu tzw. chorób mitochondrialnych. Defekty fosforylacji oksydacyjnej występują też m.in. w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona i Alzheimera [4,5].

Mitochondria zawierają własną informację genetyczną w postaci mitochondrialnego DNA (mtDNA). Ludzki genom mitochondrialny jest kolistą dwuniciową cząsteczką o wielkości 16,6 kpz, kodującą 13 białek, będących niezbędnymi składnikami kompleksów łańcucha oddechowego oraz 22 tRNA i 2 rRNA, wchodzące w skład mitochondrialnego aparatu translacyjnego [4].

Uważa się, że mitochondrialny łańcuch oddechowy jest głównym miejscem produkcji RFT w komórce. Mitochondria, wykorzystując prawie 90% tlenu komórkowego w reakcjach enzymów oddechowych, są miejscem największego stężenia tego pierwiastka, a zawierając największą ilość enzymów i koenzymów zaangażowanych w transfer elektronów w łańcuchu oddechowym leżą u podłoża komórkowego stresu oksydacyjnego [2]. RFT, tworzone jako produkty uboczne normalnej funkcji mitochondriów, powstają głównie na poziomie kompleksu I i III podczas transportu elektronów, ok. 1–2% tlenu mitochondrialnego nie jest redukowane do wody, ale raczej do rodnika ponadtlenkowego m.in. podczas utleniania zredukowanego koenzymu Q (ubichinonu). Powstały rodnik ponadtlenkowy może być przekształcony w inne formy RFT, np. w wyniku jego neutralizacji powstaje nadtlenek wodoru, który z kolei może być przekształcony w reakcji Fentona w obecności metali przejściowych do wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego [2,6].

Oprócz łańcucha oddechowego w mitochondriach istnieje kilka innych źródeł RFT, np. reakcje enzymów oksydazy monoaminowej czy dehydrogenazy α -ketoglutaranowej. W dużo mniejszym stopniu RFT są produkowane w pozamitochondrialnych strukturach, ok. 10–15% tlenu wykorzystywanego przez komórki jest używanych do cytoplazmatycznych reakcji oksydaz (np. oksydazy NADPH), mieloperoksydaz, oksygenaz i reakcji nieenzymatycznych [2].

USZKODZENIA SPOWODOWANE PRZEZ RFT MOGĄ POWODOWAĆ DYSFUNKCJĘ KOMÓREK

Wolne rodniki, jako niezwykle reaktywne cząsteczki, reagują w zasadzie ze wszystkimi składnikami komórek. Uszkodzenia komórkowe spowodowane działaniem wolnych rodników są definiowane jako stan stresu oksydacyjnego. Zakres uszkodzeń oksydacyjnych komórki determinuje czy przetrwa, stanie się dysfunkcyjna lub umrze. Wolne rodniki powodują największe uszkodzenia oksydacyjne w takich cząsteczkach jak lipidy, białka i DNA [2].

Utlenianie ważnych cząsteczek biologicznych prowadzi do zaburzeń ich struktury, a przez to funkcjonowania w komórce, co w efekcie może skutkować kaskadą procesów kończących się jej dysfunkcją i śmiercią. W wyniku utleniania grup funkcyjnych łańcuchów bocznych białek (grup aminowych, karboksylowych) może dochodzić do fragmentacji lub agregacji cząsteczek, zmian w tempie ich degradacji i obrotu. W procesie tzw. sieciowania (ang. *cross-linking*) mogą powstawać również dodatkowe wiązania w obrębie cząsteczki lub międzycząsteczkowe z innymi grupami funkcyjnymi białek. Prowadzą one najczęściej do utraty lub upośledzenia funkcji cząsteczki biologicznej. Działanie wolnych rodników na cząsteczki lipidów prowadzi do ich peroksydacji, a w efekcie do fizykochemicznych uszkodzeń błon komórkowych, zmian ich elastyczności i płynności oraz modyfikacji przepuszczalności. Peroksydacja lipidów znacznie wzrasta z wiekiem. Uważa się, że błony komórkowe, a w szczególności błony mitochondrialne, są narażone na najpoważniejsze uszkodzenia, ponieważ właśnie tam produkowana jest większość wolnych rodników. Uszkodzenia oksydacyjne DNA mają miejsce przez całe życie komórki i pojawiają się jako zmiany w zasadach azotowych i resztach deoksyrybozy oraz jako rozerwanie łańcucha. Mogą one prowadzić do powstawania mutacji w wyniku kolejnych rund replikacji uszkodzonego DNA. W procesie starzenia obserwuje się zjawisko akumulacji zmian i mutacji w DNA wywołanych stresem oksydacyjnym, a także obniżenia wydajności systemów zapobiegania i naprawy uszkodzeń DNA. Indukcja uszkodzeń w łańcuchu DNA prowadzi do zahamowania proliferacji i ostatecznie do apoptozy [2,3].

Utlenianie cząsteczek biologicznych, ich dezaktywacja oraz niszczenie organelli komórkowych przez wolne rodniki prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania komórek. Szkodliwy efekt RFT na makrocząsteczki obserwuje się w przypadku wielu patologii, również związanych z wiekiem, u ludzi, m.in. w takich zaburzeniach jak cukrzyca, retinopatia, nowotwory, miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów czy choroba Alzheimera [2].

WOLNORODNIKOWA TEORIA STARZENIA I JEJ ZMIANY

W 1956 roku Amerykanin Denham Harman wysunął hipotezę, że za starzenie się organizmów bezpośrednio odpowiedzialne są wolne rodniki. Teoria ta, znana dziś jako wolnorodnikowa teoria starzenia, postuluje, że te bardzo reaktywne chemicznie cząsteczki, normalnie powstające w żywych komórkach, mają toksyczny wpływ na różne składniki komórkowe. W wyniku niespecyficznych reakcji indukują ich uszkodzenia oksydacyjne, których akumulacja skutkuje upośledzeniem funkcji fizjologicznych komórek i tkanek, co prowadzi do roz-

woju procesu starzenia i wystąpienia chorób z nim związanych, a ostatecznie do śmierci organizmu [7,8].

Wolnorodnikowa teoria starzenia zyskała na wiarygodności, gdy w 1968 roku Irwin Fridovich odkrył dysmutazę ponadtlenkową (SOD, ang. *superoxide dismutase*). Badając redukcję cytochromu *c* przez oksydazę ksantynową Fridovich doszedł do wniosku, że zachodzi ona za pośrednictwem uwalnianego przez oksydazę ksantynową wolnego rodnika, rodnika ponadtlenkowego, jednego z najgroźniejszych wolnych rodników powstających wewnątrz komórki. Stwierdzono, że SOD hamuje redukcję cytochromu *c*, że może to robić jedynie inaktywując anionorodnik ponadtlenkowy. Był więc to pierwszy enzym, którego substratem jest wolny rodnik [9].

Przypisanie głównego udziału w produkcji RFT mitochondriom, które są przez to najbardziej wrażliwą na działanie wolnych rodników częścią komórki, doprowadziło do rozszerzenia teorii wolnorodnikowej [10]. Mitochondrialna teoria starzenia postuluje, że szkodliwe działanie RFT prowadzi do mutacji mtDNA i uszkodzeń oksydacyjnych innych składników mitochondriów. Uszkodzenia te zaburzają funkcjonowanie łańcucha oddechowego, co z kolei prowadzi do wzmożonej produkcji RFT i dalszej mutagenyzy genomu mitochondrialnego. Postępujące uszkodzenia składników komórki i ich akumulacja wraz z wiekiem, w wyniku zjawiska błędnego koła, prowadzą ostatecznie do dysfunkcji mitochondriów i komórki oraz rozwoju procesu starzenia [2,10,11].

MUTACJE mtDNA A STARZENIE

Mitochondrialna teoria starzenia proponuje, że akumulacja mutacji mtDNA jest podstawową przyczyną i czynnikiem napędzającym proces starzenia. Spadek funkcji mitochondrialnych spowodowany defektami mtDNA, a w szczególności zaburzenie aktywności łańcucha oddechowego i obniżenie produkcji ATP, prowadzi w konsekwencji do upośledzenia funkcjonowania komórek. Skutki te są najbardziej widoczne w tkankach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, takich jak tkanka nerwowa czy mięśnie szkieletowe. Wraz z wiekiem obserwuje się akumulację zmutowanych cząsteczek mtDNA w komórkach somatycznych, a także obniżenie wydolności (i liczby) mitochondriów, co wydaje się potwierdzać słuszność powyższej teorii [2,10].

Zaobserwowana postępująca akumulacja mutacji mtDNA może być wyjaśniona przez dwa mechanizmy: błędy replikacji i nieskuteczną naprawę uszkodzeń DNA. Replikacja mtDNA jest niezależna od replikacji jądrowego DNA i cyklu komórkowego. Wstawienie nieprawidłowego nukleotydu przez mitochondrialną polimerazę DNA (i brak jego naprawy) prowadzi więc do klonalnej ekspansji zmutowanych cząsteczek w wyniku kolejnych rund replikacji mtDNA. Z drugiej strony, akumulacja uszkodzeń, np. indukowanych przez RFT, może przewyższać skuteczność systemów naprawy uszkodzeń DNA w mitochondriach, prowadząc do postępującej akumulacji mutacji mtDNA z upływem czasu. Wraz z wiekiem obserwuje się również spadek wydajności systemów naprawy mtDNA. Opisano wiele zespołów chorobowych związanych z obecnością mutacji punktowych i delecji mtDNA u ludzi [2,6,11].

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ MITOCHONDRIÓW

W komórkach występuje szereg mechanizmów kontrolnych zapobiegających rozprzestrzenianiu się defektów prowadzących do ich dysfunkcji lub większych uszkodzeń na poziomie tkanki. Kiedy poziom nieodwracalnych uszkodzeń oksydacyjnych w mitochondriach rośnie, mimo pracy systemów antyoksydacyjnych, włączony zostaje mechanizm tzw. samobójstwa mitochondriów – mitoptozy (w analogii do apoptozy, programowanej śmierci komórkowej). Koncepcja mitoptozy postuluje, że RFT są główną przyczyną sekwencji wydarzeń prowadzących do destrukcji i eliminacji mitochondriów. Wolne rodniki utleniają białkowy kanał antyportowy ATP/ADP, którego przepuszczalność staje się niespecyficzna, robi się on przenikalny dla wszystkich rodzajów małych cząsteczek. Pojawienie się takiego niespecyficznego poru w wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadzi do zaburzenia równowagi osmotycznej pomiędzy matryks mitochondrialną, a przestrzenią międzybłonową, utrzymywaną do tego momentu przede wszystkim dzięki nieprzepuszczalności błony dla jonów Cl^- i K^+ . W celu wyrównania ciśnienia osmotycznego następuje napływ wody do mitochondriów, co powoduje ich pęcznienie, a w konsekwencji rozerwanie błony zewnętrznej, fragmentację mitochondriów i uwolnienie cytochromu *c*, białka apoptotycznego, do cytoplazmy. Tak więc mitoptoza jest mechanizmem zapobiegającym akumulacji uszkodzonych mitochondriów w komórce. Ponadto mitochondria zawierają szereg czynników proapoptotycznych, które w odpowiedzi na specyficzne sygnały uruchamiają kaskadę procesów prowadzących do apoptozy komórki (szlak zależny od mitochondriów) [2].

NIEŚCISŁOŚCI WOLNORODNIKOWEJ TEORII STARZENIA

Jak wspomniano wcześniej, wolnorodnikowa teoria starzenia zdobyła dużą popularność i przez wiele lat uważana była za jedną z najlepiej odzwierciedlających przyczynę tego zjawiska. Ze względu na łatwość eksperymentalnego sprawdzenia prawdziwości niektórych jej aspektów, bez wątpliwości była najczęściej badaną i najbardziej rozpoznawalną teorią starzenia. Liczne badania weryfikujące jej słuszność, przeprowadzane na różnych organizmach modelowych, opierały się na kilku obserwacjach, z których wysunięto założenia teorii: 1) wraz z wiekiem funkcja mitochondrialna pogarsza się, a produkcja RFT w mitochondriach rośnie; 2) aktywność niektórych enzymów wymiatających RFT obniża się wraz z wiekiem; 3) mutacje mtDNA akumulują wraz z wiekiem [6]. W świetle powyższych obserwacji, przeprowadzane badania testowały następujące aspekty teorii: a) uszkodzenia oksydacyjne, indukowane RFT, są nieuniknione lub niemożliwe do całkowitej naprawy; b) nieuchronna akumulacja uszkodzeń oksydacyjnych składników mitochondriów skutkuje pogarszaniem się funkcjonowania mitochondriów z upływem czasu; c) globalne, w tym nie-mitochondrialne, uszkodzenia oksydacyjne akumulują z fenotypem starczym [7,8]. Duża część wspomnianych badań dostarczyła silnych dowodów przeciwko słuszności wolnorodnikowej teorii starzenia, znaczne sprzeczności wyników badań z założeniami teorii (Tab. 1) doprowadziły do postawienia jej wielu zarzutów. Najważniejsze wątpliwości względem teorii zostaną omówione poniżej.

OBRONA ANTYOKSYDACYJNA

Zgodnie z założeniami wolnorodnikowej teorii starzenia, długość życia jest determinowana przez tempo uszkodzeń indukowanych przez wolne rodniki na poziomie komórki i tkanki. Komórki posiadają szereg mechanizmów, które chronią je przed szkodliwym działaniem RFT i uszkodzeniami oksydacyjnymi. Są to wspomniane wcześniej białka neutralizujące RFT do mniej szkodliwych związków na drodze enzymatycznej (katalaza, peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa) i drobnocząsteczkowe antyoksydanty w postaci m.in. glutationu, witamin C i E, magnezu, seleniu, cynku, flawonoidów, β -karotenów czy retinolu. Mechanizmy te w miarę starzenia się organizmu działają coraz mniej sprawnie. Równowaga pomiędzy związkami utleniającymi i antyoksydantami jest niezbędna w komórce, by mogła ona prawidłowo funkcjonować. Obniżenie poziomu RFT poprzez wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej w komórce powinno zatem spowolnić rozwój zmian związanych z wiekiem i ostatecznie skutkować wydłużeniem długości życia. Brak jasnej korelacji między skutecznością obrony antyoksydacyjnej a długowiecznością poddaje w wątpliwość przyczynową rolę uszkodzeń oksydacyjnych w procesie starzenia [6,8].

DIETA

Dieta bogata w składniki o właściwościach antyoksydacyjnych powinna pozwolić na spowolnienie procesu starzenia.

Regulacja tego parametru bezpośrednio w odpowiedzi na suplementację antyoksydantów, np. polepszenie funkcji komórkowych, obniżenie poziomu stresu oksydacyjnego i przeciwdziałanie spadkowi obrony antyoksydacyjnej związanej z wiekiem, w eksperymentach przeprowadzanych na różnych organizmach byłaby zasadniczą obserwacją przemawiającą na korzyść słuszności teorii [6,8]. Zbadano wpływ potencjalnie obiecujących związków o właściwościach antyoksydacyjnych, takich jak resweratrol, na długość życia w różnych organizmach modelowych. Mimo że bezkręgowce organizmy charakteryzowały się wydłużeniem długości życia, to ssaki, takie jak myszy, nie wykazywały spowolnienia tempa starzenia, pomimo pewnych korzystnych efektów na zdrowie zwierząt [8,12]. Dieta bogata w koenzym Q10, dobrze znany antyoksydant mitochondrialny, nie miała żadnych efektów na długość życia myszy, nawet w przypadku skutecznego zwiększenia stężenia koenzymu Q10 w mitochondriach [13]. Mimo licznych testów farmakologicznych i prób klinicznych z obiecującymi związkami na ssakach, do dziś nie odniesiono sukcesu, a wyniki na *Drosophila* są niejednoznaczne [14]. Badania nad wpływem suplementacji witamin w diecie prowadzone z udziałem ludzi nie tylko nie wykazały korzystnych efektów na zdrowie i rozwój zmian związanych z wiekiem, ale wręcz ujawniły niepożądane skutki, a nawet zwiększenie ryzyka śmierci, co doprowadziło do natychmiastowego porzucenia dalszych badań klinicznych [15,16]. Rezultaty tych badań wskazują na możliwe szkodliwe działanie antyoksydantów stosowanych profilaktycznie lub pod kątem terapeutycznym. Wyniki przy-

Tabela 1. Podsumowanie wyników badań weryfikujących założenia wolnorodnikowej teorii starzenia.

Hipoteza	Organizm modelowy	Eksperyment	Efekt na długość życia	Piśmiennictwo
Suplementacja antyoksydantami obniża poziom RFT i wydłuża życie	bezkęrowe organizmy modelowe		↑	[14]
	myszy	m.in. wpływ resweratrolu, koenzymu Q10, witamin	—	[12,13]
	ludzie		↓	[15,16]
Nadprodukcja enzymów antyoksydacyjnych obniża poziom RFT i wydłuża życie	<i>Drosophila melanogaster</i>	Cu/ZnSOD, MnSOD, katalaza	↑	[17,18]
	myszy	Cu/ZnSOD, MnSOD, MCAT	— ↑	[19] [20]
Inaktywacja enzymów antyoksydacyjnych podwyższa poziom RFT i skraca życie	<i>Caenorhabditis elegans</i>	sod1-5 sod2	— ↑	[21] [22]
	myszy	MnSOD	—	[23]
		GPx4	↑	[24]
U zwierząt długowiecznych występuje obniżony poziom RFT	golce	podwyższony poziom RFT	długie życie	[27]
	<i>Drosophila melanogaster</i>	obniżony poziom RFT	długie życie	[28]
Modyfikacja innych białek niezbędnych do funkcji mitochondriów ma wpływ na produkcję RFT i długość życia	<i>Caenorhabditis elegans</i>	mutacja <i>isp-1</i> (Risp)	↑	[25]
		mutacja <i>clk1</i> (Mclk1)	↑	[29]
	myszy	mutacja <i>Risp</i>	↓ u samców*	[26]
		inaktywacja <i>Mclk1</i>	↑**	[30,31]
		mutacja <i>PolgA</i>	↓*	[34,35]
	mutacja <i>Twinkle</i>	—	[37]	

↑ wydłużenie długości życia; ↓ skrócenie długości życia; — bez zmian długości życia; * brak zmian poziomu stresu oksydacyjnego; ** zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego

toczonych badań z udziałem ludzi i na zwierzętach nie są jednak całkowicie bezdyskusyjne, postawiono zarzuty dotyczące m.in. czasu trwania kuracji antyoksydantami jako parametru mogącego powodować znaczne rozbieżności wyników. Obecność innych specyficznych związków lub określonych warunków fizjologicznych również może modyfikować skuteczność działania danego antyoksydantu. Trudności dostarczenia antyoksydantów w odpowiednich stężeniach, bez indukowania szkodliwych efektów na regulacyjne funkcje RFT, także mogą być przyczyną braku ich wpływu na wydłużenie długości życia badanych organizmów [6,8].

ENZYMY ANTYOKSYDACYJNE

Główne enzymatyczne mechanizmy obronne przed szkodliwym działaniem wolnych rodników w komórkach eukariotycznych opierają się na aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej. Dysmutaza ponadtlenkowa występuje w dwóch odmianach w komórkach: Cu/ZnSOD (SOD1), która występuje głównie w cytoplazmie, i MnSOD (SOD2), lokalizująca się w mitochondriach. Białko to jest jedynym enzymem antyoksydacyjnym, występującym u wszystkich organizmów tlenowych, zdolnym do neutralizacji rodnika ponadtlenkowego, głównego rodzaju RFT produkowanego w komórkach. Dysmutaza przekształca rodnik ponadtlenkowy do nadtlenu wodoru, który jest dalej rozkładany przez katalazę do tlenu cząsteczkowego i wody. Te i inne komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne nie są jednak stuprocentowo wydajne [17].

Z założeń wolnorodnikowej teorii starzenia można wnioskować, że: 1) nadekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne skutkować będzie obniżeniem poziomu RFT i mitochondrialnego lub globalnego stresu oksydacyjnego; 2) spadek lub całkowity brak aktywności enzymów antyoksydacyjnych spowoduje wzrost uszkodzeń oksydacyjnych. Genetyczna manipulacja genami kodującymi enzymy antyoksydacyjne pozwoliła na stworzenie różnych zwierzęcych modeli, służących weryfikacji słuszności teorii. Odpowiednio wydłużona lub obniżona długość życia u badanych zwierząt transgenicznych w efekcie tych manipulacji byłaby kluczowym dowodem potwierdzającym wiarygodność teorii wolnorodnikowej [8].

Wyniki przeprowadzonych badań okazały się dość zaskakujące, nie uzyskano oczywistej i jednoznacznej korelacji wymienionych parametrów. Wzmocniona synteza kluczowych enzymów antyoksydacyjnych, SOD1, SOD2 i katalazy, wpłynęła na wydłużenie długości życia u bezkręgowców (*Drosophila*), ale nie u ssaków, takich jak myszy [18,19]. Wzmocniona synteza zasadniczej obrony przed rodnikami ponadtlenkowymi w mitochondriach, SOD2, nie była w stanie spowolnić procesu starzenia u badanych myszy transgenicznych, podobnie jak nadprodukcja SOD1. Nawet równoczesna nadprodukcja obu odmian dysmutazy u podwójnie transgenicznych zwierząt nie powodowała zmiany długości życia, mimo wzmocnienia oporności komórek na stres oksydacyjny [19].

Indukowana nadprodukcja transgenicznego mitochondrialnego enzymu MnSOD w modelowym organizmie *Drosophila melanogaster* spowodowała wydłużenie maksymalnej długości życia tych organizmów (proporcjonalnie do ilości enzymu) [17]. Jednoczesna nadprodukcja MnSOD i katalazy

nie wzmocniła dodatkowo efektu wydłużenia życia (katalaza obecna jest w komórkach *D. melanogaster* w nadmiarze). Nadprodukcja Cu/ZnSOD również skutkowała wydłużeniem długości życia muszek owocowych [17]. Wydaje się więc, że wzrost długości życia koreluje ze zwiększoną opornością na stres oksydacyjny w wyniku podniesienia ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, takich jak Cu/ZnSOD i MnSOD.

Nadprodukcja ludzkiej peroksysomalnej katalazy kierowanej do mitochondriów (MCAT) u myszy również potwierdza wiarygodność teorii wolnorodnikowej. Zaobserwowano, że takie myszy żyją dłużej niż ich dzikie rodzeństwo [20]. Odnotowano również osłabienie rozwoju niektórych patologii związanych z wiekiem i pewne korzystne efekty na zdrowie zwierząt. Jednakże pojawiły się wątpliwości co do interpretacji wyników. Kwestia wydłużenia długości życia, oceniana po 2–4 krzyżówkach wstecznych z myszami C57B6, była mniej ewidentna po kolejnych krzyżówkach. Oznacza to, że wydłużenie długości życia jest, przynajmniej w części, spowodowane również wpływem innych alleli. Ponadto, nie zaobserwowano wzrostu długości życia zwierząt w eksperymencie badającym efekty niecelowanej nadprodukcji katalazy, osobno lub równocześnie z SOD2 [19]. Co więcej, synteza MCAT nie jest równomierna we wszystkich tkankach, co może zniekształcać obraz prawdziwych efektów. Wyniki analizy aktywności akonitazy sugerują, że wewnątrzmitochondrialny status oksydacyjny (oporność na stres) jest niezmienny przez ekspresję MCAT. Wiedząc, że katalaza jest głównym zmiataczem nadtlenu wodoru, który jest uważany za ważny mediator w mitochondrialnej transdukcji sygnału, trudno wykluczyć możliwość, że fenotyp długowieczności nie wynika w tym przypadku bezpośrednio z obniżenia poziomu mitochondrialnego stresu oksydacyjnego [20].

Zjawisko uniwersalnego występowania dysmutazy ponadtlenkowej postawiło pytania czy jest ona absolutnie niezbędna dla życia zwierzęcia i czy jej inaktywacja spowoduje skrócenie długości życia. Badania na modelowym organizmie *Caenorhabditis elegans*, który został całkowicie pozbawiony aktywności SOD (delecja wszystkich pięciu genów *sod*) wykazały, że zwierzęta te mają normalną długość życia, pomimo zwiększonej wrażliwości na stres środowiskowy [21]. Normalny poziom uszkodzeń oksydacyjnych u tych mutantów sugerował, że organizmy te używają innych mechanizmów zapewniających utrzymanie niskiego poziomu uszkodzeń [21]. Obserwacje te są całkowicie sprzeczne z wynikami badań prowadzonych na innych modelowych organizmach, gdzie inaktywacja pojedynczego genu *sod* (cytoplazmatycznego lub mitochondrialnego) może powodować znaczące skrócenie życia. Wyniki badań na *C. elegans* pokazują, że aktywność SOD nie jest istotna dla przeżycia i regulacji długości życia, ale jest niezbędna do przetrwania ostrego stresu środowiskowego. Ponadto, zwiększona wrażliwość na stres, w tym stres oksydacyjny, nie skutkuje obniżeniem długości życia – utrzymanie normalnej oporności na stres nie jest więc kluczowe dla tempa starzenia [21]. W innym badaniu, analizującym skutki inaktywacji SOD2 w *C. elegans*, zaobserwowano zwiększenie poziomu uszkodzeń oksydacyjnych i ogólnej wrażliwości na stres oksydacyjny. Jednocześnie zwierzęta te charakteryzowały się wydłużeniem długości życia. Obserwacje te paradoksalnie su-

gerują, że wysoki poziom stresu oksydacyjnego może pozytywnie wpływać na długość życia [22].

Częściowa lub całkowita inaktywacja enzymów antyoksydacyjnych u myszy skutkowało w większości przypadków śmiercią zwierząt na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego lub ciężką patologią związaną ze skróceniem życia. Ciężko jest więc stwierdzić, że obserwacje te wynikały z przyspieszenia procesu starzenia i użyc tych wyników jako dowodu wspierającego teorię. Jednakże wiele mutantów miało normalną długość życia [8]. Mutanty myszy *Sod2^{+/-}* okazały się całkowicie przeciwstawiać teorii wolnorodnikowej, długość życia tych zwierząt była normalna, mimo zwiększonego poziomu stresu oksydacyjnego i uszkodzeń oksydacyjnych [23].

Myszy z częściową inaktywacją peroksydazy glutationowej GPx4 (ang. *glutathione peroxidase*) są kolejnym zaskakującym modelem. Gen *Gpx4* koduje jedyny enzym, który bezpośrednio neutralizuje rodniki lipidowe związane z błonami w mitochondriach. Pomimo utraty aktywności tego enzymu antyoksydacyjnego i wysokiego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych u zwierząt tych obserwuje się wydłużenie średniej długości życia [24].

Inne intrygujące doniesienia o wydłużeniu długości życia organizmów modelowych posiadających zaburzenia funkcji mitochondrialnych dotyczą inaktywacji białka RISP (ang. *Rieske iron-sulfur protein*), występującego w kompleksie III łańcucha oddechowego. Mutacja tego białka u nicienia *C. elegans* skutkowało wydłużeniem długości życia, mimo obniżenia ogólnej aktywności enzymatycznej kompleksu III [25]. Myszy *Risp^{+/P224S}*, posiadające mutację w badanym białku, charakteryzowały się podobnym defektem aktywności kompleksu III i zaburzeniem oddychania mitochondrialnego u samców, ale nie u samic [26]. Zarówno u młodych, jak i starych osobników nie zaobserwowano zmian w poziomie markerów stresu oksydacyjnego. Mimo to, u samców zanotowano skrócenie długości życia, chociaż analiza parametrów śmiertelności wykazywała zwiększone ryzyko śmierci u obu płci, bardziej znaczące jednak tylko u samców. Wyniki te wskazują, że nawet stosunkowo niewielkie zaburzenia mitochondrialnego łańcucha oddechowego mogą mieć istotny efekt fizjologiczny u ssaków, zależny od płci. Mechanizm łączący opisywane zaburzenie funkcji mitochondrialnej (spadek aktywności kompleksu łańcucha oddechowego) z procesem starzenia nadal jest niejasny [26].

ZWIERZĘTA DŁUGOWIECZNE

Podobnie jak w przypadku badań aktywności systemów antyoksydacyjnych, poziom produkcji RFT nie koreluje w sposób klarowny z długością życia badanych organizmów [6]. W świecie zwierząt zaobserwowano, że wysoki poziom stresu oksydacyjnego może być związany z wydłużeniem długości życia, co ponownie poddaje w wątpliwość prawdziwość teorii wolnorodnikowej. Golce są najdłużej żyjącym gatunkiem gryzoni, ich maksymalna długość życia wynosi ok. 25–30 lat. Zwierzęta te charakteryzują się wyższym poziomem produkcji RFT i uszkodzeń oksydacyjnych niż odpowiednio dopasowane kontrolne myszy, których maksymalna długość życia sięga 3–4 lat. Długowieczne golce wykazują wysoki poziom uszkodzeń oksydacyjnych i podwyższoną tolerancję na stres

nawet w młodym wieku, co skutkuje lepszą zdolnością tych zwierząt do utrzymania dłuższej funkcjonalności aktywnych cząsteczek z upływem czasu niż u krótko żyjących gatunków [6,8,27]. Powyższe obserwacje również więc wykazują, że zwiększony poziom RFT może powodować wydłużenie długości życia.

Badanie przeprowadzone na różnych szczepach *Drosophila melanogaster* wykazało, że produkcja RFT koreluje z długością życia tych organizmów, szczepy żyjące dłużej wykazywały mniejszą produkcję RFT niż szczepy żyjące krócej, co stoi w zgodzie z założeniami teorii wolnorodnikowej. Ekspresja transgenicznego genu kodującego alternatywną oksydazę (AOX) z *Ciona intestinalis*, która reguluje produkcję wolnych rodników i długość życia u grzybów i roślin, u muszek obniżyła produkcję RFT w mitochondriach, ale nie wydłużyła życia. Mutanty genu *dj-1β*, charakteryzujące się spadkiem funkcji lokomotorycznych i zwiększoną produkcją RFT wraz z wiekiem, mimo wysokiego poziomu RFT nie wykazały skrócenia długości życia. Dwie ostatnie obserwacje wskazują, że teoria wolnorodnikowa jest błędna [28].

MUTANTY MCLK1

Białko MCLK1 jest mitochondrialną hydroksylazą niezbędną do biosyntezy ubichinonu, ważnego transportera elektronów w łańcuchu oddechowym. Badania na organizmach modelowych z inaktywacją tego enzymu dostarczyły kolejnych dowodów dla korzystnych efektów stresu oksydacyjnego na długość życia. Mutacja genu *clk1* u *C. elegans* i częściowa inaktywacja *Mclk1* u myszy spowodowały wydłużenie długości życia tych zwierząt w porównaniu do kontroli [29,30].

Wyniki analiz fenotypu długo żyjących mutantów myszy *Mclk^{+/-}* zdają się nie do pogodzenia z wolnorodnikową teorią starzenia. Mimo że poziom ubichinonu jest normalny, u tych mutantów obserwuje się zaburzenie funkcji mitochondriów, m.in. spowolnienie transportu elektronów, zmniejszoną produkcję ATP czy zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego. Pomimo tych defektów zwierzęta te żyją dłużej [30,31]. Tempo spadku funkcji mitochondrialnych u mutantów *Mclk^{+/-}* wraz z upływem czasu jest mniejsze niż u dzikich myszy, mimo występowania wysokiego poziomu stresu oksydacyjnego. Obserwacja ta implikuje, że stres oksydacyjny nie jest główną przyczyną postępujących z wiekiem uszkodzeń mitochondriów. Przeciwnie, wydaje się, że podwyższony poziom stresu oksydacyjnego u mutantów *Mclk^{+/-}* może być częścią mechanizmu leżącego u podstawy spowolnienia procesu starzenia, co przeczy głównemu założeniu teorii wolnorodnikowej. Mutanty *Mclk^{+/-}* wykazują ponadto niższy poziom cytoplazmatycznych uszkodzeń oksydacyjnych. Ma to szczególnie istotne znaczenie dla funkcji mitochondrialnych, gdyż większość składników mitochondriów jest kodowana w genomie jądrowym i syntetyzowana w cytoplazmie [30,31].

Przypadek myszy *Mclk^{+/-}*, charakteryzujących się podwyższonym poziomem stresu oksydacyjnego już na wczesnym etapie rozwoju, ale paradoksalnie dobrą późniejszą kondycją pod względem rozwoju procesu starzenia, można uznać za pewien rodzaj hormezy. Hormeza definiowana jest jako proces, w którym ekspozycja na niskie dawki związków chemicznych lub czynników środowiskowych, które są szkodliwe w

wyższym stężeniu, indukuje korzystny efekt adaptacyjny w komórce lub organizmie. Koncepcja ta jest analizowana w kontekście badań nad starzeniem. Wykazano, że ekspozycja na niskie dawki szkodliwych czynników, takich jak promieniowanie, stres cieplny czy generatory RFT, mogą mieć różne korzystne efekty antystarzeniowe, wpływające na wydłużenie długości życia. W świetle tych badań, zaproponowano pojęcie mitohormozy; wysoki, ale nieletalny, poziom RFT może powodować inne, korzystne efekty komórkowe i skutkować cytoprotekcją i długowiecznością organizmów [32,33].

MYSZY MUTATOROWE I DELECyjne

Jednym z poważniejszych zarzutów dla wolnorodnikowej teorii starzenia są modele myszy mutatorowych mtDNA (ang. *mtDNA mutator mice*). Myszy te posiadają mutację w domenie egzonukleazowej katalitycznej podjednostki mitochondrialnej polimerazy gamma (*PolgA^{mut}*) [34,35]. Mutacja ta prowadzi do ekspresji białka pozbawionego właściwości korekcyjnych, co powoduje rozległą mutagenezę i akumulację mutacji mtDNA (losowych mutacji punktowych, rozległych delecji). Myszy mutatorowe przejawiają szereg objawów przypominających naturalny proces starzenia, m.in. kifozę, anemię, łysienie, siwienie, utratę słuchu, kardiomiopatię, obniżoną płodność, utratę wagi i skróconą długość życia. Dane doświadczalne sugerują, że wysoka częstość mutacji punktowych mtDNA u myszy mutatorowych prowadzi do syntezy podjednostek łańcucha oddechowego z substytucjami aminokwasów, co powoduje niestabilność kompleksów łańcucha oddechowego [36]. Myszy mutatorowe wykazują nieznaczny wzrost lub brak wzrostu w poziomie produkcji RFT i uszkodzeń oksydacyjnych, mimo że funkcja łańcucha oddechowego jest poważnie uszkodzona. Obserwacja ta przeczy koncepcji błędnego koła, w której RFT i mutacje mtDNA napędzają się wzajemnie, skutkując stopniowym pogarszaniem funkcji mitochondrialnych [34,35].

Myszy delecyjne, które wyrażają zmutowaną wersję Twinkle, mitochondrialnej helikazy DNA, wykazują akumulację niskich poziomów rozległych delecji mtDNA w tkankach postmitotycznych. Pomimo postępującej dysfunkcji łańcucha oddechowego i późno objawowej miopatii mitochondrialnej, nie wykazują one fenotypu przedwczesnego starzenia (progerii) i mają normalną długość życia, co sugeruje, że akumulacja delecji mtDNA i postępująca dysfunkcja łańcucha oddechowego mogą nie wystarczać do przyspieszenia procesu starzenia [37].

Obserwacje wynikające z wyżej przedstawionych badań wykazują, że zwiększony poziom RFT może powodować wydłużenie długości życia, co jest silnym dowodem przeciwko słuszności wolnorodnikowej teorii starzenia. W związku z koniecznością przewartościowania założeń tej teorii, pojawiły się nowe hipotezy dotyczące funkcji RFT i ich udziału w procesie starzenia. Postulują one, że RFT nie są tylko toksycznymi produktami ubocznymi metabolizmu tlenowego, ale mogą również pełnić rolę ważnych cząsteczek sygnałowych. Badania z ostatnich lat potwierdzają możliwość, że RFT biorą udział w różnych procesach fizjologicznych – przede wszystkim jako cząsteczki sygnałowe stresu w odpowiedzi na uszkodzenia komórkowe [6,11,38]. Tak więc fizjologiczny poziom RFT jest prawdopodobnie zasadniczą kwestią dla utrzymania homeostazy komórkowej, podczas gdy wzrost produkcji RFT

ponad pewny poziom ma niekorzystny wpływ na fizjologię komórki [6].

PODSUMOWANIE

Starzenie jest nieuchronnym procesem dotyczącym wszystkich żywych organizmów, jednak dokładne mechanizmy leżące u podłoża tego zjawiska nadal nie są całkowicie poznane. Jedną z najpopularniejszych teorii starzenia, wolnorodnikowa teoria starzenia, postuluje, że szkodliwy wpływ wysoce reaktywnych wolnych rodników, powstających głównie w mitochondriach, na składniki komórkowe i akumulacja uszkodzeń oksydacyjnych są czynnikami odpowiedzialnymi za rozwój procesu starzenia i związanych z nim chorób. Obecnie istnieje wiele zastrzeżeń do słuszności tej teorii. Liczne badania w ostatnich latach wykazują brak oczywistej korelacji między stresem oksydacyjnym a długością życia lub wręcz fałszywość założeń tej teorii. Mimo że dobrze udokumentowano, że nieodwracalne uszkodzenia oksydacyjne akumulują się wraz z wiekiem, nie implikuje to bezpośredniego związku przyczynowo-skutkowego. Stres oksydacyjny może być konsekwencją starzenia, jeśli w istocie proces ten ma odmienne przyczyny, lub może wynikać z niewydolności bliżej nieokreślonego mechanizmu funkcjonowania organizmu i stąd pozornie uczestniczyć w procesie starzenia. Obserwacje fenotypu starczego u organizmów modelowych niewykazujących wzrostu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lub przeciwnie, przypadków wydłużenia życia u organizmów mających wysoki poziom stresu oksydacyjnego sugerują więc, że wolnorodnikowa teoria starzenia jest błędna. Nie ma jednak wątpliwości, że mitochondria pełnią ważną funkcję w procesie starzenia, akumulacja mutacji mtDNA i postępujący z wiekiem spadek funkcji mitochondrialnych nieodwracalnie prowadzą do dysfunkcji komórek. W świetle wzrastającej liczby badań nad rolą RFT w sygnalizacji i regulacji komórkowej nie należy jednak całkowicie odrzucać roli wolnych rodników w procesie starzenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437-447
2. Ivanova DG, Yankova TM (2013) The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span. *Folia Medica* 55: 33-41
3. Strzyżewski K, Pioruńska-Stolzmann M (2007) Historia wolnorodnikowej teorii starzenia się. *Nowiny Lekarskie* 76: 193-194
4. Chinnery PF, Schon EA (2003) Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1188-1199
5. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM (2012) Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol* 226: 274-286
6. Bratic A, Larsson NG (2013) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123: 951-957
7. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
8. Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1-8
9. McCord J, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055
10. Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147
11. Lagouge M, Larsson NG (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med* 273: 529-543
12. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y,

- Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8: 157-168
13. Sohal RS, Kamzalov S, Sumien N, Ferguson M, Rebrin I, Heinrich KR, Forster MJ (2006) Effect of coenzyme Q10 intake on endogenous coenzyme Q content, mitochondrial electron transport chain, antioxidative defenses, and life span of mice. *Free Radic Biol Med* 40: 480-487
 14. Magwere T, West M, Riyahi K, Murphy MP, Smith RA, Partridge L (2006) The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 127: 356-370
 15. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297: 842-857
 16. Walker C (2008) Antioxidant supplements do not improve mortality and may cause harm. *Am Fam Physician* 78: 1079-1080
 17. Sun J, Folk D, Bradley TJ, Tower J (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 661-672
 18. Sun J, 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
 19. Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, Richardson A (2009) The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Ageing Cell* 8: 73-75
 20. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911
 21. Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5785-5790
 22. Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5: e1000361
 23. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A (2003) Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 16: 29-37
 24. Ran Q, Liang H, Ikeno Y, Qi W, Prolla TA, Roberts LJ, Wolf N, Van Remmen H, Richardson A (2007) Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62: 932-942
 25. Feng JL, Bussiere F, Hekimi S (2001) Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* 1: 633-644
 26. Hughes BG, Hekimi S (2011) A mild impairment of mitochondrial electron transport has sex-specific effects on lifespan and aging in mice. *PLoS One* 6: e26116
 27. Andziak B, O'Connor TP, Qi W, DeWaal EM, Pierce A, Chaudhuri AR, Van Remmen H, Buffenstein R (2006) High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Ageing Cell* 5: 463-471
 28. Sanz A, Fernández-Ayala DJM, Stefanatos RKA, Jacobs HT (2010) Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in drosophila. *Ageing* 2: 200-223
 29. Wong A, Boutis P, Hekimi S (1995) Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139: 1247-1259
 30. Lapointe J, Stepanyan Z, Bigras E, Hekimi S (2009) Reversal of the mitochondrial phenotype and slow development of oxidative biomarkers of aging in long-lived *Mcl1^{-/-}* mice. *J Biol Chem* 284: 20364-20374
 31. Lapointe J, Hekimi S (2008) Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Mcl1^{-/-}* mice. *J Biol Chem* 283: 26217-26227
 32. Rattan SI (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 7: 63-78
 33. Tapia PC (2006) Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses* 66: 832-843
 34. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423
 35. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD et al. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-484
 36. Edgar D, Shabalina I, Camara Y, Wredenberg A, Calvaruso MA, Nijtmans L, Nedergaard J, Cannon B, Larsson NG, Trifunovic A (2009) Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* 10: 131-138
 37. Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, Lappalainen I, Ylikallio E, Jalanko A, Spelbrink JN, Paetau A, Suomalainen A (2005) Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17687-17692
 38. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y (2011) Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 21: 569-576

The role of reactive oxygen species and mitochondria in aging

Agnieszka Piotrowska^{1,✉}, Ewa Bartnik^{1,2}

¹Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 5a Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

²Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, 5a Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

✉e-mail: apiotrowska@biol.uw.edu.pl

Key words: reactive oxygen species, free radicals, free radical theory of aging, oxidative damage, mitochondria, aging

ABSTRACT

Aging is a biological phenomenon concerning all living multicellular organisms. Many studies have been conducted to identify the mechanisms underlying this process. To date, multiple theories have been proposed to explain the causes of aging. One of them is the free radical theory which postulates that reactive oxygen species (ROS), extremely reactive chemical molecules, are the major cause of the aging process. These free radicals are mainly produced by the mitochondrial respiratory chain as a result of electron transport and the reduction of the oxygen molecule. Toxic effects of ROS on cellular components lead to accumulation of oxidative damage which causes cellular dysfunction with age. The free radical theory has been one of the most popular theories of aging for many years. Scientific research on different model organisms aiming to verify the theory has produced abundant data, supporting the theory or, on the contrary, suggesting strong evidence against it. At present, the free radical theory of aging is no longer considered to be true.