

Joanna Karolkiewicz

Katedra Fizjologii, Biochemii i Higieny, Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu

Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcję komórek oraz konsekwencje wynikające z uszkodzeń wolnorodnikowych — związek z procesami starzenia

Effects of oxidative stress and free-radical mediated damage on cell structure and function — connection to aging processes

Abstract

The study presents an up to date review of literature on the role of free-radical mediated damage in the processes of aging. Latest reports provide new evidence supporting and extending widely accepted hypothesis of aging. Its contemporary version assumes that increasing with age production of free radicals results in damage of lipids, proteins, mitochondrial and nuclear DNA, as well as disregulates signaling pathways involved in wide spectrum of cellular response. Biologic consequences of marked oxidative lesions in cells are: changed gene expression, mutations, molecular heterogeneity, loss of proliferation potential, impairment of intercellular communication, tissue disorganization, and organ dysfunction. A slow steady accumulation of oxidative damage to macromolecules which increases with age is probably associated with organism life expectancy.

Gerontol. Pol. 2011; 19, 2: 59–67

key words: *aging, free radicals, free radicals damages of lipids, proteins, mitochondrial and nuclear DNA*

Wstęp

Reaktywne formy tlenu i azotu (RONS, *reactive oxygen and nitrogen species*) są molekułami powstającymi w wielu procesach biologicznych. Uwalniane w ilościach fizjologicznych odgrywają rolę mediatorów i regulatorów, zapewniając komórkom ich prawidłowe funkcjonowanie [1]. Jednak wpływ RONS na komórki w dużym stopniu zależy od ich stężenia i czasu działania. Na przykład tlenek azotu (NO) wytwarzany w małych ilościach przez konstytutywne

syntazy NO (nNOS i eNOS) w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych pełni funkcję cząsteczki sygnalizacyjnej zaangażowanej w regulację napięcia ściany naczyń. Natomiast produkowany w dużym stężeniu przez indukowalną syntazę NO (iNOS) w makrofagach, wykazuje właściwości destrukcyjne w stosunku do innych komórek [2]. Wytwarzanie wolnych rodników tlenu i azotu musi zachodzić pod ścisłą kontrolą enzymatycznego i nieenzymatycznego układu antyoksydacyjnego. Jeśli ten system staje się niewydolny i/lub występuje nadmierna produkcja RONS, w komórce może dojść do zaburzenia równowagi między procesami pro- i antyoksydacyjnymi określanego jako stres oksydacyjny [3, 4].

Adres do korespondencji:
dr Joanna Karolkiewicz
Zakład Higieny, Akademia Wychowania Fizycznego
ul. Królowej Jadwigi 27/39, 61–871 Poznań
tel.: 61 835 51 77
e-mail: karolkiewicz@awf.poznan.pl

Krótkotrwały wzrost wytwarzania RONS jest zazwyczaj dobrze tolerowany przez komórki i w takich sytuacjach dochodzi zwykle do zwiększonej aktywności reakcji obronnych. Jednak nasilony lub długo utrzymujący się stan stresu oksydacyjnego, wywołany czynnikami chorobotwórczymi lub szkodliwymi dla zdrowia czynnikami zewnętrznymi, indukuje uszkodzenia składników komórkowych [5].

Już ponad pół wieku temu Harman [6] wykazał, że proces starzenia w warunkach *in vivo* może być rezultatem inicjowanych przez wolne rodniki procesów utleniania, które z upływem lat w znacznym stopniu zaburzają funkcję komórek i strukturę organelli komórkowych. Współczesne badania dostarczyły nowych dowodów, które poszerzyły dotychczas obowiązującą hipotezę starzenia i obecnie według niej nasilająca się wraz z wiekiem produkcja wolnych rodników, zarówno przez mitochondria komórek mięśni szkieletowych, serca, wątroby, jak i przez chronicznie stymulowaną aktywność oksydazy NADPH w leukocytach, może nie tylko uszkadzać składniki komórkowe, ale także powodować zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych płynących do komórek i będących w komórkach [7–9]. W czasie postępującego procesu starzenia, oprócz nasilających się uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach, najprawdopodobniej obniża się jednocześnie skuteczność obrony systemu antyoksydacyjnego i/lub następuje osłabienie systemów naprawy i degradacji [9, 10].

Biologicznymi konsekwencjami wzrostu zniszczeń molekularnych struktur komórkowych są: zmiany ekspresji genów, mutacje, molekularna heterogenność, zanik potencjału dzielenia się komórek, osłabienie komunikacji międzykomórkowej, dezorganizacja tkanek, dysfunkcja organów i wzrost podatności całego organizmu na stres [11].

Ponieważ długość życia jest determinowana przez wiele genów zaangażowanych w metabolizm oraz przez nieustające naprawy struktury i funkcji komórek, tkanek, organów, istnieje ujemna korelacja pomiędzy długością życia a wynikiem nagromadzenia się uszkodzeń komórkowych i tkankowych, zarówno na skutek mutacji i epimutacji, jak i molekularnej oksydacji i agregacji produktów metabolicznych [12, 13]. Wszystkie mechanizmy utrzymujące homeostazę ustroju, takie jak mechanizmy obronne przeciwko RONS, mechanizmy naprawcze uszkodzeń nuklearnego i mitochondrialnego kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA, *deoxyribonucleic acid*), aktywność białek szoku termicznego, reakcje podziału i śmierci komórki, odpowiadają za jej sprawność i utrzymanie funkcji fizjologicznych. Jednakże wraz z wiekiem stop-

niowo spada skuteczność wymienionych mechanizmów, co decyduje o starzeniu się komórek [12, 13].

Oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych związane z procesami starzenia

Wolne rodniki, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($-O_2\cdot$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) w zakresie swoich fizjologicznych stężeń, praktycznie nie powodują większych uszkodzeń kwasów nukleinowych [14]. Oksydacyjne uszkodzenia DNA przede wszystkim są wywoływane przez bezpośrednie reakcje rodnika hydroksylowego ($OH\cdot$) z nukleotydami DNA lub też na skutek wprowadzenia uszkodzonego nukleotydu do DNA podczas replikacji [15, 16].

Powstałe uszkodzenia prowadzą do pęknięcia pojedynczej nici polinukleotydowej. Jeżeli powstałe produkty w wyniku pojedynczego pęknięcia nici wejdą w reakcje z innymi fragmentami DNA, może dojść do uszkodzenia obu nici, co uważa się za najpoważniejszy rodzaj uszkodzenia DNA [17, 18]. Alternatywnym sposobem powstawania oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest tworzenie adduktów objętościowych z utlenionymi białkami i lipidami [19]. Liczbę uszkodzeń oksydacyjnych w komórkowym DNA człowieka szacuje się na około 10 000 dziennie [9]. Jednak większość z nich jest usuwana i wydalana na zewnątrz komórki za pomocą mechanizmów naprawczych [20]. Duża liczba uszkodzeń oksydacyjnych obejmuje telomery DNA, przy czym procesy naprawy telomerów są mniej wydajne [21]. Wielu autorów wykazało [22–27], że pod wpływem umiarkowanego stresu oksydacyjnego liczne komórki zachowują swoją zdolność do proliferacji i replikacji DNA. Jednak akceleracja stresu oksydacyjnego związana z postępującym wiekiem może powodować takie uszkodzenia telomerów (powtórzenia DNA o sekwencji TTAGGG — uważanych za molekularny zegar biologiczny), że istotnie zmienia się replikacyjny czas życia na przykład ludzkich fibroblastów. Konsekwencjami omawianych zmian są słabnące wraz z wiekiem, przede wszystkim, układ odpornościowy, tkanka kostna i skóra. Prowadzone przez Barja i Herrero [28] badania na różnych tkankach wykazały, że zdecydowanie więcej zniszczeń oksydacyjnych zachodzi w mitochondrialnym DNA (mtDNA) niż w jądrowym. Jak ocenił Richter i wsp. [29], ilość zniszczeń mtDNA 10-krotnie przewyższa poziom uszkodzeń jądrowego DNA zawartego w tej samej tkance. Mimo że w komórkach zwierzęcych mitochondrialne DNA zawiera tylko 1–3% materiału genetycznego, to wystąpienie mutacji punktowych lub przebudowa większego fragmentu genu w postaci delekcji czy duplikacji w mtDNA

może mieć poważne konsekwencje w postaci upośledzenia wydolności energetycznej mitochondriów (mtDNA koduje białka związane z fosforylacją oksydacyjną i komponenty potrzebne do ich syntezy, takie jak tRNA i rRNA) [30]. Dysfunkcję mitochondriów uznano za jeden z najważniejszych powodów przyczyniających się do pojawiającej się wraz z procesem starzenia sarkopenii [31]. Uszkodzenia indukowane reaktywnymi formami tlenu i azotu w obrębie mtDNA stanowią źródło mutagenyzy w mitochondriach i jeden z podstawowych czynników związanych z procesem starzenia [31, 32]. Wysoka podatność na oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA wynika z tego, że znajduje się on w pobliżu głównego źródła ROS, czyli łańcucha oddechowego. Ponadto może wynikać z braku ochrony mtDNA przez histony oraz z braku intronów, co przy jednocześnie dużej gęstości informacji zawartej w mtDNA powoduje, że uszkodzenie może nastąpić w dowolnym punkcie mitochondrialnego genomu [33]. Jednocześnie stwierdzono ograniczoną możliwość naprawy mtDNA i uszkodzonych na skutek błędów replikacyjnych białek związanych z fosforylacją oksydacyjną [34].

Główny system naprawczy w mitochondriach komórkowych stanowią enzymy składające się na system *Base excision repair* (BER), który umożliwia wycięcie zmodyfikowanych zasad azotowych i nukleotydów, a następnie wspólnie z endonukleazą lub ligazą DNA wypełnienie szczeliny i łączenie obu końcówek naciętej nici [35]. Inny system naprawy stanowi *Double strand break repair* (DSBR), który naprawia pęknięcia podwójnej nici DNA. Larsen i wsp. [36] uważają, że ograniczenie naprawy uszkodzeń mtDNA jest najczęściej spowodowane niską skutecznością działania systemu naprawy niesparowanych zasad (MMR, *mismatch repair system*). Zajmuje się on naprawą błędnych połączeń, takich jak wiązania krzyżowe pomiędzy zasadami DNA (dimery tyminy), wiązania krzyżowe białek z DNA, lub usuwaniem masywnych adduktów przyłączonych do DNA, które powodują blokowanie DNA w czasie jego replikacji [37]. Dotąd nie udało się natomiast zaobserwować w mitochondriach bardzo istotnego dla jądrowego DNA systemu naprawczego *Nucleotide excision repair* (NER), który usuwa wiele uszkodzeń nuklearnego DNA, w tym dimery pirymidyny (*pyrimidine dimers*) zmieniające konformację helisy DNA [36].

Produktem oksydacyjnego uszkodzenia DNA jest na przykład 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG). Wysokie stężenie 8-OH-dG odpowiada za powstanie mutacji punktowych DNA i obecnie jest najczęściej stosowanym w badaniach markerem oksydacyjnych

zniszczeń DNA [38]. Rattan i wsp. [39], prowadząc badania u zdrowych osób w wieku 15–91 lat, odnotowali zależność wzrostu stężenia 8-OH-dG w osoczu krwi wraz z postępującym wiekiem badanych. W pracach innych autorów prowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo* potwierdzono zwiększoną akumulację 8-OH-dG i innych wskaźników uszkodzeń oksydacyjnych nuklearnego i mitochondrialnego DNA w starzejących się komórkach [33, 40–43].

Friguet i wsp. [10] dodatkowo zaobserwowali, że pojawiające się w procesie starzenia uszkodzenia DNA najczęściej wiążą się z obniżoną wydajnością procesów naprawczych DNA i skutecznością obrony systemu antyoksydacyjnego chroniącego DNA. Natomiast Hamilton i wsp. [34], oznaczając stężenie 8-OH-dG w zróżnicowanych wiekowo tkankach, doszli do wniosku, że wzrost uszkodzeń oksydacyjnych wynika przede wszystkim z wrażliwości danej tkanki na stres oksydacyjny, a nie z obniżenia sprawności mechanizmów naprawy i ochrony spowodowanego wiekiem tkanki. Passos i von Zglinicki [44], dokonując obszernej analizy danych dotyczących zniszczeń oksydacyjnych w procesie starzenia, doszli do wniosku, że akumulacja oksydacyjnych uszkodzeń DNA powodująca pęknięcia obu nici łańcuchów polinukleotydowych wspólnie z uszkodzeniami telomerów może stanowić jedną z najważniejszych przyczyn starzenia się komórek.

Oksydacyjne uszkodzenia białek związane z procesami starzenia

W zależności od rodzaju oksydantów i charakteru źródła RONS proces utleniania białek może prowadzić do odwracalnych i nieodwracalnych uszkodzeń [45]. Oksydacja najczęściej następuje pod wpływem wolnych rodników tlenowych oraz takich oksydantów, jak jony ferrylowe, tlenek azotu i inne reaktywne formy azotu, czyli nadtlenoazotyn (ONOO⁻), azotan (NO₃⁻), azotyn (NO₂⁻). Celem ich ataku jest zarówno główny łańcuch polipeptydowy, jak i łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. Najczęściej oksydacji ulegają sulfoaminokwasy (cysteina i metionina) oraz aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina) [45]. Oprócz produktów pochodzących z utleniania cysteiny i metioniny, oksydacja pozostałych aminokwasów powoduje ich nieodwracalną modyfikację [46]. Utlenione reszty cysteiny i metioniny prowadzą do powstania disiarczków (GSSG) i sulfotlenku metioniny (MetSOx). Ponieważ większość komórek jest wyposażona w reduktazę glutationową i reduktazę sulfotlenku metioniny, przywracają one tym tiolom ich zredukowane formy [47, 48]. Oksy-

dacja pozostałych aminokwasów powoduje ich nieodwracalne modyfikacje, polegające głównie na wprowadzeniu grup karbonylowych lub hydroksylo- wych do łańcucha bocznego białek, a następnie powodujące fragmentację łańcucha polipeptydu, modyfikację łańcuchów bocznych reszt aminokwaso- wych, tworzenie wewnątrzcząsteczkowych i między- cząsteczkowych wiązań krzyżowych oraz ich agre- gację [49, 50]. Stwierdzono, że jedyną drogą elimi- nacji nieodwracalnych modyfikacji białek jest proces ich selektywnej degradacji [51].

W prowadzonych w ostatnich latach badaniach po- twierdzono występowanie podwyższonego stężenia grup karbonylowych aminokwasów w wielu stanach patologicznych, które często towarzyszą postępują- cym procesom starzenia się organizmu [52]. Zwięk- szona zawartość zmodyfikowanych oksydacyjnie bia- łek może być zarówno przyczyną, jak i konsekwencją rozwoju danego schorzenia. Do chorób związanych z obecnością grup karbonylowych aminokwasów zaliczono: chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona, cukrzycę, miażdżycę, niewydolność nerek, mocznicę, łuszczycę, zaćmę, posocznicę, stwardnienie za- nikowe boczne oraz nowotwory [53, 54].

Stadtman [55], dokonując przeglądu piśmiennictwa, stwierdził, że proces starzenia jest ściśle związany ze zwiększoną kumulacją oksydacyjnie zmodyfikowa- nych białek. Jednak nasilona podatność na proteolizę zmodyfikowanych białek nie zawsze prowadzi do przyspieszenia ich degradacji, ponieważ wraz z po- stępującym wiekiem zmieniają się również małe białka ubikwityny odgrywające podstawową rolę w znako- waniu białek mających ulec selektywnej degradacji [10, 56]. Humphries i wsp. [57] doszli do wniosku, że kumulacja oksydacyjnie zmodyfikowanych bia- łek wynika z wielu jednocześnie występujących pro- cesów, czyli wzrostu produkcji RONS, obniżenia sku- teczności systemu ich neutralizacji, zaburzeń syste- mów naprawczych uszkodzonych białek i/lub zmian podatności specyficznych białek na uszkodzenia oksy- datywne występujące wraz z wiekiem. Przykładem zwiększonej agregacji białek związanej z postępują- cym wiekiem jest katarakta, w której oksydatywne modyfikacje aminokwasów metioniny i cysteiny po- wodują fragmentację białka krystaliny, jej agregację i w konsekwencji utratę przejrzystości soczewki [58]. Stopień modyfikacji potranslacyjnej białek zależy w dużej mierze od komponenty węglowodanowej i występujących jonów metalu [55]. Enzymy zawie- rające w swoim centrum aktywnym jony żelaza są bardziej wrażliwe na działanie anionorodnika ponad- tlenkowego. Przykład może stanowić inaktywacja syn-

tazy glutaminowej w wyniku uszkodzenia reszty hi- staminowej zlokalizowanej w pobliżu jonu żelaza znajdującego się w centrum aktywnym tego enzy- mu. Również akonitaza — enzym mitochondrialny mający w swoim centrum aktywnym jony żelaza — jest inaktywowana w obecności anionorodnika ponadtlenkowego [9]. Davies i Delsignore [59] w ba- daniach przeprowadzonych na ekstraktach komórek ssaków i bakterii wykazali, że modyfikacja białek, w których reakcja jest katalizowana przez jony Fe (II) lub Cu (I) (*metal-catalyzed oxidation MCO system*), zamienia ich formy tak, że stają się one bardzo po- datne na degradację przez proteazy pojawiające się w komórkach. Proces oksydatywnej modyfikacji bia- łek przez system MCO przebiega bezpośrednio w bia- lku [60], a konsekwencją tych zmian w starych tkan- kach jest najczęściej spadek aktywności wielu enzy- mów [61] oraz ich zwiększona podatność na dena- turację pod wpływem temperatury w porównaniu z enzymami młodych tkanek [62].

Antyoksydanty białkowe mogą chronić różne skład- niki komórki przed uszkodzeniem wolnorodnikowym, jednak same nie są chronione przez typowe antyok- sydanty, jak na przykład moczan, askorbinian, toko- ferol czy bilirubina [63]. Oksydacyjna modyfikacja antyoksydantów, wywołana wolnymi rodnikami (np. utenianie glutationu i askorbinianu), nadaje im no- wych właściwości biochemicznych i wpływa na ob- niżenie zdolności antyoksydacyjnych całego ustroju oraz zwiększone utlenianie innych molekuł chronio- nych przez te antyoksydanty [64].

Szczególnie wrażliwe na oksydatywne modyfikacje są łańcuchy boczne argininy, proliny i lizyny, które przekształcają się w pochodne karbonylowe [65]. Wzrost stężenia pochodnych karbonylowych w ko- mórkach skórnych fibroblastów pobranych od zdro- wych osób w wieku 10–80 lat potwierdzili Davies i Delsignore [59], w białej substancji tkanki mózgo- wej — Smith i wsp. [66], w soczewce oka — Garland i wsp. [67], w erytrocytach i mięśniach — Berlett i Stadtman [68], w limfocytach — Mutlu-Turkoglu i wsp. [69], a w hepatocytach szczura — Stark-Reed i Oliver [70]. W badaniach Franceschi i wsp. [71] wy- kazali, że oksydacyjna modyfikacja immunoglobuli- ny G (IgG) prowadziła do agregacji cząsteczek i zwięk- szonej zdolności wiązania przez nie czynnika reuma- toidalnego. Ich następstwami były powstawanie kom- pleksu immunologicznego, aktywacja dopełniacza i neutrofilii i wtórne nasilenie produkcji wolnych rod- ników.

Przyczynę powstawania pochodnych karbonylowych w białkach mogą również stanowić modyfikacje bia-

łek wywołane przez aldehydy i ketony produkowane podczas procesu peroksydacji lipidów [72] lub nieenzymatycznej glikacji białek [73].

Suji i Sivakami [74] w obserwacjach wskazali, że wraz z postępującym wiekiem następuje zjawisko nasilonej nieenzymatycznej glikacji białek. Proces ten nie zawsze jest powodowany zwiększoną produkcją wolnych rodników, ale końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGEs, *advanced glycation end products*) zawsze się wiążą ze zwiększoną generacją wolnych rodników tlenu i azotu, co nasila proces glikooksydacji białek [73, 75, 76]. Ponadto gromadzone końcowe produkty zaawansowanej glikacji istotnie zmieniają konformację przestrzenną białek i powodują powstawanie między nimi wiązań krzyżowych, co prowadzi do zjawiska sieciowania i odkładania złogów [77]. Działanie AGEs na komórki zależy od specyficznych receptorów AGE (RAGE, *receptor for AGE*), które odgrywają rolę nie tylko w internalizacji i degradacji AGEs, lecz także w transdukcji sygnału przez nie indukowanego [78]. Interakcja AGEs z receptorem RAGE wiąże się ze wzrostem wewnątrz komórki stężenia wolnych rodników, które mogą aktywować jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (NF- κ B, *nuclear factor κ B*) odpowiedzialny za ekspresję genów cytokin, czynników wzrostu, molekuł adhezyjnych, migrację makrofagów [79]. Ze względu na funkcję, jaką pełnią AGEs w etiopatogenezie chorób związanych z procesem starzenia (np. miażdżycy, powikłań cukrzycowych, chorobie Alzheimera, katarakcie, reumatoidalnym zapaleniu stawów), są one często wykorzystywane jako biomarker procesu starzenia [21].

W wynikach badań prowadzonych na różnych rodzajach starych tkanek stwierdzono obniżanie się w nich aktywności proteasomów wraz z postępującym wiekiem [80, 81]. W badaniach prowadzonych *ex vivo* na starych fibroblastach skóry wykazano, że redukcja aktywności proteasomów zachodzi na skutek ich inhibicji przez lipofuscyne bądź przez bezpośrednio oddziaływanie utlenionych białek i innych utlenionych produktów niebędących białkami [82–84]. W miarę postępu procesu starzenia następuje dalsza utrata biochemicznych i fizjologicznych funkcji komórek i zmniejszenie ich podatności na mechanizmy naprawcze [85].

Gregori i wsp. [86] stwierdzili, że w chorobie Alzheimera inhibicja proteolizy zależnej od ubiquitynacji białka była spowodowana związaniem przez proteosomy peptydu amyloidowego β (*A β -peptide*). W kolejnych badaniach potwierdzono, że nadmierne powstawanie złogów amyloidu β powoduje ciągłą

aktywację komórek mikrogleju prowadzącą do zaburzeń proteolizy peptydu oraz do nadmiernego wytwarzania cytokin i RONS nasilających procesy neurodegradacji [87, 88].

Oksydatywne uszkodzenia składników lipidowych związane z procesami starzenia

Peroksydacja lipidów jest jednym z ważniejszych procesów biologicznych związanych z działaniem reaktywnych form tlenu i azotu. W wyniku wolnorodnikowych procesów utleniania szczególnie bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe lipidów komórkowych powstają nadtlenki tych związków i wolne rodniki alkilowe, które, reagując z cząsteczką tlenu, tworzą wolnorodnikowe nadtlenki kwasów tłuszczowych (LOO) [89]. Następne przemiany nadtlenków lipidowych podlegają dalszej peroksydatywnej degradacji do produktów końcowych. Powstają między innymi aldehydy, a pośród nich dialdehyd malonowy (MDA, *malondialdehyde*), hydroksykwasy, w tym 4-hydroksyalkenale, F₂-izoprostany lub oksystrole [90]. Głównym produktem peroksydacji komponentu lipidowego błon komórkowych i jednocześnie często stosowanym wskaźnikiem uszkodzeń oksydacyjnych lipidów jest MDA [91]. Wykorzystuje się tu reakcję barwną pomiędzy produktami peroksydacji lipidów i kwasem tiobarbiturowym (TBA, *2-thiobarbituric acid*). Reakcja ta, mimo że jest bardzo czuła, stanowi niespecyficzną reakcję i — oprócz dialdehydu malonowego — z kwasem barbiturowym reagują inne związki, na przykład bilirubina, kwas sialowy, produkty degradacji cukrów. Dlatego też w diagnostyce dla produktów tej reakcji często używa się ogólnie przyjętej nazwy — substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) [92]. Zgodnie z opinią Wong i wsp. [93], oznaczenie w surowicy krwi stężenia TBARS, mimo wielu kontrowersji, uważa się za cenny wskaźnik zniszczeń oksydacyjnych lipidów i używa go wiele laboratoriów.

Produkty peroksydacji lipidów mają możliwość modyfikacji właściwości fizycznych błon komórkowych, co objawia się najczęściej przez pęknięcia błon komórkowych, zmianę funkcji receptorowych i utratę integralności błon komórkowych [9, 94]. Ponadto końcowe produkty peroksydacji lipidów wpływają na zmianę właściwości antygenowych białek, ekspresję genów i syntezę białka, a także mogą prowadzić do dalszych zniszczeń komórkowych przez reakcje z grupami tiolowymi białek lub kwasów nukleinowych [38, 95]. Zarówno nadtlenki kwasów tłuszczowych, jak i aldehydowe produkty peroksydacji są czynnikami

rozprzegającymi fosforylację oksydacyjną w mitochondriach, prawdopodobnie na skutek niwelowania różnicy stężeń protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej [94]. Wielu autorów donosi o wzroście wraz z wiekiem stężenia MDA w osoczu krwi. Zwrócono przy tym uwagę na związek, jaki zachodzi pomiędzy jego wysokim stężeniem a wzrostem wielu zmian patofizjologicznych występujących u osób w podeszłym wieku [69, 96–99].

Udokumentowano, że produkty peroksydacji lipidów, między innymi MDA, reagując z uszkodzonymi oksydacyjnie białkami, generują powstawanie lipofuscyny w komórkach postmitotycznych [100]. Lipofuscyna, jako końcowy produkt uszkodzonych oksydacyjnie grup aminowych białek i fosfolipidów, zaczyna się kumulować w starych komórkach, najczęściej w sytuacji gdy procesy oksydatywnej modyfikacji zachodzą szybciej niż tempo degradacji uszkodzonych białek [24]. Powell i wsp. [101] w badaniach prowadzonych *in vitro* wykazali, że inkubacja kardiomiocytów z lipofuscyną hamuje aktywność proteasomów, co wiąże się z obniżoną degradacją nagromadzonych molekuł. Podobnych obserwacji, dotyczących hamowania aktywności proteasomów w młodych fibroblastach, dokonali Sitte i wsp. [25]. Uchida [102], dokonując przeglądu prac w zakresie odkładania się lipofuscyny w starych komórkach, stwierdził, że ma ona istotne znaczenie w rozwoju chorób towarzyszących procesowi starzenia i jest dobrym wewnątrzkomórkowym wskaźnikiem uszkodzeń wolnorodnikowych. Szczególną wrażliwością na oksydatywne uszkodzenia cechują się lipoproteiny o niskiej gęstości (cholesterol frakcji LDL). Liczne dowody naukowe świadczą o tym, że proces oksydatywnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości zachodzący podczas przechodzenia lipoprotein przez barierę śródbłonkową jest jednym z głównych mechanizmów patogenezy miażdżycy. Modyfikacja cholesterolu frakcji LDL jest najczęściej inicjowana peroksydacją lipidów, podczas której dochodzi do degradacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*), następnie wzrostu formowania nadtlenków lipidowych triglicerydowych i fosfolipidowych z estrów cholesterolu, a te dalej ulegają rozpadowi do produktów aldehydowych, na przykład dialdehydu malonowego czy 4-hydroksynonenalu [103]. Powstałe produkty rozpadu łączą się z grupami lizynowymi apoproteiny apo-B-100, powodując fragmentację białka oraz zamianę jego ładunku elektrycznego, a następnie hamowanie komórkowej degradacji tej frakcji przez fizjologiczny receptor [104]. Proces ten odbywa się w pęcherzykach endocytarnych, w któ-

rych znajdują się, oprócz cząsteczek LDL, RONS (generowane przez oksydazę NAD[P]H), fosfolipaza A oraz syntetyzowany pod jej wpływem kwas arachidonowy. Oksydacja lipoprotein LDL zachodząca w toku odczynu zapalnego może przebiegać również w reakcjach enzymatycznych, na przykład przez mieloperoksydazę (MPO) [105]. Prawdopodobnie wyższa wartość glikemii znacząco wpływa na podwyższenie stopnia utleniania lipoprotein o niskiej gęstości [106]. Jednak cały ten proces jest uwarunkowany obecnością wysokiego stężenia lipoprotein LDL w osoczu [107]. Oksydacyjna modyfikacja cholesterolu frakcji LDL łączy się ze zmianą składowej białkowej, lipidowej i antyoksydacyjnej cząsteczek LDL. W ten sposób makrofagi łatwiej wychwytyują zmodyfikowane cząsteczki, głównie poprzez receptor CD36, tworząc komórki piankowe [108]. Po oksydacji lipoproteiny LDL uzyskują nową aktywność, między innymi mogą regulować ekspresję genów prozapalnych w makrofagach za pośrednictwem receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów γ (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptors*) [109]. Ponieważ utlenione lipoproteiny LDL mają silne działanie immunogenne, stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko oxLDL (oLAB) zarówno u osób chorych, jak i zdrowych [110]. Nadal jednak istnieje duża rozbieżność uzyskanych wyników badań w zakresie kierunku zmian stężenia przeciwciał przeciwko oxLDL u zdrowych i chorych osób w podeszłym wieku [111–113]. Dłużej utrzymująca się kumulacja zniszczeń oksydacyjnych w komórkach ludzkich wywołuje różne odpowiedzi komórkowe, od proliferacji do zatrzymania podziału, starzenia i śmierci [114–116]. Jednakże istnieją przypadki, w których wysokie stężenie RONS, mimo wywołanych zniszczeń, jednocześnie stanowi mechanizm regulacyjny, powstrzymujący niekontrolowany rozrost komórek na przykład w rozwoju nowotworu. Stres oksydacyjny reguluje bowiem szlaki sygnałowe, które kończą się aktywacją czynników transkrypcyjnych supresji wzrostu nowotworu, takich jak HSF1, AP-1, NF- κ B, p53 [117, 118]. Przykładem regulacji prowadzonej przez stres oksydacyjny jest czynnik transkrypcyjny HSF1, który przez związanie z chaperonami, głównie Hsp90, występuje w nieaktywnej postaci w cytozolu [119]. Podczas wzrostu stresu oksydacyjnego zostaje zniesiona czynność chaperonów (na skutek niewłaściwego pofałdowania białek) i uwalniają się cząsteczki regulacyjne HSF1 po przetransportowaniu do jądra komórkowego, aktywując wiele docelowych genów [120, 121]. Przeważnie aktywacja tego zakresu czynników transkrypcyjnych reguluje działanie molekuł funkcjonalnych

odpowiedzialnych za system obronny komórek [121–124].

Podsumowanie

Reaktywne formy tlenu i azotu są istotną składową prawidłowego metabolizmu komórkowego. Jednak nadmierne wytwarzanie RONS lub zaburzone ich usuwanie przez system antyoksydacyjny prowadzą do stresu oksydacyjnego. Skutkiem wysokiego i/lub długo trwającego stresu są najczęściej uszkodzenia ważnych składników komórkowych, takich jak białka, lipidy czy DNA. Prowadzone w ostatnich latach badania potwierdzają udział RONS w wielu proce-

sach patologicznych towarzyszących starzeniu się organizmu. Jednak należy podkreślić, że nie wszystkie obserwowane zmiany zachodzące w starzejących się komórkach są spowodowane przez RONS. Wiele danych wskazuje również na istotny udział mutacji, epimutacji czy procesów agregacji produktów metabolicznych w powstawaniu tych zmian. Bez względu na przyczynę powstawania uszkodzeń komórek nie budzi wątpliwości, że długość życia jest determinowana zarówno przez geny zaangażowane w metabolizm oraz naprawę struktur i funkcji komórek, jak i stopień nagromadzenia się uszkodzeń komórkowych w ciągu życia.

Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono najnowszy przegląd badań dotyczący uszkodzeń wolnorodnikowych związanych z procesem starzenia. W badaniach dostarczono nowych dowodów naukowych, które poszerzyły obowiązującą hipotezę starzenia i obecnie według niej nasilająca się wraz z wiekiem produkcja wolnych rodników jest przyczyną uszkodzeń lipidów, białek, mitochondrialnego i jądrowego DNA oraz zaburzeń szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za szerokie spektrum odpowiedzi komórkowej. Biologiczną konsekwencją wzrostu zniszczeń struktur komórkowych są: zmiany ekspresji genów, mutacje, molekularna heterogenność, zanik potencjału dzielenia się komórek, osłabienie komunikacji międzykomórkowej, dezorganizacja tkanek, dysfunkcja organów. Stałe postępująca wraz z wiekiem akumulacja uszkodzeń wolnorodnikowych na poziomie komórkowym prawdopodobnie wiąże się z długością życia człowieka.

Gerontol. Pol. 2011; 19, 2: 59–67

słowa kluczowe: podeszły wiek, wolne rodniki, wolnorodnikowe zniszczenia lipidów, białek i mitochondrialnego i nuklearnego DNA

Piśmiennictwo

- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47–95.
- Bove P.F., van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signalling and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 398–406.
- Finkel T., Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239–247.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. W: Sies H. (red.). *Oxidative stress*. Academic Press, Londyn 1985: 1–8.
- Trougakos I.P., Gonos E.S. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in aging and age-related diseases. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1335–1338.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956; 11: 298–300.
- Allen R.G., Trenzini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 2: 463–499.
- Harman D. Free radical theory of aging: an update. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006; 1067: 10–21.
- Beckman K.B., Ames B.N. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 547–581.
- Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M., Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000; 908: 143–154.
- Rattan S.I.S. Theories of biological aging: genes, proteins and free radical. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1230–1238.
- Holliday R. *Understanding Aging*. Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- Kirkwood T.B.L. *Understanding the Odd Science of Aging*. *Cell* 2005; 120: 437–447.
- Chence B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 527–605.
- Cai F.-L., Kakuma T., Tsuzuki T., Sekiguchi M. DNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2343–2350.
- Gros L., Ishchenko A.A., Saparbaev M. Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat. Res.* 2003; 531: 219–229.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizgaroglu M., Lunec J. Oxidative damage, mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17: 1195–1214.
- Robles S., Adami G. Agents the cause DNA double strand breaks lead to p16INK_{4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998; 16: 1113–1123.
- Marrnett L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999; 428: 83–95.
- Gokey N.G., Cao Z., Pak J.W. i wsp. Molecular analyses of mtDNA deletion mutations in microdissected skeletal muscle fibers from aged rhesus monkeys. *Aging Cell* 2004; 3: 319–326.
- de Grey A.D.N.J., Ames B.N., Andersen J.K. i wsp. Time to talk SENS: critiquing the immutability of human aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002; 959: 452–462.

22. Chondrogianni N., Gones E.S. Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology* 2004; 5: 55–61.
23. Parrinello S., Samper E., Krotoń A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5: 741–747.
24. Sitte N., Huber M., Grune T. i wsp. Proteasome inhibition by lipofuscin-keroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J.* 2000; 14: 1490–1498.
25. Sitte N., Merker K., von Zglinicki T., Davies K.J., Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II — aging of nondividing cells. *FASEB J.* 2000; 14: 2503–2510.
26. Son N.H., Murray S., Yanowski J., Hodes R.J., Weng N. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J. Immunol.* 2000; 165: 1191–1196.
27. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27: 339–344.
28. Barja G., Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 2000; 14: 312–318.
29. Richter C., Park J.W., Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 6465–6467.
30. Alexeyev M.F., Ledoux S.P., Wilson G.L. Mitochondrial DNA and aging. *Clin. Sci. (Londyn)* 2004; 107: 355–364.
31. Hiona A., Leeuwenburgh C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implication for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp. Gerontol.* 2008; 43: 24–33.
32. Kujoth G.C., Bradshaw P.C., Haroon S., Prolla T.A. The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet.* 2007; 3: E24.
33. Wiesner R.J., Zsurka G., Kunz W.S. Mitochondrial DNA damage and the aging process — facts and imaginations. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1284–1294.
34. Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 10469–10474.
35. Wilson D.M., Sofinowski T.M., McNeil D.R. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front. Biosci.* 2003; 8: d963–d981.
36. Larsen N.B., Rasmussen M., Rasmussen L.J. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 2005; 5: 89–108.
37. Mason P.A., Matheson E.C., Hall A.G., Lightowler R.N. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 1052–1058.
38. Voss P., Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1339–1349.
39. Rattan S., Siboska G.E., Wikmar F.P., Clark B.F.C., Woolley P. Levels of oxidative DNA damage product 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human serum increases with age. *Med. Sci. Res.* 1995; 23: 469–470.
40. Kraysberg Y., Nekhaeva A., Bodyak N.B., Khrapko K. Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process. *Mech. Ageing Dev.* 2003; 134: 49–53.
41. Lee B.M., Kwack S.J., Kim H.S. Age-related changes in oxidative DNA damage and benzo(a)pyrene diol-epoxide-I (BPDE-I)-DNA adduct levels in human stomach. *J. Toxicol. Environ. Health* 2005; 68: 1599–1610.
42. Richter C., Park J.W., Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 6465–6467.
43. Nekhaeva E., Bodyak N.D., Kraysberg Y. i wsp. Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 5521–5526.
44. Passos J.F., von Zglinicki T. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1277–1283.
45. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 20313–20316.
46. Levine R.L., Stadtman E.R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 2001; 36: 1495–1502.
47. Brot N., Weissbach H. Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers* 2000; 55: 288–296.
48. Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lonn M.E., Hudemann C., Lillig C.H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 2005; 33: 1375–1377.
49. Skrzydlewska E., Farbiszewski R. Interakcje wolnych rodników z białkami. *Post. Hig. Med. Dosw.* 1995; 49: 747–766.
50. Petropoulos I., Friguet B. Maintenance of protein and aging: the role of oxidized protein repair? *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1269–1276.
51. Shingarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 311–318.
52. Tokarz A., Bobrowska B., Gryniewicz G., Matysiak M. Wpływ wybranych polifenoli na proces utleniania białek w wątrobach szczurów z nowotworami indukowanymi DMBA. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2007; 2: 187–194.
53. Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trend. Mol. Med.* 2003; 9: 169–176.
54. Beal M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; 32: 797–803.
55. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1250–1258.
56. Szweida P.A., Friguet B., Szweida L.I. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; 33: 29–36.
57. Humphries K.M., Szweida P.A., Szweida L.I. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1239–1243.
58. Merker K., Stolzing A., Grune T. Proteolysis, caloric restriction and aging. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122: 595–615.
59. Davies K.J.A., Delsignore M.E. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001; 83: 301–310.
60. Levine R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 11828–11833.
61. Yarian C.S., Toroser D., Sohal R.S. Aconitase is the main function target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mech. Ageing Dev.* 2006; 127: 79–84.
62. Rothstein M. The formation of altered enzymes in aging animals. *Mech. Ageing Dev.* 1997; 70: 909–913.
63. Yu-Huei W., Hsin-Chen L. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 2002; 227: 671–682.
64. Gębicki S., Gębicki J.M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.* 1993; 289: 743–749.
65. Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R. Recent advances in the analysis of oxidized protein. *Amino Acids* 2003; 25: 221–226.
66. Smith C.D., Carney J.M., Stark-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 10540–10543.
67. Garland D., Russell P., Zigler J.S. The oxidative modification of lens protein. W: Sivic M.G., Taylor K.S., Ward J.F., von Sonntag V. (red.). *Oxygen radicals in biology and medicine*. Plenum Press, New York 1988: 347–353.
68. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 20313–20316.
69. Mutlu-Turkoglu U., Ilhan E., Oztecan S., Kuru A., Aykac-Toker G., Uysal M. Age-related increase in plasma malondialdehyde and protein carbon levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin. Biochem.* 2003; 36: 397–400.
70. Stark-Reed P.E., Oliver C.N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; 275: 559–567.
71. Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. i wsp. Inflammation-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2000; 908: 244–254.
72. Burham P.C., Kuhan Y.T. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 220: 996–1001.
73. Adams S., Green P., Claxton R. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci.* 2001; 6: A17–A24.

74. Suji G., Sivakami S. Glucose, glycation and aging. *Biogerontol.* 2004; 5: 365–373.
75. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 1653–1671.
76. Grune T., Shringarpure R., Sitte N., Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med.* 2001; 56: B459–B467.
77. Lyons T.J. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Diabetes* 1992; 41: 67–70.
78. Wang A.L., Yu A.C., He Q.H. i wsp. AGEs mediated expression and secretion of TNF α in rat retinal microglia. *Exp. Eye Res.* 2007; 84: 905–913.
79. Bierhaus A., Humpert P.M., Morcos M. Understanding RAGE the receptor for advanced glycation end products. *J. Mol. Med.* 2005; 83: 876–886.
80. Bulteau A.L., Szweida L.I., Friguet B. Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 397: 298–304.
81. Carrard G., Dieu M., Raes M., Toussaint O., Friguet B. Impact of aging on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 35: 728–739.
82. Chondrogianni N., Stratford F.L., Trougakos I.P., Friguet B., Rivett A.J., Gonos E.S. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 28026–28037.
83. Chondrogianni N., Gones E.S. Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology* 2004; 5: 55–61.
84. Chondrogianni N., Gonos E.S. Proteasome dysfunction in mammalian aging: steps and factors involved. *Exp. Gerontol.* 2005; 40: 931–938.
85. Widmer R., Ziaja I., Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1259–1268.
86. Gregori L., Fuchs C., Figueiredo-Pereira M.E., van Nostrand W.E., Goldgaber D. Amyloid beta protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 19702–19708.
87. Rogers J., Lue L.F. Microglial chemotaxis, activation and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 2001; 39: 333–340.
88. Zablocka A. Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2006; 60: 209–216.
89. Gutteridge J.M., Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 1990; 15: 129–135.
90. Siems W., Grune T. Lipid peroxidation measurements-methodological approaches and clinical importance. W: Grune T. (red.). *Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology.* IOS Press, Amsterdam 2005; 367: 11–21.
91. Voss P., Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1339–1349.
92. Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 1990; 9: 515–540.
93. Wong S.H., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach C.N., Sunderman F.W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malonaldehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* 1987; 33: 210–220.
94. Bartosz G. Biologiczne znaczenie reakcji RTF. W: Kopczyńska M., Bogdanięko A. (red.). *Druga twarz tlenu.* PWN, Warszawa 2003: 84–91.
95. Uchida K. Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* 2001; 33: 731–737.
96. Junqueira V.B., Barros S.B., Chan S.S. i wsp. Aging and oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25: 5–16.
97. Inal M.E., Kanbak G., Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin. Chim. Acta* 2001; 305: 75–80.
98. Gil L., Siems W., Mazurek B. i wsp. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 495–505.
99. Traverso N., Patriarca S., Balbis E. Antimalondialdehyde-adduct immunological response as a possible marker of successful aging. *Exp. Gerontol.* 2003; 38: 1129–1135.
100. Chowdhury P.K., Halder M., Choudhury P.K. Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin. *Photochem. Photobiol.* 2004; 79: 21–25.
101. Powell S.R., Wang P., Divies K.J., Katzeff H. Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 1093–1101.
102. Uchida K. Lipofuscin-like fluorophores originated from malondialdehyde. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1335–1338.
103. Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062–1071.
104. Öörni K., Pentikäinen M.O., Ala-Korpela M., Kovanen P.T. Aggregation, fusion, and formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanism and effects on matrix interactions. *J. Lipid. Res.* 2000; 41: 1703–1714.
105. Carr A.C., McCall M.R., Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1716–1723.
106. Krauss R.M. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1496–1504.
107. Siennicka A., Zapolska-Downar D. Modyfikacja lipoprotein niskiej gęstości i ich wpływ na rozwój blaszki miażdżycowej. *Czyniki Ryzyka* 2003; 4: 30–39.
108. Sokołowska M., Kowalski M.L., Pawliczak R. Receptory aktywowane przez proliferatory peroksydomów- γ (PPAR- γ) oraz ich rola w immunoregulacji i kontroli reakcji zapalnej. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2005; 59: 472–484.
109. Ricote M., Husang J., Fajas L. i wsp. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 7614–7619.
110. Alving C.R., Wassef N.M. Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism. *Immunol. Today* 1999; 20: 362–366.
111. Dedoussis G.V., Kanoni S., Panagiotakos D.B. i wsp. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. *Exp. Mol. Med.* 2008; 40: 27–34.
112. Holvoet P., Mertens A., Verhamme P. i wsp. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 844–848.
113. Nakamura Y.K., Read M.H., Elias J.W., Omaye S.T. Oxidation of serum low-density lipoprotein (LDL) and antioxidant status in young and elderly humans. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2006; 42: 265–276.
114. Allen R.G., Trenzini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28: 463–499.
115. Jackson M.J. Redox regulation of skeletal muscle. *Life* 2008; 60: 497–501.
116. Srebro Z., Lach H. Genetyczne, epigenetyczne i bioenergetyczne mechanizmy starzenia i nowotworów. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000: 18–19.
117. Martindale J.L., Holbrook N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.* 2002; 192: 1–15.
118. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 266: 37–56.
119. Marimoto R.I. Dynamic remodeling of transcription complex by molecular chaperones. *Cell* 2002; 110: 281–284.
120. Soti C., Pal C., Papp B., Cserehely P. Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005; 17: 210–215.
121. Shacelford R.E., Kaufman W.K., Paules R.S. Oxidative stress and cell cycle check point function. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1387–1404.
122. Graf P.C., Jakob U. Redox-regulated molecular chaperones. *Cell Mol. Life Sci.* 2002; 59: 1624–1631.
123. Poppek D., Grune T. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid. Redox. Signal* 2006; 8: 173–184.
124. Yu B.P., Chung H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech. Ageing Dev.* 2006; 127: 436–443.