

# WYBRANE ASPEKTY BIOLOGICZNEGO PODŁOŻA STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

## THE BIOLOGY OF AGING – SELECTED ASPECTS

Steve LIEBICH

*Streszczenie:* Starzenie się organizmu to proces nieprzerwany, skomplikowany oraz wielopoziomowy. Istnieje wiele teorii, które w zasadniczy sposób starają się wytłumaczyć biologiczne podłoże starzenia się komórek. Jedną z nich jest teoria wolnorodnikowa. Jednakże każda z przedstawionych w bieżącym opracowaniu teorii, dotyczy w sposób pośredni lub bezpośredni telomerów, czyli końcowych fragmentów chromosomów, których ciągłe skracanie się pod koniec każdego cyklu komórkowego wpływa istotnie na powolne zahamowywanie procesów życiowych i zachwiania homeostazy organizmu. Znalezienie sposobu na kontrolowanie wydłużania ubywających fragmentów telomerów komórek miałoby ogromny wpływ na zwiększenie możliwości podziałowych komórek (zwiększenie liczby podziałów Hayflicka). Dodatkowo zmniejszenie stężeń reaktywnych form tlenowych w komórkach pomogłoby utrzymać biologiczny stan życiowy przy jednoczesnym wydłużeniu życia komórek.

*Słowa kluczowe:* starzenie się, telomery, telomeraza, liczba Hayflick'a, wolne rodniki

*Summary:* The aging of a body is an unstoppable process, complicated and multi – level. There exist many theories, which basically attempt to explain biological background of cell aging. Among all these theories free radical theory has the highest significance. However, every single theory presented below either directly or indirectly relates to telomeres, terminal fragments of the chromosomes, which have a distinct impact upon slow living processes inhibition and imbalance homeostasis because of continuous shortening of the telomeres in the end of every cell cycle. Finding the way to have a control on elongation of lessening cell telomeres fragments would have an enormous influence upon enhancing the ability of cell divisions (increasing Hayflick time). Additionally, decreasing the rates of reactive oxygen species (ROSs) in the cells could help to keep a biological living state with cell life span extension at the same time.

*Key words:* aging, telomeres, telomerase, Hayflick time, free radicals

*Wykaz stosowanych skrótów :*

**WRT** – wolne rodniki tlenowe; **TP53** – białko supresorowe; **SINE** – (ang. *Short Interspersed Nuclear Fragments*); krótkie rozproszone powtarzające się fragmenty retrotranspozonozy w genomie; **TRF** – (ang. *Telomere Restriction Fragments*); końcowy fragment restrykcyjny; **TERT** – (ang. *Telomerase*)

*Reverse Transcriptase*) składowa kompleksu enzymatycznego telomerazy; **TERC** – (ang. *Telomerase RNA Component*; składowa kompleksu enzymatycznego telomerazy; **4-OHT** – 4-hydroksytamoksyfen; **CPDs** – (ang. *Cumulative Population Doublings*) liczba podziałów komórkowych

## WSTĘP

Starzenie się organizmu jest rzeczą naturalną i powszechnie akceptowaną. W aspekcie socjopsychologicznym niestety przyjmowaną z dystansem i lękiem. Jak dotąd nie podano i nie wyjaśniono w pełni procesów stojących za starzeniem się i umieraniem komórek. Istnieje wiele teorii i poglądów, jednak żadne z nich nie oddają specyficznej istoty problemu. Autorzy prac poświęconych starzeniu się komórek wyróżniają kilka głównych teorii, na których opierają kolejne hipotezy. W pracy Marcusa S. Cooke'a oraz Marka D. Evansa *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease* [6] opisującej problem stresu oksydacyjnego i chorób z nim związanych, w podrozdziale o teorii starzenia, autorzy wymieniają dwie główne kategorie teorii starzenia: zaprogramowane i spichzeniowe. Podobnie Kunlin Jin [15] przyczyny starzenia dzieli na: zaprogramowane i spowodowane kumulacyjnym nakładaniem się błędów w genomie. Oczywiście jest, że w świetle obecnej wiedzy trudno jest wyróżnić ważne i mniej ważne przyczyny umierania komórek, acz ostatnie badania wskazują, że wszystkie hipotezy łączy kilka istotnych elementów, które w następnych latach powinny zostać bliżej poznane i udokumentowane [7].

## DEFINICJA STARZENIA SIĘ

Starzenie się nie jest chorobą. Jednak sam proces starzenia dla rodzaju ludzkiego stanowi istotny problem. Powszechnie akceptowana definicja starzenia mówi o wieloczynnikowym procesie angażującym komórki, tkanki i organizm jako całość. Składają się na nią [12]:

- a) spadek żywotności organizmu ujawniający się z wiekiem,
- b) nieodwracalne zmiany zachodzące w żywej substancji w wyniku działania czasu,
- c) suma wszystkich ubytków biologicznych gromadzących się w organizmie po okresie dojrzewania,
- d) wzrastająca z wiekiem wrażliwość organizmu na działanie czynników szkodliwych, prowadząca do zachwiania homeostazy,
- e) zespół procesów inwolucyjnych w narządach ciała.

Z wymienionych elementów definicji tylko dwie (c i d) przedstawiają rolę biochemiczną – genetyczną, która to stanowi źródło większości przyczyn i skutków długoterminowego procesu degeneracji komórek i tkanek.

## TEORIE STARZENIA SIĘ

W toku rozwoju nauki badaczom udało się wyodrębnić różne przyczyny prowadzące do dysfunkcji komórki, jej degeneracji i ostatecznego obumarcia. Teorie te w mniejszym bądź większym stopniu się łączą i splatają na wielu poziomach, tak że trudno jest ustalić przyczynę i skutek.

Jednym z podstawowych założeń jest teoria M. Rubnera, niemieckiego fizjologa działającego na początku XX wieku, na którego pracy wzorował się następnie R. Pearl, amerykański badacz – hobbysta, twórca gerontologii i zwolennik eugeniki. Otóż Rubner dowodził, iż zwierzęta rodzą się z ograniczoną ilością energii i po przekroczeniu pewnego ustalonego limitu, giną. Na podstawie badań nad zwierzętami ustalił, że zwierzęta szybko zużywające energię (na przykład ryjówka, której szybkość bicia serca wynosi 750 uderzeń/min) żyją krócej od tych, których metabolizm jest powolniejszy (słonie, zółwie). Ustalił także, iż obniżenie temperatury ciała skutkuje przedłużeniem przeciętnej granicy długości życia; dowodem na to jest stan hibernacji u zwierząt, których metabolizm zwalnia, a proces starzenia przebiega stosunkowo wolniej. Z powyższych rozważań wynika, że istotnym elementem wpływającym na starzenie się jest szybkość przebiegających procesów biochemicznych, zarówno anabolicznych jak i katabolicznych, których produkty mogłyby wpływać pośrednio lub bezpośrednio na pracę komórek.

Ważnym dorobkiem gerontologii jest powstanie teorii sieciowania. W procesie sieciowania makromolekuł (cross-linking) powstają nowe wiązania poprzeczne między cząsteczkami biopolimeru i dochodzi do obniżenia wartości funkcjonalnej kwasów nukleinowych i zaburzenia replikacji, wskutek braku miejsc wiązania dla enzymów replikacyjnych i uniemożliwienia poprowadzenia widełek replikacyjnych. Jako przyczynę podaje się szkodliwe działanie wolnych rodników tlenowych (WRT), a przede wszystkim będącego najbardziej reaktywną formą tlenu rodnika hydroksylowego ( $^{\circ}\text{OH}$ ) oraz produktów peroksydacji kwasów tłuszczowych. Wartym uwagi jest fakt, iż WRT prowadzące do peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych powstają w niemal każdej komórce posiadającej mitochondria i utleniają tłuszcze, które również ulegają reakcjom katabolicznym w prawie wszystkich komórkach. Tłumaczy to ogólnoustrojowe zachwianie się homeostazy komórkowej związanej z wiekiem i teorią wolnorodnikową.

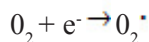
Teoria wolnorodnikowa zmierza do opisu teorii zatrucia, w której podaje się, że nagromadzenie (spichrzenie) szkodliwych związków w komórce prowadzi

do jej śmierci wskutek zatrucia komórkowego. Głównym wskaźnikiem zatrucia komórkowego jest lipofuscyna, gromadząca się w wielu narządach, powstała wskutek reakcji aldehydów z grupami aminowymi. Jest to żółto-zielony barwnik występujący w formie ziaren i odkładany wewnątrz lizosomów komórkowych. Nie jest do końca wyjaśnione, w jaki sposób odkładanie się ziaren lipofuscyny w lizosomach wpływa na metabolizm komórki, acz jedna z hipotez mówi, że lipofuscyna prowadzi do stresu oksydacyjnego związanego z utlenieniem żelaza, zagrażając stabilności lizosomów i przyczyniając się do apoptozy (wewnętrzny [mitochondrialny] szlak apoptozy) w wyniku wyrzucenia zawartości lizosomalnej do cytoplazmy [26]. Lipofuscyna, obok zaburzonych morfologicznie włókien fibrylarnych i nieprawidłowej struktury błony komórkowej, stanowi jeden z głównych biomarkerów starzenia się komórki.

Jak z powyższego wynika, pierwotnych przyczyn zaburzonej pracy komórki należy doszukiwać się w mitochondriach, a dokładnie w ubocznych produktach procesów oksydacyjnych.

Teoria katastrofy błędów Orgela mówi o zachodzących błędach replikacyjnych i niewystarczającym działaniu kompleksów enzymów naprawczych. Do chwili obecnej zlokalizowano ponad 130 genów związanych z naprawą uszkodzonego bądź błędnie sparowanego DNA [28]. Spośród nich należy wymienić takie białka jak TP53 (główne białko regulacyjne cyklu komórkowego, tuż obok RB1), RECQL (helikaza), *ATM* (mutacja genu prowadzi do zespołu ataksja – teleangiektazja), BRCA1 i 2, DSS1 (związany z genem BRCA2, ważny czynnik w rekombinacji homologicznej). Suma wszystkich błędów w genomie może stanowić ważny element przyspieszający śmierć komórek danego narządu i prowadzić do śmierci biologicznej. Dotyczy to przede wszystkim tych organów, w których dochodzi do częstej replikacji DNA, jak nabłonek jelitowy, komórki wyściółki żołądka czy śródbłonek naczyń krwionośnych. Zbliżoną i podobną teorią jest teoria mutacji somatycznych, spowodowanych czynnikami tak wewnętrznymi jak i zewnętrznymi (tak w nDNA, jak i mtDNA).

Dwie najważniejsze teorie starzenia się komórek to teoria Harmana oraz teoria skracania się telomerów. Powinno wiązać się z nimi wiele nadziei w związku z ich wiodącą rolą w starzeniu się komórek. Teoria Harmana, inaczej wolnorodnikowa, mówi o szkodliwym działaniu wolnych rodników dla homeostazy całej komórki. Potwierdza to wiele badań [6, 24, 25]; doniesienia z laboratoriów całego świata wskazują na to, że stres oksydacyjny to jedna z głównych przyczyn przedwczesnej śmierci komórek. Wolne rodniki to atomy lub grupy atomów posiadające niesparowane elektrony powstałe na skutek jednoelektronowych redukcji [21]. Można to zapisać krótkim wzorem:



Jest to standardowy anion ponadtlenkowy. Do wolnych rodników należą także nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodniki nadtlenkowe ( $ROO^*$ ) i rodnik hydroksylowy ( $OH^*$ ), który jest szczególnie czynną cząsteczką reagującą z białkami, kwasami nukleinowymi, lipidami i in. [21]. Pozostałe WRT powstają wskutek takich reakcji, jak reakcja Fentona (z udziałem żelaza dwuwartościowego) i reakcja z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej, wyjątkowo aktywna w granulocytach obojętnochłonnych, uczestnicząca w tzw. eksplozji oddechowej.

## TELOMERY I ICH SKRACANIE

Pierwszy obraz telomeru został naszkicowany na podstawie obrazu mikroskopowego w roku 1910 przez niemieckiego biologa Theodora Boveriego. Zaznaczył chromosomy w fazie podziału mitotycznego u nicienia (*Ascaris*) wraz z końcowymi fragmentami zagęszczonej chromatyny [10]. Następnie w latach trzydziestych McClintock i Muller pokazali, że po pęknięciu chromosomu, odłamany koniec staje się niestabilny. Jednak dalsze badania wykazały, iż tuż po zapłodnieniu komórki jajowej, w dzielących się komórkach złamane końce mają zdolność genetycznie determinowanej regeneracji. Przez kilka następnych dekad wykazano związek między końcowymi odcinkami chromosomów a kolejnymi cyklami komórkowymi. Zauważono różne zagęszczenie chromatyny telomerowej w mitozie, mejozie i interfazie. Odkryto regiony bogate w wyspy zasad guaninowych i, co najważniejsze, tandemowo powtarzające się odcinki specyficzne gatunkowo [3]. Pierwsza taka sekwencja została wyodrębniona z zamplifikowanego rDNA rzęskowego pierwotniaka *Tetrahymena thermophila* [3, 10]. Było to 50 tandemowych powtórzeń w układzie heksamerowym CCCAA/GGGGTT. Niedługo potem podobne powtarzające się sekwencje wykazano w telomerach ludzkich.

Telomery to końcowe odcinki wszystkich chromosomów jądrowych (na obu ramionach p i q) z powtarzającymi się sekwencjami typu SINE. U człowieka jest to sekwencja (w kierunku 3'): 5'-TTAGGG-3'. Wiele wzorów typu GT jest źródłem metyloguaninowej postaci heterochromatyny (metylacja chroni DNA przed szkodliwym działaniem środowiska zewnętrznego i białkami własnej komórki, w której się znajduje. Wykazano, że wszystkie komórki ludzkie tracą część swojego wzoru metylacyjnego proporcjonalnie do kolejnych podziałów. Wskaźnik metylacji DNA u młodych myszy w komórkach wątroby jest wyższy niż u starszych. Utrata wzoru metylacji w telomerach jest jednym ze wskaźników starzenia się komórki i ważnym punktem odniesienia do hipotetycznych terapii genowych.) [2, 17], które znajdują się także w centromerach. Każdy chromosom zawiera początkowo od 6 do 10 tysięcy telomerowych nukleotydów. Telomery mają też swoje określone funkcje i właśnie one są punktem odniesienia korelacji między skraca-

niem się telomerów a utratą zdolności komórki do dalszej egzystencji. Głównymi funkcjami końcowych odcinków chromosomów są: uczestniczenie w ostatnim etapie replikacji (terminacja), ochrona przed łączeniem się chromosomów ze sobą (rekombinacje homologiczne) i przed niepożądanym działaniem egzonukleaz oraz zdolność wpływania na ekspresję genów. Ta ostatnia funkcja regulatorowa ma znaczący wpływ na proces starzenia się; przy każdym z regionów subtelomeryowych mieszczą się *loci* wielu genów, choć regulacja transkrypcji przez telomery zapewne nie ogranicza się tylko do genów przy nich się znajdujących. Łatwo to sobie wyobrazić: utracenie dużego fragmentu telomeru zmniejsza działanie regulacyjne tegoż i komórka (dokładnie jądro) traci kontrolę nad transkrypcją wszystkich genów, w tym odpowiedzialnych za naprawę DNA i cyklu komórkowego (cykliny, białka sekwestracyjne, etc).

Poza tym telomer to region heterochromatynowy, bogato zmetylowany. Dzięki temu w pewien sposób wycisza niektóre geny okołotelomerowe (telomer i region okołotelomerowy stanowią razem końcowy fragment restrykcyjny – TRF). Po utracie części tej heterochromatyny, pewne geny stają się aktywne i ich produkty dwójako mogą wpływać na pozostałe geny: jedne z nich mają efekt pozytywny, inne negatywny, wskutek czego aktywują inne *loci* odpowiedzialne na przykład za spowolnienie procesów metabolicznych i utratę kontroli nad podziałem komórkowym, co może stanowić ważny punkt oparcia dla współczesnej gerontologii.

Jak do tej pory, nie udzielono wyczerpującej odpowiedzi na pytanie, dlaczego po przejściu określonej liczby podziałów komórka umiera [1]. Wydaje się, że najważniejszą przyczyną starzenia się komórek, a co za tym idzie całego organizmu, jest skracanie się telomerów. Przez ostatnie trzy dekady wiele badań potwierdziło dodatnią zależność między skracaniem się telomerów a zmniejszeniem ogólnie pojętej żywotności i skróceniem czasu życia [4, 5, 16]. Nasuwa się pytanie: Dlaczego telomery się skracają?

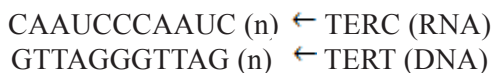
Otóż ruch widełek replikacyjnych w nici wiodącej jest skierowany w uprzywilejowaną stronę 5'-3', co oznacza, że nić opóźniona (3-5') jest nieco „pokrzywdzona”. Tutaj synteza nowej nici jest bardziej skomplikowana. Bowiem w pewnych odstępach od siebie (~10 nukleotydowych, gdyż tyle potrzebuje starter RNA) powstają 150 nukleotydowe struktury zwane fragmentami Okazaki, warunkiem powstania których jest krótki odcinek nukleotydowy znajdujący się przed nimi, tzw. odcinek inicjacyjny (startowy). W telomerach ostatni primer nie ma możliwości przyłączenia się do kolejnego odcinka inicjacyjnego, ponieważ jest to już końcowy fragment chromosomu. W związku z tym, z każdym podziałem komórki (z każdą kolejną syntezą nowego DNA) chromosomy tracą około 150 nukleotydów. Zważywszy na fakt, że telomery posiadają średnio 8 tysięcy nukleotydów, łatwo obliczyć, iż po każdym cyklu komórkowym tracą one około 0,02% swej długości. Wykazano, że po zmniejszeniu się długości telomerów poniżej 1,5 kbp, ich struktura słabnie i stają się bardziej podatne na uszkodzenia oraz działanie czynników zewnętrznych.

## TELOMERAZA – NADZIEJA DLA GERONTOLOGII?

Wszystko się zmieniło od czasu odkrycia p w 1984 u *Tetrahymena* przez Greidera i Blackburna enzymu, który miałby zapobiegać, a nawet cofać zmiany związane z utratą kolejnych odcinków telomerów. To „cudowne” białko okazało się w następnych latach kompleksem białek, które razem odbudowują końcowe odcinki chromosomów po każdym podziale komórki. Wywołało to burzę naukową wśród zwolenników i przeciwników teorii możliwości wydłużania życia. Enzym ten (kompleks enzymów) nazwano telomerazą i od razu rozpoczęto poszukiwania genu/ów kodujących. Pierwsze badania zostały przeprowadzone w 1989 przez Vicki Lundblad i Jacka Szostaka, którzy zidentyfikowali u drożdży gen, *EST1*. Okazał się on genem kodującym produkt należący do ogólnie pojętej telomerazy. Niedługo potem odkryli oni główne białko telomerazy [19] – TERT (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*). W następnych latach odkrywano kolejne jednostki składowe tego dużego kompleksu. Mimo wielu białek wchodzących w skład telomerazy, trzy mają najważniejsze znaczenie:

- 1) TERT (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*)
- 2) TERC (TR) (ang. *Telomerase RNA Component*)
- 3) DKC1 (ang. *Dyskerin*) – ściślej ujmując, kompleks dyskeryny: dyskeryna (DKC1), Nhp2, Nop10 i Gar1

Zasada działania telomerazy jest w gruncie rzeczy prosta. Otóż TERT działa jako swoista polimeraza (odwrotna transkryptaza, jak u retrowirusów), która przyłącza sześć dNTP (TTAGGG) do końca chromosomu, a TERC (TR) stanowi rybonukleotydowy szablon, na podstawie którego TERT syntetyzuje brakujące nukleotydy. Kompleks dyskeryny służy do stabilizacji całej telomerazy.



Różne prace naukowe, ale również bazy internetowe służą pomocą w poznawaniu kolejnych sekwencji nowo identyfikowanych białek i udostępniają aktualne wyniki badań nad ich korelacjami i współpracą. Jedną z nich jest baza STRING (w której można bliżej zapoznać się z gęstą siecią powiązań międzybiałkowych kompleksu telomerazy. Niektóre z tych białek odgrywają wielką rolę w procesie naprawy DNA i starzenia się komórki, np. protoonkogen MYC, białko szoku termicznego HSPA1 i HSP90A1 (uczestniczące w stabilizacji i fałdowaniu białek), etc.

Ostatnio przeprowadzono i opublikowano wiele badań na temat działania telomerazy w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Wyniki każdego z nich sukcesywnie zaskoczyło samych badaczy. Khokhlov w swoim artykule poświęconym starzeniu się komórek [18] z 2013 roku opisuje przypadek, w którym po podaniu telomerazy do powoli umierającej komórki, zaobserwowano wydłużenie się odcinków

telomerowych i powrót do stanu homeostazy, tym samym przekroczenie limitu podziałów Hayflicka.

W 2010 roku zespół Ronalda dePinho z uniwersytetu Harvarda opublikował na łamach czasopisma *Nature* rewolucyjne wyniki badań nad telomerazą [20], w których pozbawili myszy genu kodującego 4-hydroksytamoxyfen. Otóż estrogeny, poprzez receptory dla estrogenów (ER), modułują transkrypcję TERT (TERT-ER) i tym samym pobudzają komórki do syntezy telomerazy. Jednak prawidłowo działający receptor wymaga modulacji w postaci 4-hydroksytamoxyfenu (4-OHT). Jeśli zabraknie produktu tego genu, kompleks telomerazy nie powstanie w komórce. Myszy pozbawione genu *4-OHT* wykazywały spadek aktywności fizycznej i typowe objawy somatyczne związane z późnym wiekiem, mimo że były młodymi i zdrowymi osobnikami. Poza tym obserwowano wiele zmian w strukturze chromosomów jądrowych, takich jak zmniejszenie fluorescencji w metodzie FISH w regionach telomerów oraz fuzje typu robertsonowskich (translokacje zrównoważone o typie fuzji centrycznych chromosomów akrocentrycznych). Po podaniu telomerazy do komórek pozbawionych *4-OHT* (ang. *knock-out genes*), wszystkie zaobserwowane zmiany albo cofnęły się, albo też spowolniły, a komórki ponownie (a nawet ze zwiększoną szybkością) zaczęły się dzielić.

Powyższe badania wskazują na ogromny postęp w zrozumieniu procesów stojących za starzeniem się komórek i dają nadzieję na to, że w przyszłości działania prewencyjne będą obejmowały pewne działania, mające zdolność przedłużenia „okresu przydatności” być może wszystkich komórek.

## LICZBA HAYFLICKA – HIPOTEZY

Liczba Hayflicka (ang. *the Hayflick limit*) charakteryzuje maksymalną liczbę podziałów komórki, która po osiągnięciu limitu, obumiera. W swoich badaniach [13] Hayflick i Moorhead wykazali, że komórka posiada ograniczony potencjał mitotyczny i po przekroczeniu pewnej określonej liczby podziałów, dochodzi w niej do zmian, w skutek których umiera. Ten tak zwany fenomen III fazy (Hayflick wyróżnił trzy fazy życia hodowli komórek) liczy sobie mniej więcej 50 do 70 podziałów, po których komórka umiera. Dotyczy to niemal każdej komórki, z kilkoma wyjątkami, do których należą komórki pnia szpiku (krwiotwórcza komórka macierzysta), komórki macierzyste zarodkowe, płodowe i somatyczne, czy też rozrodcze. Pytanie brzmi, dlaczego po pewnej stałej liczbie podziałów, komórka umiera. Jeszcze w latach sześćdziesiątych XX wieku nie poznano wszystkich procesów stojących za starzeniem się, jakie znamy dzisiaj. Teoria skracania telomerów tłumaczy wręcz idealnie fenomen Hayflicka. Wspomniano wcześniej w pracy, że już utrata 1,5 kpz wpływa destabilizująco na cały chromosom. Z prostego rachunku, pomnożenie jednorazowej utraty nukleotydów (~ 150) przez średnie 50



podziałów wynika, że chromosom traci ponad 7,5 kpz, co znacząco może wpłynąć na strukturę chromatyny.

W dostępnej literaturze naukowej nie znaleziono informacji na temat jednej, bardzo ważnej rzeczy. Dla przypomnienia, replikacja zachodzi zawsze w kierunku  $5' \rightarrow 3'$ , gdyż  $5'$ -OH pentozy jednego nukleotydu łączy się zawsze z  $3'$ -OH pentozy drugiego. Replikacja liniowa kwasu dezoksyrybonukleinowego (podwójnej helisy) ma charakter semikonserwatywny, czyli jedna nić jest matrycą (niesyntezyzowana), natomiast druga powstaje *de novo* (syntetyzowana). Znaczy to tyle, że jeśli nicią matrycową jest nić o kierunku  $5' \rightarrow 3'$ , to nowa nić o kierunku przeciwnym  $3' \rightarrow 5'$  będzie nicią opóźnioną powstałą z fragmentów Okazaki i przez to straci na końcu jeden z nich (patrz wyżej). Natomiast do drugiej nici matrycowej ( $3' \rightarrow 5'$ ) zostanie zsyntetyzowana nić wiodąca i nie utraci końcowego fragmentu telomeru. W kolejnym cyklu będzie odwrotnie. Okazuje się, że tylko połowa nowych chromosomów utraci pewien fragment DNA podczas jednego cyklu. Podczas drugiego cyklu druga połowa z nićmi wiodącymi zostanie „nienaruszona”, a ta z nićmi opóźnionymi „pokrzywdzona”. Trzeba pod uwagę wziąć losową segregację materiału genetycznego podczas telofazy, przez co nowa komórka może zawierać mniej lub więcej skróconych telomerów, a to sprawia, że część komórek będzie żyła nieco dłużej od tych z większą utratą materiału genetycznego (Jednak nie są to duże i znaczące zmiany, acz w pewnych obliczeniach i prowadzonych badaniach warto jest mieć ten fakt na względzie).

Jednak należy wziąć pod uwagę dwa fakty. Po pierwsze, 50 podziałów to liczba względna i uśredniona, która nie oddaje dokładnych stosunków między komórkami różnych tkanek. Po drugie, jeden cały cykl komórkowy (G1, S, G2, M) trwa różnie długo, zależnie od rodzaju komórki; kiedy komórkom nabłonka jelit wystarczy zaledwie 12 godzin na przejście całego cyklu, hepatocytom zajmuje to średnio rok. Oznacza to, że względna umieralność komórek nabłonka jest większa niż komórek wątroby. Według chłodnej kalkulacji, jednej wątrobowej komórce miąższu zajmuje aż 50 lat, nim osiągnie limit długości życia, a komórce nabłonka zaledwie 25 dni. Fibroblastom przejście przez jeden cykl zajmuje średnio 20 godzin, co oznacza, iż średnia długość ich życia to 41 dni. Stosunki te odzwierciedlają się w fizycznych i biochemicznych aspektach w starzejącym się organizmie (starcze zmiany skórne i zaburzenia pracy układu pokarmowego występują szybciej niż te w wątrobie, pod warunkiem, że człowiek prowadzi zdrowy tryb życia). Oczywiście, ludzie nie tracą skóry po miesiącu, ani też jelito nie obumiera po zaledwie trzech tygodniach, gdyż martwe komórki zastępowane są przez nowe, ulegające proliferacji i różnicowaniu z komórek macierzystych umieszczonych w tzw. niszach w odpowiednich narządach. Jednak po pewnym czasie różnicowanie komórek macierzystych w kierunku właściwych komórek tkankowych nie dorównuje utracie „starych” komórek. Narząd zaczyna działać mniej efektywnie, aż w końcu obumiera.

Jeśli rzeczywiście chromosomy tracą około 150 nukleotydów podczas cyklu komórkowego, a cykl ten w różnych komórkach różnie długo trwa, jedna tkanka traci swoje komórki szybciej aniżeli druga. W tym rozumowaniu:

Hayflick limit (CPDs – ang. *Cumulative Population Doublings*; HL) = liczba utraconych nukleotydów\* liczba cykli komórkowych ,

$HL = LNN \times CCN$ , gdzie (wzór 1.)

HL – ang. (*Hayflick Limit*) – Limit Hayflicka

LNN – ang. (*Lost Nucleotides Number*) – Liczba określająca utracone nukleotydy

CCN – ang. (*Cell Cycles Number*) – Liczba cykli komórkowych

Jednak szybkość ( $v$  – ang. *velocity*) całego cyklu komórkowego różni się w zależności od rodzaju komórki.

Tak więc:

$HL = LNN \times (CCN \times CCV)$ , gdzie (wzór 2.)

CCV – (ang. *Cell Cycle Velocity*)

Iloczyn liczby cykliów i ich szybkości (długości trwania) byłby stałą odpowiednią dla pojedynczej komórki.

Gdyby powyższy wzór (2.) okazał się prawdziwy w rozumieniu matematycznym, wynikałoby iż komórka dzieląca się szybciej umierałaby stosunkowo prędzej niż ta, której czas trwania cyklu byłby dłuższy. Dlaczego więc niemal wszystkie komórki mają podobny limit podziałów? Być może komórka szybciej ulegająca podziałowi posiada pewne właściwości rekompensacyjne (więcej transkryptów TERT, większa liczba receptorów ER, więcej tandemowych powtórzeń w regionach telomerowych). Lub też, co także tłumaczy wyraźną różnicę między tkankami, poszczególne narządy odznaczające się szybkim metabolizmem komórkowym i szybką proliferacją, posiadają w swych niszach większą liczbę komórek macierzystych (zważywszy na fakt, iż powierzchnia skóry przewyższa kilkukrotnie powierzchnię wątroby, należałoby oczekiwać więcej komórek macierzystych). To tylko teorie czekające w przyszłości na weryfikację.

## **ZMIANY W KOMÓRCIE SPOWODOWANE SKRACANIEM SIĘ TELOMERÓW**

Telomery stanowią precyzyjną ochronę chromosomu przed aberracjami. Na ich końcu nic bogata w zasady C i A jest krótsza od nici bogatej w zasady T i G. W telomerze występuje fragment 100-280 nukleotydowy [27] zasady guaninowej, która to

tworzy tzw. szpilkę do włosów, strukturę trzeciorzędową białka (nazywaną czasami pętlą telomeru). Powstają również wiązania wodorowe między nukleotydami guaninowymi, które formują strukturę czteroniciową [27]. Dodatkowa linia obrony telomerów to proteinowa czapeczka na ich końcu (telosom), która ma za zadanie stabilizować całą strukturę, chronić przed nukleazami i stanowić sygnał dla systemu naprawczego o właściwym zakończeniu chromosomu. Badania wskazują, że brak telosomu (shelteryny) doprowadza między innymi do niehomologicznego wiązania się końców chromosomów i starzenia się komórki [9]. Wszystkie te elementy obronne zabezpieczają chromatynę przed rozpadem i strawieniem.

Po granicznej utracie heksamerów telomerowych dochodzi do zmian strukturalnych, a te z kolei prowadzą do niechybnych zmian funkcjonalnych. Uszkodzenie czapeczki i utrata zabezpieczenia w postaci heterochromatyny wywołuje lawinę zdarzeń [8, 11], która doprowadza do utraty kontroli nad ekspresją genową i cyklem komórkowym.

Telomery chroni wiele białek, które stabilizują całą ich strukturę przestrzenną. Wśród nich wiodąca rola przysługuje TRF1 i TRF2, które wspólnie z innymi białkami – TIN2, TERF2IP, ACD i POT1 – tworzą wyżej wspomniany telosom. Silna interakcja pomiędzy białkiem ku70 (XRCC6; 22q13.2) a kompleksem telosomu jest konieczna do utrzymania stałej długości telomeru i jego stabilizacji. Wykazano zależność między utratą produktu genu XRCC6 a osłabieniem telosomu i destabilizacją telomeru [14]. Białko ku70 u *S. cerevisiae* pełni rolę helikazy uczestniczącej w rozpoczęciu naprawy uszkodzeń DNA i stanowi silne ogniwo między systemem naprawczym a zdarzeniami prowadzącymi do apoptozy; przemawia za tym udowodniona korelacja między tym białkiem a p53. Prócz włączenia systemu naprawy DNA, zaczyna się ekspresja białek cyklu komórkowego, jak p53, pRb i ATM. A także myc, c-fos, jun i inne. Chromosomy zaczynają łączyć się ze sobą końcami i tworzyć różne przestrzenne struktury (w tym chromosomy koliste). Wszystko to dzieje się na rzecz utraty kolejnych fragmentów genomu i włączenia licznych białek naprawczych i kontrolnych. Zaburza się metabolizm komórki, zatrzymuje się ona na granicy faz G1/S, większość genów zostaje wyciszonych lub spowolnionych, poprzez dodatnie sprzężenie zwiększa się poziom ROS, co dodatkowo destabilizuje chromatynę i prowadzi do gwałtownych zmian mutacyjnych. Ostatecznie komórka wchodzi na szlak programowanej śmierci.

## STARZENIE SIĘ KOMÓREK – WŁASNE HIPOTEZY

Na początku artykułu przedstawiono kilka spośród najpowszechniejszych hipotez tłumaczących starzenie się. Przypuszcza się, że starzenie się jest uwarunkowane wieloczynnikowo i nie sposób jest podać jednej konkretnej teorii, która wyjaśniłaby wszystko. Jednak wydaje się, że dwa spośród wszystkich hipotetycz-

nych rozważań mogą wspólnie wyjaśnić cały proces starzenia się komórek w rozumowaniu czysto teoretycznym.

Teoria wolnorodnikowa tłumaczy procesy stojące za innymi hipotezami:

- a) Rubnera
- b) zatrucia
- c) sieciowania
- d) Orgela
- e) mitochondrialnej
- f) mutacji somatycznych

Jednakże teoria mitochondrialna powinna zostać zawarta w pojęciu wolnych rodników, gdyż łatwo zauważyć czystą analogię pomiędzy nimi. Powyżej w artykule wyjaśniono rolę wolnych rodników w procesie starzenia się. Kolejne badania coraz bardziej wskazują na to, że utrata kontroli nad procesami oksydacyjnymi jest przyczyną wszystkich patologicznych zmian w komórce, w tym tworzenia wiązań krzyżowych (teoria sieciowania), gromadzenia się zmian mutacyjnych w nDNA i mtDNA, za którymi systemy naprawcze nie nadążają, aż w końcu suma wszystkich nagromadzonych błędów (teoria Orgela i mutacji somatycznych) uszkadza materiał genetyczny, a w toku wydarzeń powstałe związki trujące, jak lipofuscyna gromadzą się w organellach i równocześnie ze zmianami w kwasach nukleinowych uszkadzają struktury wewnątrzkomórkowe (teoria zatrucia), wskutek czego komórka za sprawą kolejnych ciągów przyczynowo – skutkowych wchodzi na szlak zaprogramowanej śmierci (apoptoza).

W tym samym czasie zmiany zachodzące w końcowych odcinkach chromosomów (telomery) i ich skracanie, prowadzące do utraty funkcji pewnych genów i włączenia drugich, skutkują podobnymi konsekwencjami. Oczywiście, badania w gerontologii są jeszcze stosunkowo świeże, i mało poznane reakcje stojące za procesem starzenia i powolnego osłabienia organizmu nie pozwalają na wysunięcie ostatecznych wniosków, aczkolwiek wspólna teoria rodnikowo – telomerowa jest w stanie w znacznej mierze wyjaśnić fenomen Hayflicka i daje możliwości działań profilaktycznych.

Niektórzy podają śmielsze hipotezy związane ze starzeniem. W 2015 roku ukazała się praca naukowców z Wydziału Zdrowia Publicznego z Bejrutu, którzy zakładają możliwość wpływu wariantu białka histonowego H3.3 na strukturę i funkcję chromatyny [22]. Inni natomiast zgadzają się z teorią telomerową (zyskującą coraz większe poparcie) i co chwila podają nowe wyniki badań. Już w 1996 zespół J.W. Shaya i W.E. Wrighta opublikował wyniki eksperymentu z użyciem ludzkich fibroblastów skóry i komórek nabłonkowych siatkówki (warte uwagi jest to, że wykorzystano komórki mezenchymy i całkowicie przeciwne komórki nabłonka). Komórki pozbawione hTERT miały zbliżony do średniej czas

życia, z kolei u tych, u których transferaza ulegała ekspresji, wykazano podziały komórkowe przekraczające 500 cykli (wynik podobny w obu typach komórek) [23]. W cytowanej już wcześniej pracy M. S. Cooke'a uszkodzenia materiału genetycznego spowodowane przez procesy oksydacyjne stawia się na pierwszy plan. Autorzy pracy poświęcają ją przede wszystkim 8-okso-2'-deoksyguanozynie (8-oxo-dG), produktowi oksydacji deoksyguanozyny. Związek ten staje się przyczyną włączenia systemów naprawczych DNA, NER i BER, lecz po większym nagromadzeniu toksycznej zasady, system naprawy zawodzi i skutkuje to mutacjami, niestabilnością odcinków mikrosatelitarnych, delecjami i innymi zaburzeniami.

Jak widać, naukowcy poszukują wyjaśnienia przyczyny starzenia się na wiele sposobów i nierzadko okazuje się, że wielu z nich ma rację, co do postawionej przez siebie hipotezy. Wszystko to dowodzi, że wolne rodniki tlenowe i skracanie się telomerów wybija się na czołówkę tychże przyczyn.

Należy się skupić na dwóch aspektach:

1. Po pierwsze zlokalizować wszystkie geny uczestniczące w tworzeniu kompleksu telomerazy i białek regulatorowych loci genów kompleksu telomerazy; odszukać geny wzmacniane bądź wyciszane w trakcie utraty znacznej liczby zasad w regionie telomerowym i to na nich skupić wysiłki badawcze; poznać dokładnie działanie telomerazy i, jeśli to możliwe, wyodrębnić te jej składowe, które wystarczyłyby do uformowania podstawowej jednostki czynnościowej (im więcej białek niezbędnych do utworzenia funkcjonalnego kompleksu, tym trudniej odtworzyć *in vitro* jego działanie).
2. Po drugie opracować i zastosować odpowiednią terapię antyoksydacyjną w celu zmniejszenia toksycznego działania wolnych rodników.

Najbardziej interesujące w tym kontekście wydają się chromosom 17 i gen *TP53*, którego produkt stanowi jedno z głównych ogniw w kontroli przejścia komórki z fazy G1 do fazy replikacji DNA. Co ciekawe, gen *TP53* mieści się właśnie w regionie subtelomerowym krótkiego ramienia chromosomu (17p13.1) i można by założyć, że musi istnieć korelacja pomiędzy lokalizacją genu, skróceniem telomeru i szczególną rolą regulatorową białka p53. Odpowiednie badania, w których mierzyloby się aktywność ekspresji genu *TP53* wraz ze stopniowym pozbawianiem zasad od pter chromosomu 17 do regionu 13.1, pozwoliłyby ustalić trafność tych przypuszczeń. Ponadto podawanie egzonukleaz trawiących część telomerową chromosomu 17 i jednocześnie monitorowanie wybranych kilku innych ważnych białek (w tym MYC, C-FOS, RB i MSH) pozwoliłoby poszerzyć zakres wiedzy na temat kolejnych zdarzeń następujących w związku z utratą stabilizacji telomerów.

Gdyby rzeczywiście udało się wyodrębnić właściwe geny telomerazy i w warunkach laboratoryjnych odtworzyć jej działanie, narodziłby się poważniejszy dylemat: w jaki sposób umieścić enzym w każdej komórce ciała, tak by proces starzenia móc zatrzymać na poziomie komórkowym każdej tkanki (prócz tych paru, które nie posiadają jądra, bądź też się nie dzielą). Wykorzystanie komórek macierzystych wydaje się nieuzasadnione i bezcelowe, gdyż nie miałyby to większego wpływu na zatrzymanie skracania się telomerów; tym bardziej, że ludzki organizm posiada wiele niewykorzystanych aż do śmierci multi i pluripotencjalnych komórek we wspomnianych wcześniej niszach. Być może znalezienie sposobu na aktywację genów telomerazy poprzez efekty środowiska zewnętrznego (różnego rodzaju substancje farmakologiczne) znalazłoby w przyszłości zastosowanie, choć nie jest to wcale pewne.

Można sądzić, że działania bezpośrednio przeciwdziałające powstawaniu ROS są raczej fikcją niż możliwym i realnym przedsięwzięciem. Procesy oksydacyjne są najważniejszymi metabolicznymi szlakami homeostazy ustroju i chwilowo nie ma sposobu, aby móc w jakikolwiek sposób zablokować spontaniczne powstawanie wolnych rodników. Jednakże należy mieć na uwadze fakt, że wolne rodniki tlenowe służą fizjologii ustroju, na przykład w zdolności fagocytyzującej makrofagów czy też w procesie apoptozy komórek. Z wiekiem, kiedy organizm się starzeje, dochodzi do zaburzenia równowagi między produkowaniem przez organizm reaktywnych form tlenu (wolnych rodników) a ich wykorzystaniem i usuwaniem. Dlatego nie należy prowadzić czynności mających za zadanie całkowite usunięcie wolnych rodników tlenowych z organizmu lub zredukowanie ich stężeń w komórkach do wartości minimalnych. Aczkolwiek rozważny udział rozwiązań farmakologicznych w próbie zmniejszenia podwyższającego się stężenia wolnych rodników w starzejącym się organizmie ma istotny wpływ na sam proces starzenia się. Udowodniono ochronne, wręcz antyoksydacyjne działania wielu naturalnych związków, jak na przykład kwas gamma – linolenowy, selen, cynk, witaminy A, C, E, B<sub>6</sub>, glutation, kwas moczowy, ubichinon, a także białka (np. albuminy i p66Shc), a nawet merkaptoetanol. Zdrowe odżywianie się i racjonalne dostarczanie organizmowi tych składników może posłużyć jako „naturalny lek” na starzenie się.

Jeszcze długa i kręta droga przed nauką, by w pełni poznać i zrozumieć procesy starzenia się. Jest to najważniejsze i nieodzowne narzędzie natury, bez którego życie na Ziemi nie byłoby w stanie dalej trwać. Śmierć jest rzeczą naturalną i nie sposób się z nią mierzyć. Jednak odpowiednie zaangażowanie się w temat, jakim jest powolna utrata żywotności organizmów żywych, pozwoli, być może w niedalekiej już przyszłości, na stosunkowo dłuższą egzystencję.

## LITERATURA

- [1] BAL J. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. PWN 2011.
- [2] BERLETTCH JE, PHIPPS SM, WALTHALL LG. A method to study the expression of DNA methyltransferases in aging systems in vitro. *Tollefsbol TOMethods Mol Biol* 2007; **371**: 81-87.
- [3] BLACKBURN EH, GALL JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *Journal of Mol Biol* 1978; **120**: 33-3.
- [4] BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cell. *Science* 1998; **279**: 349-352.
- [5] CAWTHON RM, SMITH KR, O'BRIEN E, SIVATCHENKO A, KERBER RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003; **361**: 393-395.
- [6] COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M, LUNEC J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 2003; **17**: 1195-1214.
- [7] DAVIDOVIC M. Old age as a privilege of the "selfish ones". *Aging Dis* 2010; **1(2)**: 139-146.
- [8] DE BRUIN D, ZAMAN Z, LIBERATORE RA, PTASHNE M. Telomere looping permits gene activation by a downstream *UAS* in yeast. *Nature* 2001; **409**: 109.
- [9] DE LANGE P, DE LANGE W, DE LANGE T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annual Reviews* 2008; **42**: 301-334.
- [10] DE LANGE T, LUNDBLAD V, BLACKBURN E. Telomeres, second edition. *Cold Spring Harbor* 2006.
- [11] DUBOIS ML, HAIMBERGER ZW, MCINTOSH MW, GOTTSCHLING DE. A quantitative assay for telomere protection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2002; **161**: 995-1013.
- [12] GOLAB J, JAKOBISIAK M, LASEK W, STOKŁOSA T. Immunologia. PWN 2012.
- [13] HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; **25**: 585-621.
- [14] HSU HL, GILLEY D, GALANDE SA, HANDE MP, ALLEN B, KIM SH, LI GC, CAMPISI J, KOHWI-SHIGEMATSU T, CHEN DJ. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & Dev* 2000; **14**: 2807-2812.
- [15] JIN K. Modern biological theories of aging. *Aging Dis* 2010; **1(2)**: 72-74.
- [16] JOENG KS, SONG EJ, LEE KJ, LEE J, SONG. Long lifespan in worms with long telomeric DNA. *Nature Gen* 2004; **36**: 607-611.
- [17] KAWAKAMI K, NAKAMURA A, ISHIGAMI A, GOTO S, TAKAHASHI R. Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. *Biogerontology* 2009; **10**: 416-421.
- [18] KHOKHLOV AN. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors. *Curr Aging Sci* 2013; **6**: 14-20.
- [19] LUNDBLAD V, SZOSTAK JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 1989; **57**: 633-643.
- [20] MARIELA JASKELIOFF ET ALL. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 2011; **469**: 102-106.
- [21] MURRAY RK, GRANNER DK, RODWELL VW. Biochemia Harpera. PZWL 2010.
- [22] SAADE E, PIROZHKOVA I, AIMBETOV R, LIPINSKI M, OGRYZKO V. Molecular turnover, the H3.3 dilemma and organismal aging (hypothesis). *Aging Cell* 2015; **14**: 322-333.
- [23] SHAY JW, WRIGHT WE. Implications of Mapping the Human Telomerase Gene (hTERT) as the Most Distal Gene on Chromosome 5p. *Neoplasia* 2000; **2**: 195-196.
- [24] SIES H. Oxidative stress. *Redox Biol* 2015; **4**: 180-183.
- [25] SOHAL RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 37-44.

- [26] TERMAN A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 611-619.
- [27] WEBB CJ, WU Y, ZAKIAN VA. DNA Repair at Telomeres: Keeping the Ends Intact. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**: a012666.
- [28] WOOD RD, MITCHELL M, SGOUROS JG, LINDAHL T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; **291**: 1284-1289.

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymno: 20.10.2016*

*Przyjęto: 01.12.2016*

*Steve Liebich*

*e-mail: veryhouse.aha@gmail.com*