

10. BIOLOGIA STARZENIA W ŚWIELE METODY MIKROELEKTROFOREZY WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ – EMN¹

Wprowadzenie

Biologia starzenia z punktu widzenia podstawowych badań naukowych jest dziedziną nauki obdarzoną mnóstwem nie odkrytych jeszcze tajemnic. Wynika to po pierwsze z trudności natury technicznej jakie napotyka na drodze poznania złożoności i skomplikowania procesów biologicznych a po drugie z prozaicznej przyczyny, mianowicie agendy rządowe oraz inni decydenci kontrolujący podział pieniędzy na badania naukowe, częściej są skoryzy finansować pewne wybrane gałęzie nauk medycznych zajmujących się dolegliwościami wieku starczego – które relatywnie szybko można przełożyć na finansowy zysk – niż dziedziny badań podstawowych zajmujących się poznaniem podstaw procesów starzenia, które mogą być wysoce efektywne finansowo ale zwykle w dalszej przyszłości. Oczywiście i na tym polu nauka ma olbrzymie osiągnięcia w poznaniu złożoności podstawowych procesów biologii starzenia. Jednak właśnie ta złożoność procesów, istnienie wielkiej ilości różnych teorii próbujących tłumaczyć procesy starzenia oraz finansowa kalkulacja kosztów związanych z poznaniem mechanizmów starzenia powodują, że pomimo dużej atrakcyjności naukowej hasła „aging” wydaje się, że problem ten nie jest w pełni eksploatowany z punktu widzenia badań podstawowych (oczywiście relatywnie ujmując wszelkie nakłady fi-

¹ Nazwa metody ujętej w tytule to bezpośrednie tłumaczenie angielskiej nazwy „intracellular microelectrophoresis”. Jest to nazwa metody badawczej tożsamej z funkcjonującą od ponad 10 lat metodą badawczą rozwijaną w Zakładzie Biologii Rozwoju Człowieka Instytutu Antropologii UAM i bliżej znanej jako EMN (*Electrophoretical Mobility of Cell Nuclei*) – elektroforetyczna ruchliwość jąder komórkowych. W literaturze światowej spotykamy się również z nazwą ENN (*Electronegativity of Nuclei*). Zarówno określenie „intracellular microelectrophoresis” jak i rozwinięcie skrótu ENN oddają biofizyczny charakter zastosowanej metodyki badawczej oraz charakter zmian jakie występują w procedurze badawczej. Stosowana natomiast w Polsce nazwa, skupia się na opisie zjawiska „makro” drgających jąder komórkowych, jakie obserwowane jest w trakcie przeprowadzania eksperymentu badawczego.

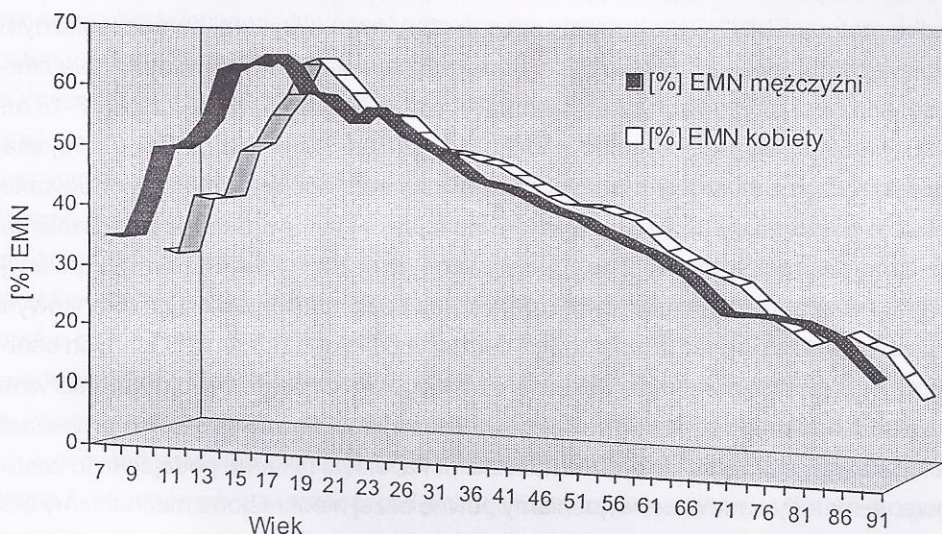
nansowe na naukę). Komórki organizmu starszego są bardziej podatne na działanie różnorodnych czynników patogennych i innego rodzaju uszkodzenia, jednak mimo tego większe fundusze kieruje się na poznanie typowych przypadłości wieku podeszłego jak: choroby układu sercowo-naczyniowego, układu nerwowego (choroba Alzheimera, Parkinsona), czy zwiększonego w tym okresie ontogenezy prawdopodobieństwa zachorowania na raka niż na poznanie podstawowych mechanizmów starzenia się organizmu, które niewątpliwie mogą i wpływają na częstość wystąpienia tych dolegliwości u ludzi. Doceniam oczywiście oba problemy badawcze, które wzajemnie zazębiając się przynoszą korzyści w jednym jak i w drugim wskazanym aspekcie badań.

Różne są metody badań procesów starzenia organizmu człowieka, zarówno w aspekcie praktycznych zastosowań ich wyników jak i badań podstawowych. Propozycją badań procesów starzenia może być metoda „mikroelektroforezy wewnątrzkomórkowej” czy też inaczej metoda EMN (*Electrophoretical Mobility of Cell Nuclei*) – elektroforetycznej ruchliwości jąder komórkowych, która prosta w zastosowaniu może stać się narzędziem badawczym w ręku auksologa, antropologa czy gerontologa z punktu widzenia jej zastosowań praktycznych. Możemy potraktować ową metodę jako kolejny „miernik” procesu starzenia i fizjologicznej kondycji człowieka (dodatkowy parametr diagnostyczny) a z drugiej strony metoda ta umożliwi poznanie jednego z wielu teoretycznych aspektów procesów biologicznego starzenia organizmu człowieka ze względu na zmiany biofizyczne jakim podlegają badane w eksperymencie komórki. Tym samym badania w tym zakresie mogą w pewnym stopniu poszerzyć informacje z zakresu podstawowych badań biologicznych mechanizmów starzenia.

Dlaczego metoda EMN?

Celem niniejszego opracowania nie jest nakłanianie do odrzucenia dotychczasowych metod powszechnie stosowanych w badaniach antropologicznych, gdyż za pomocą tych metod (szczególnie tradycyjnej antropometrii) antropologia fizyczna radzi sobie doskonale w poznawaniu niekiedy skomplikowanych problemów biologii człowieka. Tym bardziej, że w Polsce istnieją ośrodki, które stosują w swoich badaniach metodę EMN. Znane od dawna biofizyczne zjawisko elektroforetycznej mobilności struktur komórkowych oraz całych komórek jest podstawą wielu dziedzin nauk biologicznych i może informować o biologii badanego organizmu. Umiejętne podejście do tej metody badawczej pozwala uzyskać informacje o procesach biologicznego starzenia się organizmu człowieka. Zainteresowani szczegółami zjawiska EMN znajdą obszernie informacje w literaturze przedmiotu. Wypada tutaj, krótko przypomnieć, że

materiałem badawczym jest tkanka z nabłonka jamy ustnej na podstawie, której ocenia się wartości wskaźnika EMN. Wartość wskaźnika EMN to stosunek komórek nabłonka jamy ustnej z jądrami drgającymi w polu elektrycznym do komórek nabłonka jamy ustnej, których jądra nie drgają w polu elektrycznym na 100 komórek obliczonych przez osobę wykonującą badanie. Zjawisko to charakterystyczne jest dla każdej tkanki zarówno ludzkiej, zwierzęcej jak i roślinnej i charakteryzuje się specyficznym przebiegiem w trakcie trwania ontogenezy człowieka. Wartości wskaźnika EMN rosną w progresywnej fazie ontogenezy, po czym po osiągnięciu pewnego punktu optimum (około 17 roku życia) zaczynają regularnie spadać. Wartości wskaźnika EMN korelują istotnie statystycznie z wiekiem. Przebieg wartości wskaźnika EMN przedstawia wykres 1.



Wykres 1. Kształtowanie się średnich wartości wskaźnika EMN w ontogenezie człowieka. Faza progresywna – badania Makałowskiej 1992. Faza stabilna i inwulcyjna – badania własne.

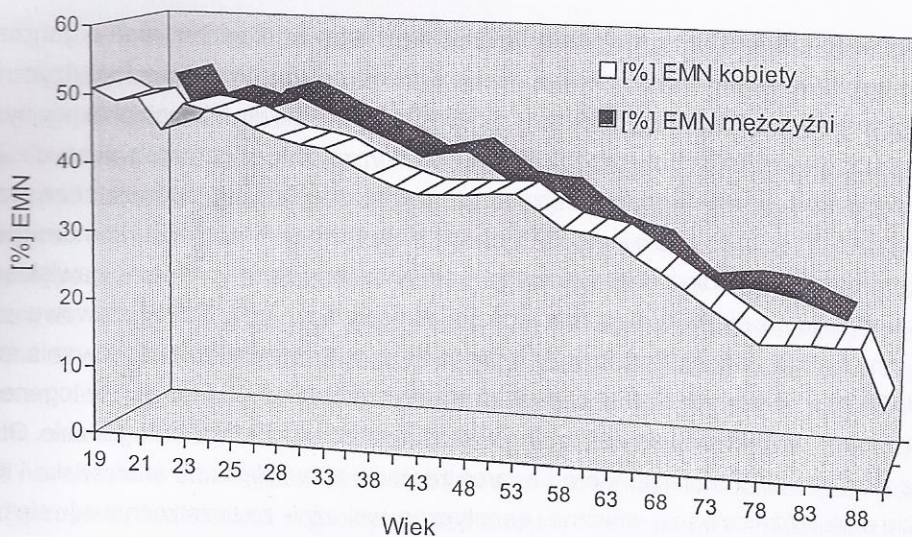
Dlaczego metoda EMN warta jest zainteresowania? Przytoczmy pewien przykład, jeśli weźmiemy pod uwagę trzech osobników o różnym deklarowanym przez nich wieku kalendarzowym powiedzmy 15, 50 i 75 lat, którzy charakteryzują się identycznymi podstawowymi parametrami morfologicznymi: masą 60 kg oraz wzrostem 170 cm każdy i założmy, że mamy tylko pomiary wspomnianych cech morfologicznych i nic poza tym, nie znamy wieku biologicznego tych osób a deklarowany fizjologiczny stan wszystkich trzech osób nie wzbudza zastrzeżeń, co wtedy możemy zrobić chcąc określić w wiarygodny sposób, jaki jest ich wiek biologiczny, w jakiej naprawdę są

biologicznej kondycji? Jaka jest ich „jakość biologiczna”? Oczywiście możemy przeprowadzić proste badania natury fizjologicznej np. testy wydolności fizycznej, czy inne pomiary parametrów fizjologicznych, możemy zrobić skomplikowane badania morfologii i biochemii krwi, ale możemy również zbadać te osoby przy użyciu metody EMN. Niewątpliwie takie badania powiedzą nam więcej o biologii tych osobników, czy o stopniu zaawansowania biologicznych procesów starzenia badanych osobników. W przypadku testów na wydolność lub pomiarów wysiłkowych parametrów fizjologicznych, możemy uzyskać już jakieś konkretne wiadomości, jednak może to być trudne ze względów technicznych, badania biochemiczne wiążą się z inwazyjnym wniknięciem do organizmu, pobraniem krwi i stosunkowo drogimi badaniami laboratoryjnymi, chociaż niewątpliwie wyniki tych badań powiedzieć nam mogą bardzo dużo, jeśli nie wszystko o biologicznej jakości badanych osobników. Natomiast, co w przypadku metody EMN? Otóż w prosty sposób sterylnymi nożykami hematologicznymi pobieramy nabłonek z jamy ustnej, metoda jest bezbolesna i nieinwazyjna, nie zmuszamy do wysiłku, nie podłączamy skomplikowanej aparatury, w przeciągu 10-15 minut uzyskujemy wynik. Przy odpowiednim układzie odniesienia (normie), dobrej znajomości technicznej strony procedury badawczej oraz odpowiednio skonstruowanej ankiecie uzyskujemy konkretny wynik o biologicznej jakości badanego organizmu. Wiedząc, że procesy biologiczne obserwowane na poziomie osobniczym i populacyjnym są odzwierciedleniem tego, co dzieje się na poziomie komórkowym i tkankowym uzyskujemy w taki sposób dodatkowe informacje o biologii starzenia badanych osobników. Ponieważ wiadomo, że wskaźnik EMN regularnie zmienia swoje wartości wraz z wiekiem badanych osobników, możemy wnioskować, że informuje on o procesach biologicznego starzenia się organizmu człowieka, dzięki takiemu podejściu do zastosowanej metody badawczej wyjaśniamy pewne bliżej nieokreślone mechanizmy biologicznego starzenia. Osoby bardziej zaawansowane w procesach biologicznego starzenia charakteryzują się niższymi wartościami wskaźnika EMN niż osoby młodsze w sensie biologicznym mając na uwadze stabilną i involucyjną fazę ontogenezy. W przypadku fazy progresywnej osobnik starszy biologicznie cechuje się wyższymi wartościami wskaźnika EMN w stosunku do osobników młodszych biologicznie, aż do uzyskania punktu przełomowego, optimum wartości wskaźnika EMN wyznaczonego dla badanej populacji, kiedy to, zależność ta ulega odwróceniu. Inaczej mówiąc metoda mikroelektroforezy wewnątrzkomórkowej wraz z wyznaczonym wskaźnikiem EMN jest pewnego rodzaju miernikiem procesów starzenia. Inny, poznawczy aspekt tej metody to fakt, że wskaźnik EMN jest czuły na działanie różnorodnych czynników środowiska zewnętrznego, co jest dodatkowo jego atutem, gdyż odzwierciedla poprzez swoją zmienność wpływ różnych czynników endo i egzogennych oraz czynni-

ków genetycznych, tym samym odzwierciedla aktualny fizjologiczny stan organizmu jako wynik wzajemnych interakcji wymienionych czynników. W antropologii fizycznej skupiamy się na praktycznym widzeniu zjawiska EMN i możliwościach aplikacyjnych tej metody w naukach ontogenetycznych, geriatrycznych czy gerontologicznych. Ze względu na specyfikę badań oraz zaplecze techniczne, jakim dysponuje zazwyczaj laboratorium antropologa nie możemy badać biofizycznych właściwości komórek pod kątem poznania podłoża biologicznych mechanizmów rządzących tym zjawiskiem, które wydają się niezwykle interesujące mając na uwadze badania podstawowe.

Inny ciekawy aspekt poznawczy, z jakim się spotykamy podczas stosowania metody EMN w badaniach biologii człowieka a w szczególności w badaniach ontogenezy człowieka, jest fakt regularności zmian wartości wskaźnika EMN w ontogenezie. Otóż bez względu na populację, którą badamy zarówno ze względu na środowisko i styl życia oraz zróżnicowanie etniczne i genetyczne, wskaźnik zawsze zachowuje się podobnie, jeżeli chodzi o tendencję jego zmian w przebiegu ontogenezy. Jedynie poziom realizacji tego wskaźnika w ontogenezie może być inny ze względu na specyfikę środowiska, w jakim badana populacja żyje. W każdej badanej populacji w fazie progresywnej, wskaźnik EMN rośnie a po uzyskaniu swojego optimum – dojrzałości wyznaczonej tym wskaźnikiem – następuje sukcesywny spadek jego wartości. Reasumując powyższe fakty można powiedzieć, że prezentowana metoda badawcza pozwala uchwycić punkt, w którym następuje najprawdopodobniej przyspieszenie procesów biologicznego starzenia. Obserwując wykres 1 widzimy wyraźną tendencją spadkową omawianego wskaźnika, czego nie obserwujemy tak wyraźnie w przypadku wysokości ciała a zdecydowanie nie zaobserwujemy w przypadku masy ciała, gdyż jak wiemy ten parametr ulega zazwyczaj wzrostowi wraz z wiekiem lub ma charakter zmian fluktuacyjnych w zależności od płci. Kierunek zmian wskaźnika EMN jest zgodny z kierunkiem zmian zachodzących w trakcie całej ontogenezy, wskaźnik EMN pozwala wykazać, że mimo, iż faza stabilna i inwolucyjna istnieją to i tak od uzyskania dojrzałości biologicznej „organizm zaczyna się starzeć” inaczej mówiąc wskaźnik EMN odzwierciedla tzw. „stopień zużycia biologicznego organizmu” w tej fazie ontogenezy. Ilustrują te zjawiska przeciętne wartości wskaźnika EMN w stabilnej i inwolucyjnej fazie ontogenezy przedstawione na wykresie 2.

Wskaźnik EMN wykazuje w odróżnieniu od cech morfologicznych stałą ukierunkowaną zmianę wraz z wiekiem wartości przeciętnych. Wskaźnik EMN jest taką właściwością organizmu, takim sposobem opisu procesów ontogenetycznych, który odzwierciedla „biologiczną jakość organizmu”, która ulega zmianie regularnie z wiekiem, zaś wyraźny kierunek zmian odzwierciedla „fazowość” ontogenezy wraz z jej biologiczną jakością. Wspomniana „fazowość” jest jak wiemy właściwością zdobytą na drodze.



Wykres 2. Kształtowanie się średnich wartości wskaźnika EMN w stabilnej i inwolucyjnej fazie ontogenezy – badania własne.

przemian filogenetycznych a uzyskane na tej drodze charakterystyczne fazy w rozwoju ontogenetycznych są specyficzną właściwością każdego gatunku biologicznego. Metoda EMN pozwala uchwycić tą fazowość w sposób jasny i oczywisty wskazując na biologiczny fakt rozpoczęcia procesów biologicznego starzenia. W przypadku, kiedy wypadkowa właściwości fizjologicznych, morfologicznych, biochemicznych organizmu wskazywałaby na stabilizację w rozwoju biologicznym, kształtowanie wskaźnika EMN w tej fazie ontogenezy wyraźnie pokazuje, że jest to pozorna, względna stabilizacja ze względu na wszystkie skomplikowane procesy biologiczne zachodzące w organizmie, również te bezpośrednio związane z pogorszeniem biologicznej jakości tego organizmu, czyli starzeniem.

Co właściwie bada wskaźnik EMN?

Pytanie, które bardzo często stawiane jest w aspekcie badań prowadzonych za pomocą metody mikroelektroforezy wewnątrzkomórkowej przy wyznaczaniu wartości wskaźnika EMN. Oczywiście możemy sobie postawić również inne pytanie, co bada, o czym mówi nam masa ciała, wysokość ciała czy inny parametr morfologiczny, fizjologiczny itp. Oczywiście zarówno wskaźnik EMN jak i cechy morfologiczne czy inne wskaźniki oceny stanu biologicznego organizmu mówią o tym samym, a mianowicie mówią o tym, co dzieje się z punktu widzenia biologii na poziomie tkanek czy komór-

rek. Obserwowane i mierzone cechy w każdym przypadku są produktem determinacji genetycznej, ekspresji określonych genów w określonym czasie oraz wszelkich metabolicznych interakcji ich produktów z czynnikami środowiska zewnętrznego. W każdym badanym momencie czasowym zachodzą określone procesy metaboliczne w komórkach naszego organizmu, których odbiciem są parametry wybranych do badań cech. Wydaje się, że w sposób bardziej bezpośredni opisywane zjawiska odzwierciedla metoda EMN, z prostej przyczyny, procedura badawcza skupia się na obserwacji komórek ludzkich, badając ich biofizyczne właściwości, które są bezpośrednim odzwierciedleniem ich biologii w organizmie.

Zjawisko EMN podobnie jak wiele innych zjawisk biologicznych nie ma jasno przypisanych mechanizmów je wyjaśniających, najogólniej mówiąc wiemy z całą pewnością, że zjawisko EMN odzwierciedla i to na pewno zmienność wewnątrz osobniczą, zmienność między osobniczą a w sensie populacyjnym odzwierciedla fazowość ontogenezy jako funkcję czasu zgodnie z procesami metabolicznymi i fizjologicznym stanem organizmu. Wiemy, iż istnieje proces biologicznego starzenia i jak wiemy wiele jest teorii i hipotez próbujących wyjaśnić te procesy w aspekcie biologicznym na poziomie komórkowym, osobniczym czy populacyjnym, ale nikt nie wie dokładnie, jaki jest jeden określony mechanizm tych zmian, gdyż sam proces jest wieloaspektowy i bardzo złożony, naukowcy z każdym wręcz dniem prześcigają się w publikowaniu teorii i przyczyn wyjaśniających ten proces, ale ciągle nie są pewni, że to właśnie oni mają rację, gdyż ciągle pojawiają się nowe odkrycia w tej dziedzinie. Otóż sam mechanizm zmian z wiekiem wskaźnika EMN nie jest dokładnie określony, ale można przypuszczać, że jest związany w pierwszym rzędzie ze zmianą stosunku anionów do kationów na aktywnej elektroforetycznie otoczce jądrowej (przypomnijmy, że badane komórki umieszcza się w polu elektrycznym a komórki naładowane ujemnie wędrują do dodatniej anody – anadoforeza). Wraz ze starzeniem się komórek dochodzi do zmniejszenia się liczby fosfolipidów wchodzących w skład błon biologicznych, co przyczynia się do zmniejszenia ich selektywnej przepuszczalności a to ma związek ze składem jonów w środowisku wszystkich organelli komórki. Może to być również wynikiem spadku w składzie ujemnie naładowanych białek oraz wyniku kondensacji chromatyny. Znany jest fakt, że kondensacja chromatyny wzrasta z wiekiem [Kanungo 1980], to może się wiązać ze spadkiem ogólnego ładunku elektrycznego struktur wchodzących w skład chromatyny. Ten fakt związku stopnia kondensacji chromatyny a elektrycznym ładunkiem jest znany od dawna. Redukcja ładunku elektrycznego jąder komórkowych indukuje spadek ich genetycznej aktywności. Spadek ładunku elektrycznego jąder jest natomiast najprawdopodobniej wynikiem silniejszego związania DNA z białkami, co niejako neutralizuje ładunek DNA. Wzmocnienie takich wiązań z wie-

kiem opisano u szczurów. Tak, więc zmniejszenie się wartości wskaźnika EMN z wiekiem może być związane ze wzmocnieniem „zakotwiczenia” jąder w komórce jako wynik usztywnienia się cytoszkieletu komórki. Stwierdzono w przypadku jądra [Maekawa 1967], że wzrost gęstości ładunku na jego otoczce odpowiada dokładnie okresowi replikacji DNA i w konsekwencji wzrostowi aktywnego metabolizmu związanego z syntezą RNA i białek. Ma to oczywiście swoje odbicie we właściwościach powierzchni błony cytoplazmatycznej komórki z uwagi na łączność błon cytoplazmatycznych komórki z błonami plazmatycznymi otaczającymi jądra. Badania [Kishimoto, Libermana 1965] wydają się potwierdzić, związek z intensywnymi procesami metabolicznymi (replikacja DNA) a właściwościami błon jądrowych i tym samym z elektroforetyczną ruchliwością. Obserwuje się wzrost elektroforetycznej ruchliwości komórek i jąder komórkowych hepatocytów w regenerujących się komórkach szczurzych czy też spadek elektroforetycznej ruchliwości hepatocytów wraz z trwaniem ontogenezy u starzejących się szczurów, co można bezpośrednio wiązać z procesami aktywności transkrypcyjnej DNA w jądrze [Kishimoto, Libermana 1965, Maekawa 1967].

Ze względu na tematykę zagadnienia, jakim jest „biologia starzenia człowieka” nie sposób tutaj opisać wszystkich aspektów badań związanych z zastosowaniami metody EMN. W tym opracowaniu zasygnalizowano i wskazano tylko na te aspekty badań i te mechanizmy wyjaśniające zjawisko EMN, które bezpośrednio dotyczą tematu „starzenie”. Oczywiście znane są prace i badanie naukowe, które wyjaśniają zjawisko EMN pod innym kątem, ujmują problematykę badawczą nie tylko w aspekcie badań ontogenetycznych, ale również, w aspekcie nauk medycznych, kultury fizycznej oraz badań biofizycznych i cytologicznych. W tych dziedzinach poprzez zastosowanie metody mikroelektroforezy wewnątrzkomórkowej badane są aspekty zmian elektroforetycznej ruchliwości jąder komórkowych pod wpływem określonego wysiłku fizycznego, zażywanie określonych specyfików czy promieniowania o określonej długości fali. Poniżej zamieszczono wybrane pozycje bibliograficzne, które przybliżają tematykę i zakres zastosowań metody EMN w badaniach naukowych.

Literatura

1. Cepel L. M., V. G. Shakhbazov, 1989a, Primenenie metoda mikroelektroforeza kletocnych jader dlja ocenki nespecificeskoj ustojivosti sortov kartofelja. [in:] Bioelektricskije svojstva kletocnogo jadra i sostojanie organizma. Kharkov, 53-54.
2. Cepel L. M., V. G. Shakhbazov, A. N. Nedoboj, 1989b, Vlijanie stepeni zrelosti i sroka chranenia semjan na elektroforeticskije svojstva kletocnych jader i jadysek prorostkov fasoli. [w:] Bioelektricskije svojstva kletocnogo jadra i sostojanie organizma. Kharkov, 54-55.

3. Cieřlik J., Kaczmarek M., Kaliszewska-Drozdowska M. D., 1994. Wiek fizjologiczny. [w:] Dziecko Poznańskie '90. Poznań.
4. Czapla Z., 1996, Poziom rozwoju cechy morfologicznej w ontogenezie a wskaźnik EMN. Program obrad i streszczenia wystąpień Ogólnopolskiej Konferencja Naukowa PTA „Człowiek wczoraj, dziś, jutro” 5-7 wrzesień, Agencja Wydawniczo-Handlowa AD Lublin.
5. Czapla Z., 1997, Ocena indywidualnej reakcji biologicznej osobnika na tle fazowości ontogenezy, wyznaczona metodami fizyko-chemicznymi. Program obrad i streszczenia wystąpień Ogólnopolska Konferencji Naukowej PTA „Skąd idziemy, kim jesteśmy, dokąd zmierzamy” 14-17 wrzesień, Wrocław-Polanica Zdrój.
6. Czapla Z., J. Cieřlik, 1998. The Electrophoretic Mobility of Cell Nuclei (EMN) index – relation to biological and physical properties of the cell. *Anthropological Review*, Nakom Publishing House. Poznań, 93-101.
7. Czapla Z., 1998a, Appraisal of changeability of the EMN index with regard to lifestyle on the basis of daily examination. [w:] *Methodological Aspects of Researches in the field of EMN (Electrophoretical Mobility of Nuclei)*, Palacky University Olomouc, 8-16.
8. Czapla Z., 1998b, Phenomenon of electrophoretic mobility of cell nuclei (EMN) as a consequence of biological and physical properties of the cell. [in:] *Methodological Aspects of Researches in the field of EMN (Electrophoretical Mobility of Nuclei)*, Palacky University Olomouc, 17-26.
9. Czapla Z., 1999, Fazowość rozwoju biologicznego człowieka oceniania wybranymi metodami fizyko-chemicznymi. Maszynopis pracy doktorskiej, Uniwersytet Adama Mickiewicza, Poznań.
10. Czapla Z., 2000, The phaseness of human biological development assessed with the use of selected physicochemical methods. *Variability and Evolution*, Vol. 8, 135-141.
11. Czapla Z., Cieřlik J., 2000, The EMN index as measure of the biological condition of the human organism. *Medical Review. Scripta Periodica*, Vol. III, Nr 3, 24-38.
12. Eisenberg S., S. Ben-or, F. Doljanski, 1962, Electro-kinetic properties of cell in growth processes I. The elctrophoretic behavior of liver cells during regeneration and post-natal growth. *Experimental Cell Reasearch*, 26, 451-461.
13. Grigorev D. J., E. V. Ilevskaja, 1989, Elektrokineticieskije svojstva kletocnych jader epitelia swiniej kak pokazatel biologiceskogo vozrasta. [w:] *Bioelektricieskije svojstva kletocnogo jadra i sostajanie organizma*. Charkov, 52.
14. Makalowska I., 1992, Przydatność i zakres stosowalności kryteriów oceny wieku biologicznego w badaniach ontogenetycznych na przykladzie metody EMN i metody analizy morfologicznej – maszynopis pracy doktorskiej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań.
15. Kanungo M. S., 1980, *Biochemistry of ageing*. Academic, London.
16. Kishimoto S., Liberman I., 1965, Nuclear mebranes of cultured mammalian cells in the period preceding DNA synthesis. *The Journal of Cell Biology*, 25, 103-107.
17. Korzun E. I, V. G. Shakhbazov, E. C. Mailian, T. V. Colupaeva, E. A. Kovalenko, 1985, Elektrokinjeticiskije svojstva kletocnych jader bukkalnovo epitelija celoveka v uslovijax gipoksji i pri boljezni dwi-rzenija. *Patofizjologija* Nr 6, 63-65.
18. Maekawa Akihiko, 1967, Electrophoretic mobility of isolated nuclei from rat ascites hepatoma cells and normal liver cells. *Nagoya Medicine Journal*, 13, 215-231.
19. Mayhew E., Nordling S., 1968, Electrophoretic mobility of mouse cells and homologous isolated nuclei. *Journal of Cell Physiology* 68, 78-80.
20. Riegerova J., M. Pridalova, K. Brazinova, 1998, Observing the electrokinetic qualities of the buccal epithelium cell Nuclei of sportsmen before and after physical strain. [w:] *Methodological Aspects of Researches in the field of EMN (Electrophoretical Mobility of Nuclei)*, Palacky University Olomouc, 49-54.

21. Shckorbatov Y. G., V. G. Shakhbazov, 1992, Bioelektricskije svojstva kletocnych jader. *Uspiechy Sowrjemjennoj Biologii*, t. 112, 499-511.
22. Shckorbatov Y. G., T. V. Colupaeva, V. G. Shakhbazov, P. A. Pustovoj 1995a, O swjazi elektricskikh svojstwa jader kletok celoweka c hekatorymi fizjologiceskimi parametrami. *Fizjologija celoweka*, t. 21, Nr 2, 93-97.
23. Shckorbatov Y. G., V. G. Shakhbazov, A. M. Bogoslavsky, A. O. Rudenko, 1995b, On age-related changes of cell membrane permeability in human buccal epithelium cells. *Mech. Ageing Dev.*, 83, 87-90.
24. Shckorbatov Y. G., V. G., Shakhbazov T. V. Colupaeva, A. O. Rudenko 1995c, Changements des proprietes electrocinetiques des noyaux et de la permeabilite des membranes des cellules buccales humaines avec l'age du donneur. *L'Eurobiologiste* 28, N 218, 25-253 – 28-256.
25. Shckorbatov Y. G., N. N. Grigoryeva, V. G., Shakhbazov, V. A. Grabina and A. M. Bogoslavsky, 1998, Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei. *Bioelectromagnetics* 19, Nr 7, 414-419.
26. Shckorbatov Y. G., 1999, He-Ne Laser light induced changes in the state of chromatin in human cells. *Naturwissenschaften* 86, 452-453.
27. Shakhbazov V. G., A. L. Nabokov, T. V. Colupaeva, 1985, Avtorskoe svidetelstvo Nr 1169614. MKI A 61 B 10/00. Sposob opredelenija biologiceskogo vozrasta celoweka, Nr 3355951. *Bjul.* Nr 28.
28. Shakhbazov V. G., T. V. Colupaeva, A. L. Nabokov, 1986a, Novyj metod opredelenija biologiceskogo vozrasta celoweka. *Laboratornoe Delo*, 7, 404-407.
29. Shakhbazov V. G., T. V. Colupaeva, A. L. Nabokov, A. A. Kononenko, 1986b, Avtorskoe svidetelstvo Nr 1235493. MKI A 61 B 5/16. Sposob opredelenija utomlenija celoweka, Nr 2954977. *Bjul.* Nr 21.
30. Shakhbazov V. G., H. H. Grigoreva, T. V. Colupaeva, 1996, Novyj cito-biofizycieskij pokazatel biologiceskovo vuzrosta i fizjologiceskovo sotajaniya organizma. *Fizjologija celoweka*, 22, 71-75.
31. Shakhbazov V. G., Y. G. Shckorbatov T. V. Colupaeva, 1997, On connection between the electrokinetic properties of cell nuclei and human biological age. *Mech. Ageing Dev.*, 99(3), 193-197.
32. Shakhbazov V. G., Colupaeva T. V., 1991, Determination of the state of human organism by assessment of the electrokinetic properties of cell nuclei. *Abstracts of the Conference Problems of Informatics*, Moscow, 86-87.
33. Pasecnik G. I., V. I. Titarenko, 1989, Bioelektricseskoje svojstva kletocnych jader epitela slizistoj krupnogo rogatogo skota. [w:] *Bioelektricskije svojstva kletocnogo jadra i sostajanie organizma*. Kharkov, 52-53.
34. Sosin I. K., V. G. Shakhbazov, L. A. Atramentova, Ja. L. Gurevic, T. B. Egonnikova i M. K. Filatov, 1986, Avtorskoe svidetelstvo Nr 1242124. MKI A 61 B 10/00. Sposob diagnostiki alkoholizma, Nr 3784114. *Bjul.* Nr 25.
35. Strashniuk V. Y., 1987, Ontogeneticskije izmienienija bioelektricskikh svojstv kletocnych jader w slinnych zelezch *Drosophila melanogaster*. *Molek. i funkcj. Mechanizmy ontogenezy. Vsesojuz. Cimi. Tez. Dokl. Kharkov*, 173-174.

Zbigniew Czapla

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, Instytut Antropologii UAM

Fredry 10, 61-701 Poznań

e-mail: czapla@main.amu.edu.pl