

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Kateřina Šimonová

3. ročník, Biologie

Lipidové složení biologických membrán jako determinant metabolického
výdeje a životních strategií

Lipid composition of biological membranes as a pace-maker of metabolic
rate and life-histories

Vedoucí práce: MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele, a že jsem řádně uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 24. 8. 2017

Podpis:

Poděkování:

Mé poděkování patří především mému školiteli MVDr. Oldřichu Tomáškovi, Ph.D. za pomoc, ochotu a vynaložený čas k poskytnutí velmi cenných rad, při tvorbě této práce. Dále děkuji své rodině za podporu během celého svého dosavadního studia.

ABSTRAKT

Složení biologických membrán má zásadní vliv na jejich vlastnosti. Vysoce polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), jako je například DHA, jsou velmi citlivé k poškození volnými radikály, oproti mononenasyceným (MUFA) a nasyceným (SFA) mastným kyselinám. Z předpokladu, že spolu s nenasyceností membrán se zvyšuje jak metabolismus organismu, tak citlivost k oxidačnímu poškození a následně rychlost stárnutí, vznikla pacemakerová teorie stárnutí (*the membrane pacemaker theory of aging*).

Tato hypotéza je složená ze dvou částí. První z nich se týká souvislosti mezi složením membrán a délkou života, kdy živočichové s více nenasycenými membránami (s vyšším peroxidačním indexem a počtem dvojných vazeb) by měli mít, díky vyšší citlivosti k oxidačnímu stresu, kratší délku života. Tato část našla v této rešerši podporu. Druhá část, týkající se složení membrán a rychlosti metabolismu, byla většinou studií vyvrácena. Membrány obratlovců s vyšší rychlostí metabolismu byly spíše méně nenasycené, oproti membránám živočichů s pomalejším metabolismem, nebo se nenašla signifikantní korelace, což je v rozporu s pacemakerovou hypotézou.

Klíčová slova: mastné kyseliny, oxidační stres, délka života, evoluce stárnutí, pace-of-life, reaktivní formy kyslíku, volné radikály, metabolismus

ABSTRACT

The composition of biological membranes has a major effect on their properties. Highly polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as DHA are highly susceptible to free radical damage compared to monounsaturated (MUFA) and saturated (SFA) fatty acids. The pacemaker theory of aging has emerged from the hypothesis that cellular metabolism, as well as sensitivity to oxidative damage and consequently the aging rate increase with membrane unsaturation.

This hypothesis is composed of two parts. The first concerns the relationship between membrane composition and life expectancy when animals with more unsaturated membranes (with a higher peroxidation index and a number of double bonds) should have a shorter lifespan due to higher sensitivity to oxidative stress. This section has been supported in this research. The second part, relating to the composition of the membranes and the rate of metabolism, was mostly refuted by the study. Vertebral membranes with a higher rate of metabolism were rather less unsaturated compared to the slower metabolic membranes of the animals, or no significant correlation was found, which is inconsistent with the pacemaker hypothesis.

Key words: fatty acids, oxidative stress, life span, evolution of aging, pace-of-life, reactive oxygen species, free radicals, metabolism

1. Obsah

1	Úvod	1
2	Životní strategie	2
3	Metabolický výdej	3
4	Stárnutí: mechanismy a evoluce	3
4.1	Evoluční teorie stárnutí.....	4
4.1.1	Teorie akumulace mutací (mutation accumulation theory)	4
4.1.2	Teorie antagonistické pleiotropie (antagonistic pleiotropy theory).....	4
4.1.3	Teorie těla na jedno použití (disposable soma theory).....	4
4.2	Mechanismy způsobující stárnutí.....	5
4.2.1	Telomery	6
4.2.2	Oxidační stres	6
5	Biologické membrány.....	10
5.1	Membránové lipidy	11
5.1.1	Fosfolipidy	11
5.1.2	Steroly	12
5.1.3	Mastné kyseliny v membránových lipidech	12
5.2	Membránové proteiny.....	13
5.2.1	Povrchové proteiny.....	13
5.2.2	Transmembránové proteiny.....	13
5.3	Membránové oligosacharidy.....	14
6	Vliv různých MK na fluiditu membrány, metabolismus a odolnost vůči oxidačnímu stresu	14
7	Pacemakerová teorie stárnutí	15
8	Empirická podpora pro pacemakerovou teorii stárnutí	16
9	Závěr.....	26
10	Literatura	27

1 Úvod

Složení biologických membrán významně ovlivňuje většinu metabolických dějů odehrávajících se v tělech živočichů a může být jedním z hlavních molekulárních faktorů způsobujících mezidruhové rozdíly v intenzitě metabolismu (Hulbert & Else, 1999). V této práci se především zabývám složením mastných kyselin v membránách, kde sleduji hlavně jejich nasycenost a nenasycenost, a následným vlivem na fluiditu membrán a rychlost metabolismu. Fluidita membrán je zásadní pro rychlost a efektivitu v nich probíhajících metabolických dějů. Složení membrán, zejména obsah dvojných vazeb v mastných kyselinách, je však také důležité pro náchylnost membrán k oxidačnímu stresu, tzn. k oxidačnímu poškození volnými kyslíkovými radikály a jinými vysoce reaktivními formami kyslíku (ROS; *reactive oxygen species*) (Hulbert and Else, 1999; Hulbert et al., 2007). Kumulace oxidačního poškození tkání, ke kterému dochází v důsledku oxidačního stresu, je tradičně považováno za jednu z hlavních příčin snižování funkčnosti tkání v průběhu stárnutí (Harman, 1956; Sohal and Weindruch, 1996). Rozdílné složení biologických membrán by tak mohlo být příčinou různé rychlosti stárnutí u různých druhů živočichů. Byla proto navržena hypotéza předpokládající, že na úrovni složení buněčných membrán existuje trade-off mezi fluiditou membrán, a tedy intenzitou a efektivitou metabolických dějů a náchylností k oxidačnímu poškození. Vzhledem k tomu, že růst a rozmnožování jsou energeticky vysoce náročné procesy, poskytuje tato hypotéza možné mechanistické vysvětlení existence známého trade-off mezi intenzitou růstu a reprodukce na straně jedné a rychlostí stárnutí a délkou života na straně druhé (*membrane pacemaker theory of aging, MPTA*; Hulbert, 2005). Jelikož trade-off mezi uvedenými life-history znaky je zásadním evolučním omezením, které usměrňuje evoluci životních strategií (*life-histories*), mohlo by složení biologických membrán představovat klíčový molekulárně-fyziologický faktor v tomto evolučním procesu.

Ve své práci se konkrétně zabývám tím, jak zastoupení různých typů mastných kyselin v biologických membránách, především jejich nasycenost a nenasycenost, souvisí s fluiditou membrán, intenzitou metabolismu, odolností k oxidačnímu stresu a různými life-history znaky, jako jsou např. velikost těla, rychlost růstu, intenzita reprodukce či délka života. Práce je zaměřena zejména na endotermní obratlovce, neboť u ektotermních je tělesná teplota ovlivňována teplotou prostředí. Při nízkých teplotách se snižuje fluidita membrán, což vytváří

dodatečný evoluční tlak na složení biologických membrán (Sinensky, 1974), který by mohl komplikovat interpretaci zjištěných faktů.

Ve své práci shrnuji jak mezidruhové, tak vnitrodruhové studie testující předpoklady a predikce zmíněné hypotézy. Cílem práce je na základě rešerše dostupných studií zhodnotit dosavadní empirické důkazy pro a proti této hypotéze.

2 Životní strategie

Rozvoj teorie životních strategií má již poměrně dlouhou historii. Prvním uceleným konceptem životních strategií byla **teorie r/K selekce** (MacArthur and Wilson, 1967; Pianka, 1970), která již byla inspirována dřívějšími pracemi. Tato teorie byla založená na trade-off mezi množstvím mláďat a jejich kvalitou.

Následně byl tento koncept rozšířen o další znaky majícími rozhodující vliv na fitness, jako jsou např. rychlost růstu, věk a tělesná velikost při pohlavní zralosti, mortalita a délka života. Tyto znaky se spolu s investicí do množství a kvality mláďat souhrnně nazývají jako **life-history znaky**. Jsou často ve vzájemných trade-off, která představují důležitá evoluční omezení, která evoluci životních strategií usměrňují. Hlavním omezením, které se evoluci životních strategií uplatňuje, je trade-off mezi intenzitou reprodukce na straně jedné a mírou přežívání dospělců a délkou života na straně druhé. Životní strategie každého druhu je pak výsledkem interakce mezi těmito trade-off a významem jednotlivých life-history znaků pro fitness v daných podmínkách (Stearns, 1989, 1992). Existence zmíněného trade-off mezi intenzitou reprodukce a přežíváním vylučuje existenci životních strategií, u kterých by byly oba tyto znaky maximalizovány a životní strategie se z tohoto důvodu vyvíjejí podél jediné hlavní osy od rychlých po pomalé tzv. **fast-slow continuum** (Stearns, 1983; Read and Harvey, 1989). Klíčovým faktorem při evoluci životních strategií je míra vnější mortality, která je dána podmínkami okolního prostředí, především mírou predace. S vyšší mírou vnější mortality se nevyplatí příliš investovat do opravných mechanismů těla, ale je výhodnější rychlejší reprodukce a větší počet mláďat. Životní strategie se v takových podmínkách vyvíjejí směrem k rychlému konci kontinua (*fast*). Menší míra predace naopak vede k evoluci pomalejších životních strategií (*slow*), charakterizovaných nižší intenzitou rozmnožování, vyšší délkou života a tedy vyšší investicí do fyziologických mechanismů zpomalujících stárnutí (Read and Harvey, 1989; Stearns, 1992; Ricklefs, 2000).

Teorie životních strategií byla postupem času dále rozšířena o fyziologické, imunologické a behaviorální znaky (Ricklefs and Wikelski, 2002; Réale et al., 2010). Toto rozšíření je založené na předpokladu, že pro podobné životní strategie by měly být výhodné podobné funkční adaptace. Pokud tomu tak opravdu je, měla by koevoluce těchto adaptací s životními strategiemi vést k výskytu podobných souborů fyziologických, imunitních a behaviorálních znaků u druhů s podobnými životními strategiemi. Tyto soubory znaků asociované s určitými životními strategiemi byly nazvány **pace-of-life syndromy** (POLS) (Ricklefs and Wikelski, 2002; Réale et al., 2010; Williams et al., 2010).

3 Metabolický výdej

Nejčastěji zmiňovaným znakem v souvislosti s POLS je metabolický výdej. Metabolický výdej je definován jako množství energie vydané organismem za jednotku času a zahrnuje všechny energetické reakce v těle nezbytné pro správné fungování organismu (Brown et al., 2004). U obratlovců je nejčastěji měřen jako bazální metabolický výdej, neboli bazální metabolismus (*basal metabolic rate*; BMR) (Hulbert and Else, 1999). Je to výdej energie, který je měřen za velmi specifických podmínek, jako je naprostý klidový stav dospělého organismu, který není v reprodukčním období, je nalačno a netráví tedy aktivně potravu a nachází se v teplotně neutrálním prostředí nevyvolávajícím nároky na termoregulaci (McNab, 1997). Celkový BMR organismu je velmi závislý na velikosti těla (hmotnosti), která vysvětluje kolem 95 % variability v jeho intenzitě (White and Kearney, 2013). Hmotnostně specifický metabolický výdej se používá jako jedna z hlavních charakteristik POLS, přičemž pomalé POLS jsou charakterizovány metabolismem s nízkou intenzitou (jinak též pomalým), zatímco rychlé POLS charakterizuje metabolismus intenzivní (rychlý) (Ricklefs and Wikelski, 2002).

4 Stárnutí: mechanismy a evoluce

Jedním z důležitých life-history znaků definujících životní strategie je délka života. S délkou života úzce souvisí rychlost stárnutí. Stárnutí (senescence) je komplexní, nevratný proces v organismu, charakterizovaný snižováním funkčnosti tkání a orgánů. Dochází při něm k rozvracení homeostázy organismu, ke zvyšování citlivosti organismu na vnitřní i vnější stresové vlivy a ke snižování schopnosti adekvátně na tyto vlivy reagovat, což vede ke snížení

fertility, k větší náchylnosti k chorobám a postupem času až ke smrti (Kirkwood, 1977, 2005). Stárnutí může mít množství příčin, které jsou stručně popsány v dalších podkapitolách.

4.1 Evoluční teorie stárnutí

4.1.1 Teorie akumulace mutací (*mutation accumulation theory*)

Na základě mnoha předchozích poznatků přišel britský biolog Peter Medawar (1952) s teorií, že v průběhu evoluce savců se akumulují náhodné mutace, které mají škodlivý efekt pouze ve vyšším věku. Čím vyšší vnější mortalitě je druh vystaven, tím méně jedinců se dožije vyššího věku a tím nižší je selekční tlak na odstraňování těchto mutací z genomu daného druhu (tzv. selekční stín). U druhů s nižší mírou vnější mortality jsou tyto mutace díky vyššímu selekčnímu tlaku více odstraňovány, což způsobuje pomalejší stárnutí a umožňuje vyšší délku dožití.

4.1.2 Teorie antagonistické pleiotropie (*antagonistic pleiotropy theory*)

Pleiotropie je jev, kdy jeden gen ovlivňuje více biologických systémů či funkcí. Teorie antagonistické pleiotropie je rozšířením předchozí teorie akumulace mutací. Podle George Williamse, který s touto teorií přišel, k akumulaci škodlivých mutací nestačí pouze jejich škodlivost ve vyšším věku. Aby nebyly škodlivé alely z genomu odstraněny, musí být naopak v raném období pro organismus důležité a výhodné (tzn. na věku závislá pleiotropie). Podle Williamse pouze tato výhodnost v raném věku brání jejich odstranění z genomu, zejména u druhů s vysokou mírou vnější mortality (Williams, 1957).

4.1.3 Teorie těla na jedno použití (*disposable soma theory*)

Tato teorie je založená na faktu, že tělo má určité množství energie a živin, které může v daný moment využívat. Díky tomu existuje trade-off mezi využitím energie pro údržbu a opravy těla, které brání stárnutí, a jeho využitím pro další funkce související s fitness organismu, jako jsou intenzita růstu a reprodukce (Kirkwood, 1977, 2005). Druhy s vyšší mírou vnější mortality mají nižší šanci dožít se vyššího věku, a tedy vyššího počtu rozmnožovacích cyklů, a je pro ně proto výhodnější investovat dostupné zdroje spíše do rozmnožování, než do mechanismů zpomalujících stárnutí (Stearns, 1992; Ricklefs, 2000).

4.2 Mechanismy způsobující stárnutí

První teorie, která se touto problematikou zabývala, inspirovaná prací Maxe Rubnera (1908), byla **rate-of-living theory** (Pearl, 1928), podle které je rychlost stárnutí a délka života determinována intenzitou metabolismu. Tato teorie vychází z pozorované pozitivní korelace mezi délkou života a velikostí těla a negativní korelace mezi velikostí těla a rychlostí metabolismu. Větší živočichové mají tedy dle této hypotézy delší život, díky nižší intenzitě metabolismu.

Dalším rozpracováním této teorie byla **free-radical theory of aging** (Harman, 1956), která poskytla možný mechanismus, jakým může intenzita metabolismu ovlivňovat rychlost stárnutí a délku života. Předpokládá, že stárnutí způsobují volné kyslíkové radikály a další reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*; ROS), které nevyhnutelně vznikají jako vedlejší produkt aerobního metabolismu (Harman, 1956, 1962). Hlavním aktérem v produkci ROS jsou mitochondrie, kde probíhá produkce energie prostřednictvím oxidativní fosforylace (Harman, 1972). ROS následně způsobují oxidační poškození důležitých biologických molekul, což je proces, který se nazývá oxidační stres. Toto poškození se v tělech organismů kumuluje s věkem a jeho kumulace je příčinou snížené funkčnosti tkání a jejich stárnutí (Harman, 1981). Maximální délka života je podle mnoha studií, negativně korelována s produkcí ROS v mitochondriích (Harman, 1972, 1981; Sohal et al., 1993). Podle této hypotézy je rychlost procesu stárnutí z velké části pod genetickou kontrolou a liší se mezi druhy i vnitrodruhově. Zároveň je ale závislá také na chemickém složení a reakcích v organismu a může být ovlivněna i vlivy prostředí (Harman, 1962, 1972, 1981).

Další extenzí této teorie je **mitochondrial free-radical theory of aging** (Miquel et al., 1980), která nejenže předpokládá význam mitochondrií jako primárního producenta ROS, ale zdůrazňuje též škodlivý vliv ROS právě na mitochondrie. Za hlavní příčinu stárnutí navrhuje tato teorie poškození mitochondriální DNA, která není tak dobře chráněná jako DNA jaderná (Fukunaga and Yeh, 1979). Poškození mitochondriální DNA se projevuje zhoršenou funkcí kódovaných proteinů dýchacího řetězce a tím zvýšenou produkcí ROS. Tato pozitivní zpětná vazba pak vede k rychlejší kumulaci oxidačního poškození, a tedy k dalšímu urychlování stárnutí (Miquel et al., 1980).

Alternativou k této teorii je **DNA damage theory of ageing** (Gensler and Bernstein, 1981), která jako možnou hlavní příčinu uvádí poškození jaderné DNA.

Propojení všech výše uvedených mechanismů s novými poznatky o biologické funkci ROS v jednu hypotézu se v současné době často nazývá **oxidative-stress theory of aging**. Tato hypotéza, podobně jako předchozí *free-radical theory of aging*, předpokládá, že funkce organismu se během stárnutí zhoršují, a to kvůli progresivnímu a nevratnému oxidačnímu poškození. Předpokládá však nejenom škodlivý účinek ROS, které způsobují oxidační poškození, ale zahrnuje i nově identifikovanou důležitost signálních funkcí ROS pro normální funkci buněk, antioxidační ochranu organismu a schopnost oprav poškozených buněk (Sohal and Weindruch, 1996; Hulbert et al., 2007).

4.2.1 Telomery

Telomery jsou koncové části chromozomů obsahující repetitivní sekvence nukleotidů. Chrání jaderné chromozomy před degradací či fúzí s ostatními chromozomy (Szostak and Blackburn, 1982). V rámci každé replikace chromozomů ovšem probíhá zkracování těchto telomer, které vyústí po určitém čase až v jejich úplné odstranění a následné nevratné poškození jaderné DNA (Olovnikov, 1973). Toto zkracování je také výrazně urychlováno oxidačním stresem (von Zglinicki, 2002) a vedlo k vytvoření další hypotézy příčiny stárnutí **telomere theory of aging** (Olovnikov, 1971, 1973). U některých buněk se ale může vyskytovat enzym telomeráza, který telomery po replikaci prodlužuje, a to může výrazně prodloužit životnost buňky (Greider and Blackburn, 1987, 1989).

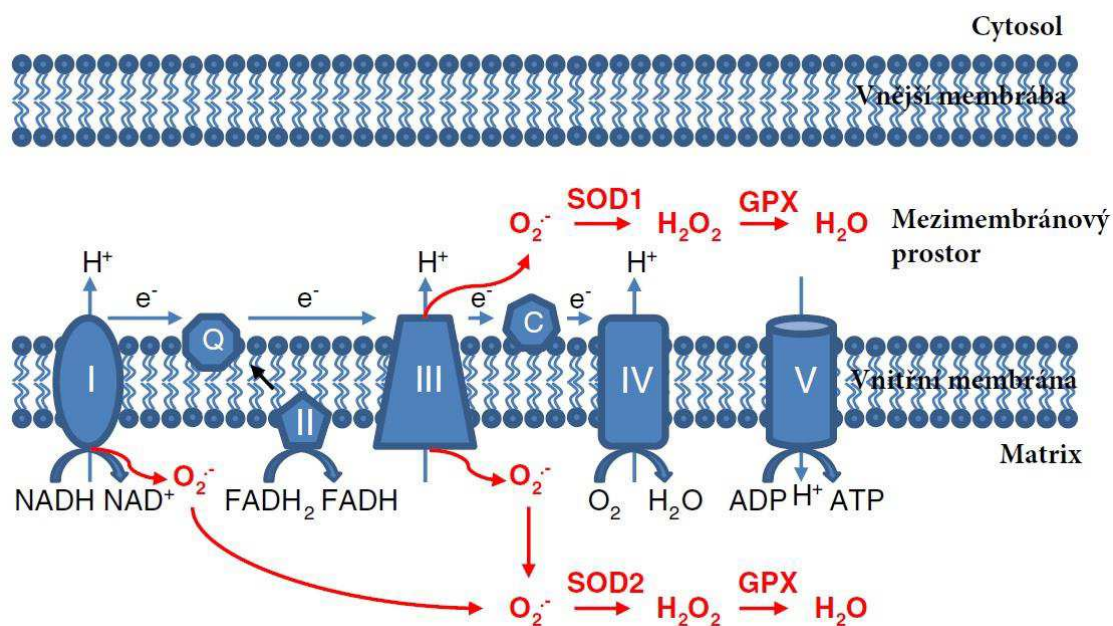
4.2.2 Oxidační stres

Pro správné fungování celého organismu je nezbytná rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty. Jakmile tato rovnováha chybí, nastává jev, kterému říkáme oxidační stres, který způsobuje **oxidační poškození** hlavně buněčných lipidů, proteinů a nukleových kyselin, což vede k následnému poškození buněk, tkání i orgánů (Finkel and Holbrook, 2000). Kumulace tohoto poškození s věkem je dle zmíněných teorií klíčovým faktorem způsobujícím zhoršování funkčnosti tkání a orgánů a tím stárnutí organismu. K určité míře oxidačního poškození ale dochází i u naprosto zdravých jedinců, neboť ROS vznikají v těle neustále a není možné, aby byly antioxidačními mechanismy organismu okamžitě odstraněny (Barja, 2004). Zásadním faktorem pro šíření oxidačního stresu v organismu je **peroxidace lipidů**, jež tvoří hlavní složku buněčných a sub-buněčných membrán. Peroxidace lipidů probíhá jako autooxidační řetězová reakce, kdy radikálová molekula reaguje s membránovou mastnou kyselinou za vzniku dalších

radikálových koncových produktů, které následně iniciují oxidaci dalších mastných kyselin. Tuto reakci lze zastavit pomocí antioxidantů nebo reakcí dvou volných radikálů, ze kterých vznikne neradikálová částice (Yin et al., 2011; Zielinski and Pratt, 2017).

4.2.2.1 Oxidanty

Reaktivní formy kyslíku (ROS), zahrnující jak volné kyslíkové radikály, tak neradikálové formy kyslíku, vznikají v organismu zejména jako vedlejší produkty energetického metabolismu, především v dýchacím řetězci na vnitřní membráně mitochondrií. **Dýchací řetězec** je závěrečným sledem reakcí v rámci buněčného dýchání a jeho výslednými produkty jsou energie ve formě ATP a voda. Funguje na základě získání energie z vysoce kontrolovaného přenosu elektronů z molekuly donoru, kterým je NADH či sukcinát na molekulu kyslíku, který je tímto redukován na vodu. Získaná energie je využita k přesunu vodíkových protonů z mitochondriální matrix do prostoru mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou a tím vytvoření elektrochemického gradientu. Proudění protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix je následně využíváno enzymem ATP-syntázou (nazývanou též jako komplex V dýchacího řetězce) k produkci energeticky bohaté zásobní molekuly ATP. Tato reakce je označována jako **oxidativní fosforylace** (Finkel and Holbrook, 2000; Duška and Trnka, 2007; Li et al., 2013). Zmíněný přenos elektronů využívaný k vytvoření elektrochemického gradientu vodíkových protonů probíhá vysoce kontrolovaným způsobem v několika krocích, pomocí enzymatických komplexů (komplex I – IV), uložených uvnitř vnitřní mitochondriální membrány (Finkel and Holbrook, 2000). Většina kyslíku vstupujícího do dýchacího řetězce je díky těmto elektronům a cytochrom oxidáze přeměněna na vodu. Určitá část elektronů však z elektronového transportního řetězce unikne předčasně a způsobí předčasnou a nekompletní oxidaci kyslíku na superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$; viz obr. 1). Ten je sám o sobě poměrně málo reaktivní, ale při kontaktu s membránovými lipidy může zahájit řetězovou reakci jejich peroxidace (Fridovich, 1978; Hulbert et al., 2007; Duška and Trnka, 2007). Dalšími ROS, které mohou v těle vznikat, jsou např. extrémně reaktivní hydroxylové radikály ($\bullet\text{OH}$), které vznikají při reakci metabolitů kyslíku s dvojmocným železem při Fentonově reakci (Winterbourn, 1995) nebo neradikálové oxidanty jako jsou např. peroxid vodíku (H_2O_2) či kyselina chlorná (HClO) produkovaná fagocytujícími imunitními buňkami za účelem likvidace patogenů (Costantini, 2010).



Obr. 1: **Produkce a odstraňování mitochondriálních ROS.** Elektrony získané redukcí NADH a FADH_2 jdou skrz elektronový transportní řetězec a nakonec v komplexu IV redukují O_2 na H_2O . Mitochondriální ROS vznikají únikem elektronů v komplexu I a III. Superoxidové radikály ($\bullet\text{O}_2$) z komplexu I jsou produkovány pouze do matrix, zatímco $\bullet\text{O}_2$ z komplexu III jdou do matrix i mezimembránového prostoru mitochondrií. Červeně je označena redukce $\bullet\text{O}_2$ na H_2O_2 s pomocí antioxidantu SOD (superoxid dismutáza) a na H_2O s pomocí GPX (glutathion peroxidáza) (převzato a upraveno z Li et al., 2013)

4.2.2.2 Antioxidační mechanismy

Antioxidační mechanismy jsou mechanismy bránící oxidaci molekulárních součástí organismu, a to buď vycytáváním ROS a jejich následnou neutralizací, regenerací oxidativně poškozených molekul, či předcházením samotnému oxidačnímu poškození formou vyšší odolnosti buněčných struktur k působení ROS (Hulbert et al., 2007).

Antioxidanty vycytávající a neutralizující ROS lze rozdělit na enzymatické a nízkomolekulární. Primární enzymatickou antioxidační ochranu buněk poskytuje superoxid dismutáza (SOD), která mění $\bullet\text{O}_2^-$ na O_2 a H_2O_2 (Sanz et al., 2006). V eukaryotních buňkách se setkáváme s tímto enzymem ve formě CuZnSOD a MnSOD (Fridovich, 1978). Dalšími antioxidanty jsou kataláza (CAT) a glutathion peroxidáza (GPX), které spolu následně odstraňují H_2O_2 . Snižující se aktivita těchto antioxidantů má za následek zvýšené oxidační poškození lipidů, proteinů a DNA (Fridovich, 1978; Barja, 2004; Li et al., 2013).

Dále hrají v organismu velkou antioxidační roli i neenzymatické molekuly. Mezi ně patří například nejdůležitější intracelulární nízkomolekulární antioxidant glutation (GSH) nebo kyselina askorbová (vitamín C) vyskytující se v hydrofilním prostředí. Dalšími jsou lipofilní tokoferol (vitamín E), či karotenoidy a velmi významný koenzym Q (ubichinon), který je nezbytnou součástí elektronového transportního řetězce a zároveň, v místě největší koncentrace ROS, chrání mitochondriální membrány před poškozením (Barja, 2004; Sanz et al., 2006; Hulbert et al., 2007).

Ačkoliv by se mohlo zdát, že bude rychlost stárnutí ovlivněna hladinou antioxidantů v těle, tzn., že bude pozitivní korelace mezi délkou života a obsahem antioxidantů, je tomu přesně naopak. U déle žijících obratlovců je hladina antioxidantů nižší, než u druhů krátce žijících (Barja, 2004). To naznačuje, že dlouhověké druhy dosahují nízké míry oxidačního stresu spíše nižší produkcí ROS nebo vyšší odolností k oxidačnímu poškození, než vyšší investicí do antioxidačních mechanismů (Barja et al., 1994; Barja, 2004).

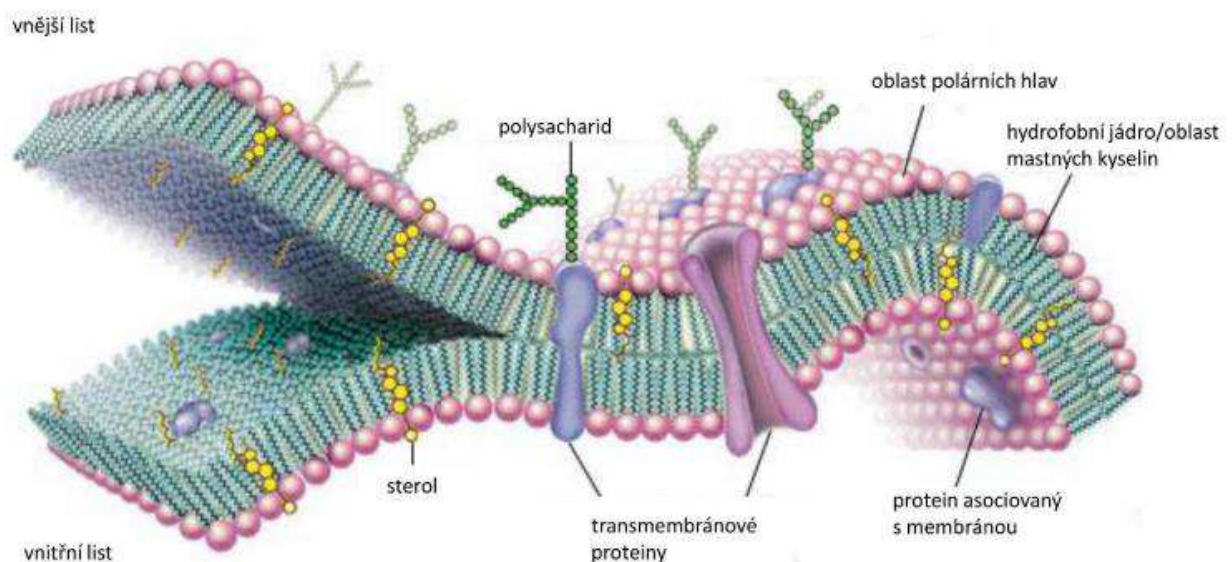
Pokud nejsou vychytávající a neutralizující mechanismy dostatečné a dojde k oxidačnímu poškození molekul, zbývají organismu ještě reparační mechanismy. Mezi ně patří například oprava poškozené DNA pomocí DNA polymerázy (Hulbert et al., 2007), či oprava poškozených proteinů prostřednictvím proteinů teplotního šoku (*heat shock proteins*) (Alberts et al., 2008).

Samotnému poškození molekul se tělo snaží i předcházet, a to pomocí chelátorů, které brání tvorbě hydroxylového radikálu tím, že odstraňují ionty kovů, které jsou pro jejich tvorbu nezbytné (Winterbourn, 1995). Látky takového preventivního charakteru jsou například transferin, plazmatický glykoprotein, vychytávající ionty železa (Winterbourn, 1995) nebo albumin, také plazmatický transportní protein, který váže měď a také peroxylové radikály (Halliwell and Gutteridge, 1986). Dalším preventivním mechanismem vzniku radikálů jsou odpřahovací „*uncoupling*“ proteiny, nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně a umožňující volný transport protonů přes tuto membránu jen za vzniku tepla (Duška and Trnka, 2007).

5 Biologické membrány

Buněčné membrány jsou důležitou složkou živých organismů. Polopropustně oddělují vnitřní a vnější prostředí, zprostředkovávají přenos signálů, molekul a energie, a tvoří bariéru proti škodlivým látkám vně buňky.

Singer and Nicolson navrhli, na základě desítek let výzkumů struktur proteinů a mastných kyselin, jak vypadá struktura biologických membrán a nazvali ji **model fluidní (tekuté) mozaiky** (*fluid mosaic model*). Buněčná membrána je podle tohoto modelu **lipidová dvojvrstva**, která si zachovává svoji celkovou strukturu, ale obsahuje v rámci jedné vrstvy volně pohyblivé lipidy, které zajišťují určitou nepropustnost samotné dvojvrstvy. Tento model je platný dodnes. Je pro něj důležitá existence hydrofilních a hydrofobních interakcí (Singer a Nicolson, 1972).



Obr. 2: **Struktura buněčné membrány** (převzato a upraveno z

<https://www.britannica.com/science/membrane-biology>)

Hlavní komponenty, které rozeznáváme v membránách, jsou **fosfolipidy, proteiny, oligosacharidy a cholesterol**. Proteiny a lipidy spolu vzájemně interagují a způsobují tak různé vlastnosti a funkce membrán (Singer a Nicolson 1972).

5.1 Membránové lipidy

Základem všech biologických membrán je lipidová dvojrstva tvořená různými druhy složených lipidů: 1) fosfolipidy, které lze dále rozdělit na glycerofosfolipidy a fosfosfingolipidy, 2) sfingolipidy (vč. již zmíněných fosfosfingolipidů, které patří zároveň mezi fosfolipidy) a 3) steroly. Zastoupení těchto lipidů se u obratlovců liší dle druhu a buněčného typu, ale převážně platí, že nejvyšší procentuální množství zastupují glycerofosfolipidy. Plazmatické membrány obsahují mnohem větší množství sfingolipidů a cholesterolu než ostatní vnitřní buněčné membrány a také mají výrazně odlišné lipidové složení vnitřní a vnější vrstvy membránové dvojrstvy. Stále ale platí, že obsahují převážně fosfolipidy (Meer, 1989; McMullen and McElhaney, 1996; McMullen et al., 2004).

Tabulka 1: Přibližné lipidové složení různých buněčných membrán (převzato a upraveno z Alberts et al., 2008).

Celkové procentuální množství lipidů				
lipid	plazmatická membrána jater	plazmatická membrány červených krvinek	myelin	mitochondrie (vnitřní a vnější membrána)
Cholesterol	17	23	22	3
Fosfatidyletanolamin	7	18	15	28
Fosfatidylserin	4	7	9	2
Fosfatidylcholin	24	17	10	44
Sfingomyelin	19	18	8	0
Glykolipidy	7	3	28	stopy
Ostatní	22	14	8	23

5.1.1 Fosfolipidy

Glycerofosfolipidy jsou amfifilní molekuly, což znamená, že obsahují hydrofobní i hydrofilní část. Obsahují glycerol a na něj navázané MK (hydrofobní „ocásek“) a zbytek kyseliny fosforečné (hydrofilní „hlavička“). To, jaké obsahuje membrána fosfolipidy, má vliv na funkci a schopnost adaptace membrány (Alberts et al., 2008).

Mezi nejdůležitější eukaryotní glycerofosfolipidy patří fosfatidylcholin (lecithin), který obsahuje navázaný cholin, jenž je důležitý pro přenosy nervových vzruchů a je nejhojnějším typem v buněčných membránách (Alberts et al., 2008; Pamplona, 2008). Další glycerofosfolipidy, hojně v savčích plazmatických membránách, jsou fosfatidylserin, který má důležitou signální roli při apoptóze buněk a nebo fosfatidyletanolamin (cefalin) (Alberts et

al., 2008). Dalším důležitým glycerofosfolipidem je kardiolipin, který je lokalizován výhradně na vnitřní membráně mitochondrií, kde zajišťuje nepropustnost membrány pro ionty a je také součástí dýchacího řetězce. Toto jeho umístění následně způsobuje, že se stává prvním cílem útoku ROS, ke kterému je velmi citlivý, protože obsahuje velké množství UFA (Hoch, 1992).

Dalšími velmi důležitými membránovými lipidy jsou sfingolipidy. Jsou to fosfolipidy obsahující sfingozin. Nejběžnějšími savčími sfingolipidy jsou sfingomyeliny, které se nacházejí převážně v plazmatických membránách nervových tkání obratlovců a plní různé signální funkce. Složení MK ve sfingomyelinech je tkáňově specifické a je ovlivněno i procesem stárnutí (Koval and Pagano, 1991; Harwood, 2007).

5.1.2 Steroly

Steroly neboli steroidní alkoholy jsou nezbytné pro správnou fyziologii eukaryotických buněk (Alberts et al., 2008). Sterolem obsaženým v živočišných buňkách je především cholesterol, který výrazně ovlivňuje fluiditu membrány (McMullen and McElhaney, 1996), a to tak, že s přibývajícím cholesterolem se membrána stává tužší a méně propustná pro malé molekuly (Yeagle, 1985). Cholesterol je u savců v nízké koncentraci nezbytný pro růst buněk a pro jejich správné fungování. Jeho obsah je v různých buněčných membránách odlišný. Plazmatické membrány ho obsahují mnohem více než ostatní membrány buněčných organel (Yeagle, 1985; Bretscher and Munro, 1993).

5.1.3 Mastné kyseliny v membránových lipidech

Hlavní složkou lipidů jsou mastné kyseliny (MK). Průměrná délka membránových MK u savců a ptáků je 18 uhlíkových atomů a lze je rozdělit na nasycené (*saturated fatty acids* – SFA) a nenasycené (*unsaturated fatty acids* – UFA) (Alberts et al., 2008; Pamplona, 2008).

Nasycené MK jsou hlavně živočišného původu a neobsahují dvojnou vazbu. Mezi nejběžnější SFA patří kyselina palmitová (C16) nebo stearová (C18) (Scrimgeour and Harwood, 2007; Alberts et al., 2008).

Nenasycené MK jsou hlavně rostlinného původu.

Mononenasycené (MUFA) obsahují jednu dvojnou vazbu. Označení omega (ω) určuje polohu dvojnou vazby v řetězci. Nejvýznamnější jsou kyselina olejová (18:1 ω 9), palmitolejová (16:1 ω 7) nebo eruková (22:1 ω 9) (Scrimgeour and Harwood, 2007; Alberts et al., 2008).

Polynenasycené (PUFA) obsahují více než jednu dvojnou vazbu a ω u nich označuje polohu poslední dvojně vazby. Patří mezi ně např. kyselina linolová (18:2 ω 6), arachidonová (20:4 ω 6), α -linolenová (18:3 ω 3), γ -linolenová (18:3 ω 6) nebo dokosaheptaenová (DHA) (22:6 ω 3) (Scrimgeour and Harwood, 2007; Alberts et al., 2008).

Poměr nasycenosti a nenasycenosti MK se v membránách obratlovců udržuje stále přibližně stejný (40 % SAFA a 60 % UFA) a stupeň nenasycenosti membrány je ovlivněn pouze odlišným zastoupením různých typů UFA (Pamplona, 2008).

Kromě membránových lipidů rozlišujeme v buňkách, přesněji v cytosolu živočišných buněk, ještě **triacylglyceroly**, což jsou klasické tuky. Ty se na složení membrán nepodílejí přímo, ale fungují jako zásobárny MK. Tyto molekuly jsou nejčastěji ukládány do tukové tkáně v podkoží a slouží jako zásobárna energie a tepelná izolace (Alberts et al., 2008)

5.2 Membránové proteiny

Proteiny asociované s membránami mohou být povrchové nebo zabudované (integrální) přímo uvnitř membrány (Singer and Nicolson, 1972). Zajišťují částečnou propustnost a signální a enzymatické funkce. Základní složkou proteinů jsou aminokyseliny, jejichž zastoupení a pořadí hraje hlavní roli při určování trojrozměrné struktury proteinů a určuje různé funkce a vlastnosti (Alberts et al., 2008).

5.2.1 Povrchové proteiny

Povrchové proteiny nejsou příliš silně asociovány s membránovými lipidy, lze je tedy snadno odštěpit pomocí solných roztoků. Jsou tvořeny převážně hydrofilními aminokyselinami a slouží hlavně jako receptory (Singer and Nicolson, 1972; Alberts et al., 2008).

5.2.2 Transmembránové proteiny

Transmembránové (integrální) proteiny asociují s membránovými lipidy velmi silně a je třeba velkých zásahů pro jejich odštěpení, např. užití detergentů. Jsou tvořeny především hydrofóbními aminokyselinami a plní v membráně velmi důležité funkce, jako např. kanály, pumpy a receptory (Alberts et al., 2008).

5.3 Membránové oligosacharidy

Oligosacharidy tvoří na vnějším povrchu plazmatické membrány plášť zvaný glykokalyx, který má ochranné funkce a funguje též pro buněčné rozpoznávání a jako receptorové místo pro hormony, toxiny a jiné ligandy. Je složen převážně z glykoproteinů, což jsou glykosylované proteiny, tzn. proteiny s navázaným sacharidem (Alberts et al., 2008).

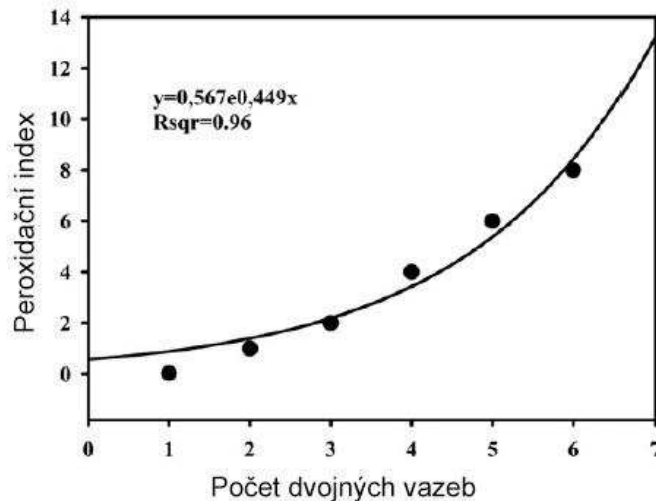
6 Vliv různých MK na fluiditu membrány, metabolismus a odolnost vůči oxidačnímu stresu

Různé druhy MK mají různý vliv na vlastnosti membránových lipidů a proteinů (Singer and Nicolson, 1972; Kris-Etherton and Yu, 1997). Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících vlastnosti MK je množství dvojných vazeb v jejich řetězci. Membrány se stávají **fluidnější** při vyšším zastoupení UFA s jednou dvojnou vazbou oproti nasyceným SAFA. Přidání MK s více dvojnými vazbami nemá již takový vliv na fluiditu membrány, jako přidání MUFA (Hulbert and Else, 1999; Pamplona, 2008). Fluidita je také velmi **ovlivněna teplotou**, konkrétně klesá při nižších teplotách. Při nižších teplotách se proto tvoří více nenasycených MK a při vyšší více nasycených, aby byla udržena optimální fluidita membrán. Tomuto jevu se říká homeoviskózní adaptace (*homeoviscous adaptation*) (Sinensky, 1974), která se ale týká hlavně ektotermních obratlovců (Hazel, 1989).

Dle Hulberta a Else (1999) je lipidové složení membrán důležité, neboť určuje aktivitu metabolických procesů probíhajících v membránách (udržování gradientů Na^+ , Ca^{2+} a H^+ , syntézu ATP a DNA), čímž ovlivňuje intenzitu metabolismu živočichů (*membrane pacemaker theory of metabolism*). Podlé této hypotézy mají živočichové s vyšší metabolickou aktivitou relativně více PUFA v membránách, zatímco membrány druhů s nižší metabolickou aktivitou obsahují více MUFA (Hulbert and Else, 1999).

Nenasycené MK obsahující dvojně vazby jsou, díky obsahu vysoce reaktivních atomů vodíku v těchto vazbách, velmi citlivé k oxidačnímu stresu (Ayala et al., 2014; Yin et al., 2011). Membrány se zvýšeným obsahem UFA, jsou tudíž citlivější k oxidačnímu stresu, a to především ty, které obsahují více než jednu dvojnou vazbu. Byla totiž zjištěna pozitivní korelace mezi počtem dvojných vazeb v membránových lipidech a citlivostí membrán k peroxidaci. To znamená, že pokud je nízký počet dvojných vazeb (*double bond index*; DBI), pak je nízký i

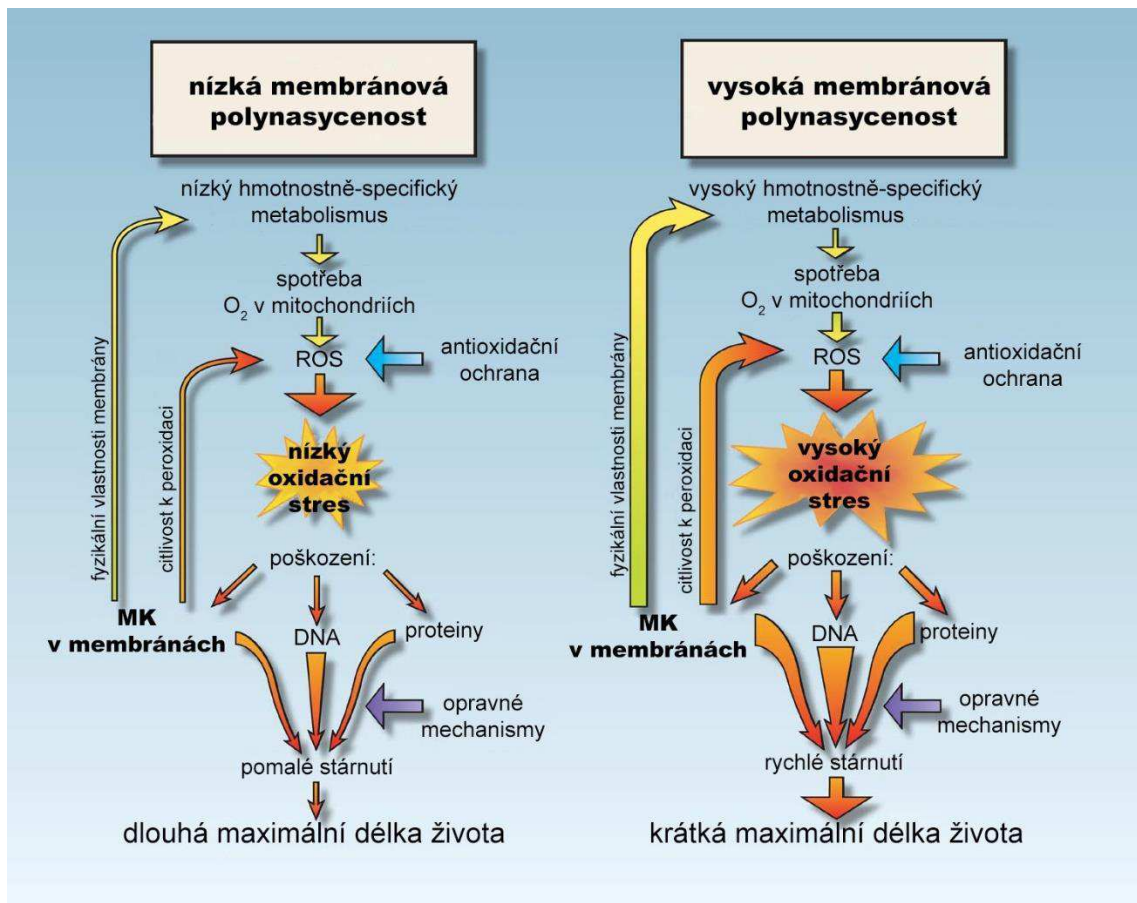
peroxidační index (PI; viz obr. 3) (Holman, 1954; Bielski et al., 1983). PI je číslo, které vyjadřuje citlivost membrán k poškození lipidovou peroxidací. Můžeme ho spočítat, pokud známe složení MK v membránových fosfolipidech (Hulbert et al., 2007). Pro neinvazivní měření lipidové peroxidace *in vivo* se dá také použít měření množství vydechovaného etanu, což je produkt peroxidace n-3 PUFA (Cohen, 1982; Frank Kneepkens et al., 1994; Hulbert et al., 2007).



Obr. 3: **Pozitivní korelace mezi počtem dvojných vazeb u nenasycených MK a citlivostí k peroxidaci** (Pamplona, 2008).

7 Pacemakerová teorie stárnutí

Nejnovější teorie mechanismu stárnutí je **pacemakerová teorie stárnutí** (*membrane pacemaker theory of aging*, MPTA; Hulbert, 2005), která vznikla syntézou hypotézy o vlivu složení membrán na intenzitu metabolismu (*membrane pacemaker theory of metabolism*; Hulbert and Else, 1999) a hypotézy předpokládající vyšší rezistenci membrán k oxidačnímu stresu u déle žijících živočichů (*homeoviscous-longevity adaptation hypothesis*; Pamplona et al., 2002). Podle pacemakerové teorie stárnutí je zastoupení různých typů MK v membránách živočichů hlavním faktorem zodpovědným za intenzitu metabolismu i rychlost stárnutí. Tato teorie předpokládá, že na úrovni složení membrán existuje trade-off mezi fluiditou (a tedy metabolickou aktivitou) a odolností k oxidačnímu stresu. Přináší tak vysvětlení negativní korelace mezi délkou života a intenzitou metabolismu na molekulární úrovni a dá se považovat za další rozšíření *rate-of-living theory* a hypotézy oxidačního stresu (Else and Hulbert, 2003; Hulbert, 2003, 2005; Hulbert et al., 2007).



Obr. 4: Schéma *the membrane pacemaker theory of aging*. Diagram ukazující rozdílné složení membrán jako rozhodující pro maximální délku života. Uvedeny jsou příklady membrán s nízkou polynenasyceností a s vysokou polynenasyceností. Šířka šipky ukazuje intenzitu konkrétního procesu. Modrá a fialová šipka označují inhibiční vlivy, ostatní značí stimulační vlivy (převzato a upraveno z Hulbert et al., 2007).

8 Empirická podpora pro pacemakerovou teorii stárnutí

Pravděpodobně jedny vůbec z prvních prací, zabývajících se vztahem mezi složením membrán na straně jedné a citlivostí k peroxidaci a dlouhověkostí na straně druhé, byly provedeny týmem kolem španělského vědce Reinalda Pamplony. V první studii byly zkoumány jaterní mitochondrie holubů (*Columba livia*, maximální délka života; *maximum life span*; MLS = 35 let) a laboratorních potkanů (*Rattus norvegicus*, MLS = 4 roky). Tato práce ukázala, že **dlouhověcí holubi mají nižší DBI v jaterních membránách než krátkověcí potkani**, a to díky obsahu menšího množství polynenasycených MK. Jejich jaterní membrány mají tedy nižší peroxidační index a jsou tedy více resistentní k peroxidaci (Pamplona et al., 1996). To bylo také potvrzeno dalšími studiemi založenými na srovnání těchto dvou druhů a jejich srdečních

mitochondrií (Pamplona et al., 1999a; Gutiérrez et al., 2000), jaterních mitochondrií (Gutiérrez et al., 2000), kosterní svaloviny (Portero-Otín et al., 2004) a také erytrocytů a ledvin (Montgomery et al., 2011).

Tabulka 2: Shrnutí mezidruhových studií porovnávajících peroxidační index membrán (PI) a délku života různých živočišných druhů.

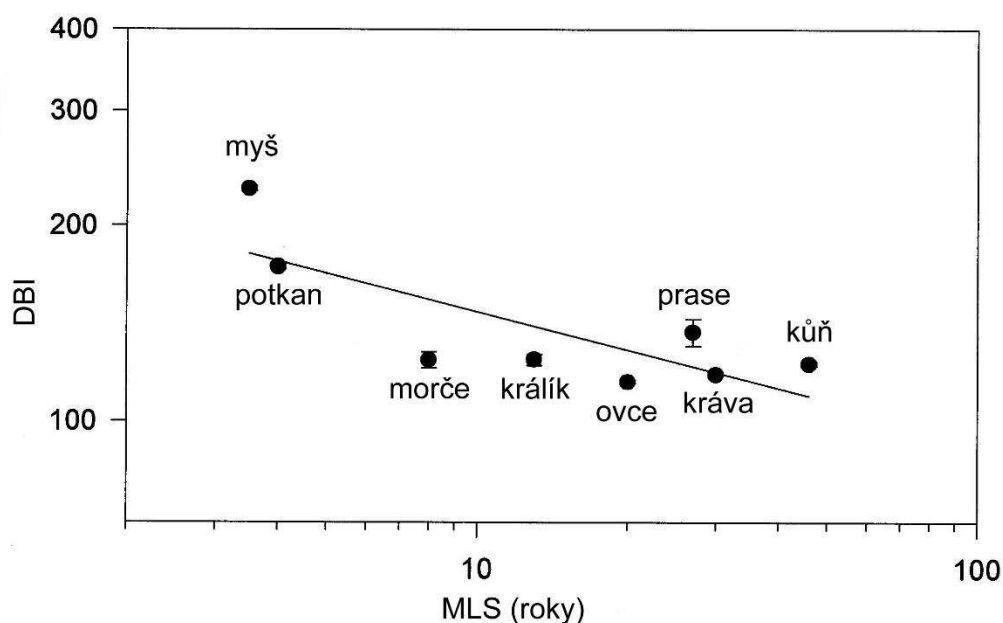
MEZIDRUHOVÉ STUDIE			
porovnávané druhy	tkáň	PI u déležijících druhů	zdroj
potkan, holub	jaterní mitochondrie	nižší	(Pamplona et al., 1996)
8 savčích druhů	jaterní mitochondrie	nižší	(Pamplona et al., 1998)
potkan, holub	srdeční mitochondrie	nižší	(Pamplona et al., 1999b)
myš, kanárek	srdce	nižší	(Pamplona et al., 1999a)
myš, andulka	srdce	nižší	(Pamplona et al., 1999a)
potkan, holub	jaterní mitochondrie	nižší	(Gutiérrez et al., 2000)
potkan, holub	srdeční mitochondrie	nižší	(Gutiérrez et al., 2000)
8 savčích druhů	srdce	nižší	(Pamplona et al., 2000a)
7 savčích druhů	játra	nižší	(Pamplona et al., 2000b)
8 savčích druhů	srdeční mitochondrie	nižší	(Herrero et al., 2001)
potkan, holub	kosterní svalovina	nižší	(Portero-Otín et al., 2004)
myš, andulka, kanárek	mozek	nižší	(Pamplona et al., 2005)
8 savčích druhů	srdce	nižší	(Ruiz et al., 2005)
myš, rypoš	mitochondrie kosterní svaloviny a jaterní mitochondrie	nižší	(Hulbert et al., 2006a)
12 savčích a 9 ptačích druhů	kosterní svalovina	nižší	(Hulbert et al., 2007)
10 savčích a 8 ptačích druhů	jaterní mitochondrie	nižší	(Hulbert et al., 2007)
42 savčích druhů	kosterní svalovina	nižší*	(Valencak and Ruf, 2007)
13 ptačích druhů	srdce	nižší	(Buttemer et al., 2008)
ježura, savci	játra, jaterní mitochondrie a kosterní svalovina	nižší	(Hulbert et al., 2008)
potkan, holub	erytrocyty, srdce, játra, ledviny, kosterní svalovina (celé tkáň i mitochondrie)	nižší	(Montgomery et al., 2011)
11 savčích druhů	plazma	nižší	(Jové et al., 2013)
107 druhů ptáků	játra	vyšší	(Galván et al., 2015)
myš, prase, člověk	kosterní svalovina, játra, mozek	nižší	(Cortie et al., 2015)
35 druhů savců (primáti – vč. člověka, hlodavci, letouni)	játra, svalovina, ledviny, srdce, mozková kůra a mozeček	nižší	(Bozek et al., 2017)

* po odfiltrování vlivu fylogeneze a hmotnosti těla nebyl nalezen signifikantní vztah mezi PI a délkou života

Tabulka 3: Shrnutí vnitrodruhových studií porovnávajících peroxidační index membrán (PI) a délku života různých živočišných druhů.

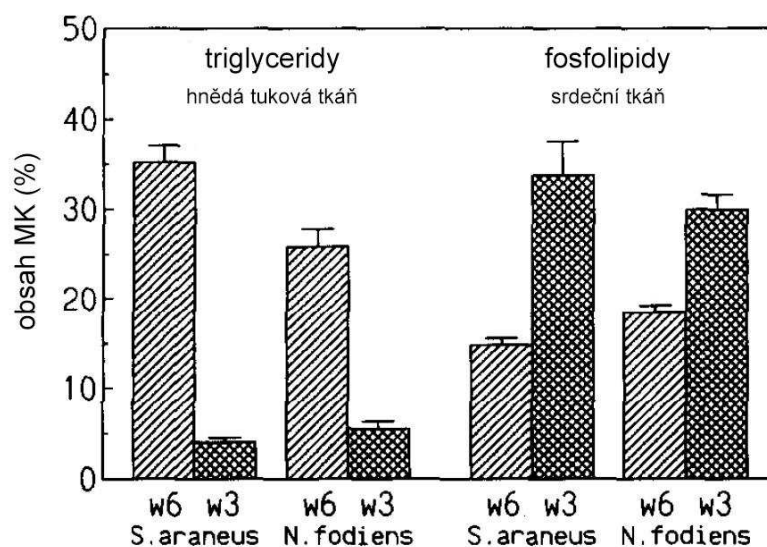
	VNITRODRUHOVÉ STUDIE		
porovnávané druhy	tkáně	PI u délejších druhů	zdroj
3 kmeny myší	kosterní svalovina a játra	nižší	(Hulbert et al., 2006b)
lidé (potomci velmi starých lidí a kontroly)	erytrocyty	nižší	(Puca et al., 2008)
lidé (potomci velmi starých lidí a kontroly)	plazma	nižší	(Gonzalez-Covarrubias et al., 2013)
myši – výjimečně dlouhožijící a dlouho žijící	mozek, slezina	nižší	(Arranz et al., 2013)
křeček, myš	mitochondrie kosterní svaloviny	nižší	(Shi et al., 2013)
dlouhožijící myši, wild type	kosterní svaloviny, srdce, játra, jaterní mitochondrie	nižší	(Valencak and Ruf, 2013)
lidé (dospělí, staří a extrémně staří lidé)	plazma	nižší	(Jové et al., 2017)

Negativní korelace mezi DBI a délkou života byla dále prokázána v jaterních mitochondriích (Pamplona et al., 1998) a srdeční tkáni (Pamplona et al., 2000a; Herrero et al., 2001; Ruiz et al., 2005) u 8 savčích druhů (MLS = 3,5 – 46 let).



Obr. 5: Vztah mezi DBI (celkovým počtem dvojných vazeb) a MLS (maximální délkou života) v srdečních fosfolipidech 8 savčích druhů (převzato a upraveno z Pamplona et al., 2000).

Ve studiích, zabývajících se MPTA, se ukazuje rozdíl ve složení membrán u živočichů s různou maximální délkou života (MLS). Některé studie vyvracející tuto hypotézu tvrdí, že korelace mezi znaky, jako je BMR, MLS a obsah MK v membránách, je způsobena tím, že všechny závisí na velikosti těla. Složení MK v membránách se u ptáků a savců systematicky mění s velikostí těla, jak bylo již prokázáno v některých studiích (Couture and Hulbert, 1995; Käckelä and Hyvärinen, 1995; Gutiérrez et al., 2009). Například tkáňové fosfolipidy (srdce, kosterní svaloviny, jater, ledvinné kůry a mozku) u 5 různě velkých savčích druhů měly u menší druhů více PUFA než u druhů větších, s výjimkou mozku, viz níže (Couture and Hulbert, 1995). Podobný výsledek ukázala studie fosfolipidů srdce a svaloviny rejseka vodního (*Neomys fodiens*) a rejseka obecného (*Sorex araneus*), kde měl větší rejsek vodní ve svých tkáních více ω 6 PUFA a méně ω 3 PUFA (liší se chemickou strukturou a polohou poslední dvojně vazby), než jeho menší příbuzný rejsek obecný (viz obr. 7; Käckelä and Hyvärinen, 1995).



Obr. 6: Poměry ω 3 a ω 6 PUFA, jako procento celkového obsahu MK v triglyceridech hnědé tukové tkáně (*brown fat*) a ve fosfolipidech srdce (*heart*) u *Sorex araneus* a *Neomys fodiens* (převzato z Käckelä and Hyvärinen, 1995).

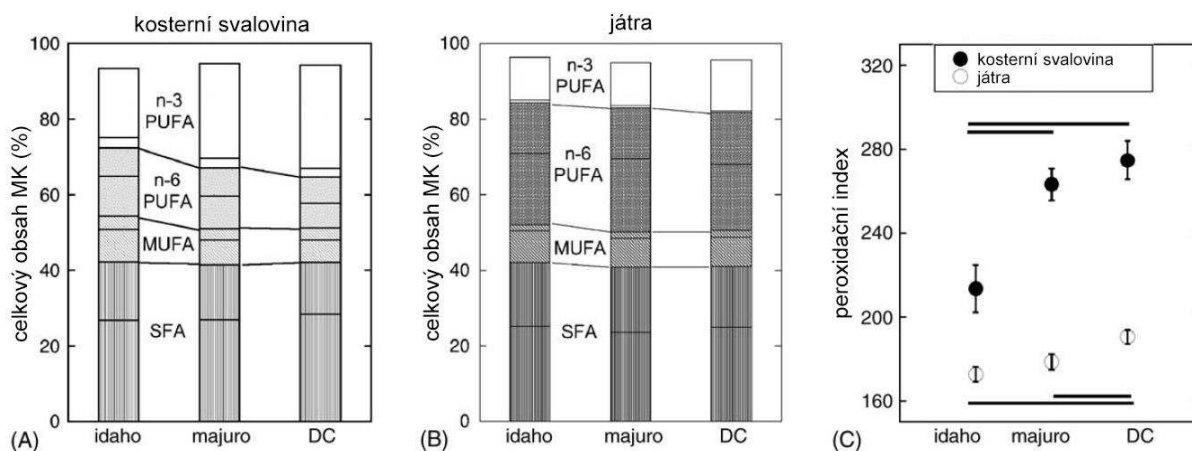
Dalšími příklady závislosti na velikosti těla mohou být studie fosfolipidů u ptáků. Porovnáním fosfolipidů kosterní svaloviny u 9 různě velkých druhů ptáků bylo zjištěno, že fosfolipidy větších druhů obsahovaly více MUFA, zatímco obsah PUFA byl relativně stejný u všech druhů. Signifikantní rozdíl vykazoval obsah ω 3 PUFA, který byl menší u větších druhů, kdežto obsah ω 6 PUFA naopak stoupal (Hulbert et al., 2002). V případě fosfolipidů jaterních mitochondrií u 8 různě velkých druhů ptáků bylo zjištěno, že tkáň větších druhů obsahovaly více MUFA a méně PUFA (Brand et al., 2003). Speakman (2005) proto upozorňuje na důležitost

odfiltrování vlivu tělesné hmotnosti a fylogenetické příbuznosti při hledání spojitostí mezi BMR, obsahem MK v membránách a MLS. Po statistickém odfiltrování těchto veličin (velikost těla, fylogeneze) ze získaných dat, nakonec nebyl nalezen signifikantní vztah mezi MLS a BMR a jen slabá korelace mezi MLS a ω 3 DHA, která by ovšem mohla být způsobená malým počtem zkoumaných druhů (8 druhů savců) a tím, že byla studie zaměřená pouze na DHA (Speakman, 2005). Studie fosfolipidů kosterní svaloviny 42 druhů savců ukázala (po odstranění efektu fylogeneze a tělesné váhy), že korelace mezi MLS a obsahem samotného DHA ani nenasyceností membrán (celkovým obsahem PUFA) není signifikantní. Signifikantní však byl negativní vztah mezi MLS a obsahem ω 3 PUFA (včetně DHA) a s tím spojený negativní vztah mezi ω 3 a ω 6 PUFA. Také se nenašla žádná souvislost mezi obsahem ω 3/ ω 6 PUFA, ani jiným obsahem MK v membránách a rychlostí metabolismu (BMR) (Valencak and Ruf, 2007).

Není zcela jasné, čím je způsoben negativní vztah mezi délkou života a omega 3 MK a následná negativní korelace mezi omega 3 a 6. Je možné, že je to způsobeno rozdílnou citlivostí k peroxidaci, jelikož nejběžnější omega 3 obsažená v tkáních je DHA, jež má ze všech omega MK nejvíce dvojných vazeb, a tudíž i nejvyšší citlivost k peroxidaci. Valencak a Ruf ale uvádí, že negativní vztah mezi poměrem omega 3/omega 6 a délkou života nekoreluje s citlivostí k peroxidaci, takže by měl být způsoben jinými faktory, například polohou první dvojně vazby v řetězci, či kvůli jiným rozdílům v chemické struktuře (Valencak and Ruf, 2007).

Aby se vyloučil hlavní vliv velikosti těla na složení membrán, a tím na délku života, byla provedena studie na stejně velkých druzích hlodavců – rypošovi lysém (*Heterocephalus gluber*) a myši domácí (*Mus musculus*), s velmi zásadně rozdílnou MLS (*Heterocephalus gluber* cca 28 let a *Mus musculus* 3-4 roky) (Hulbert et al., 2006a). Výsledkem bylo zjištění, že nenasycenost tkáňových fosfolipidů je u obou druhů stejná a odpovídá predikcím z tělesné hmotnosti. Co už těmto predikcím ale neodpovídá, je velmi odlišný obsah typů UFA v tkáních těchto dvou druhů. **Dlouhověcí rypoši mají ve svých tkáních velmi redukovaný obsah PUFA, především ω 3 PUFA jako je např. vysoce nenasycená DHA**, která je jednou z nejcitlivějších k peroxidaci, a naopak vyšší obsah MUFA. Z toho tedy jasně vyplývá, že dlouhověcí rypoši mají mnohem více odolné membrány k peroxidaci než stejně velké myši, i přesto, že jejich celkový obsah nenasycených MK je totožný (Holman, 1954; Hulbert et al., 2006a).

Stejný trend (méně ω 3 PUFA – DHA při delším MLS) potvrzuje i další vnitrodruhová studie na tkáních jater a kosterní svaloviny u *Mus musculus* z oblasti Idaho, Majuro, obě mají v zajetí prodlouženou MLS, a laboratorní myši (DC) (viz obr.8) (Hulbert et al., 2006b).

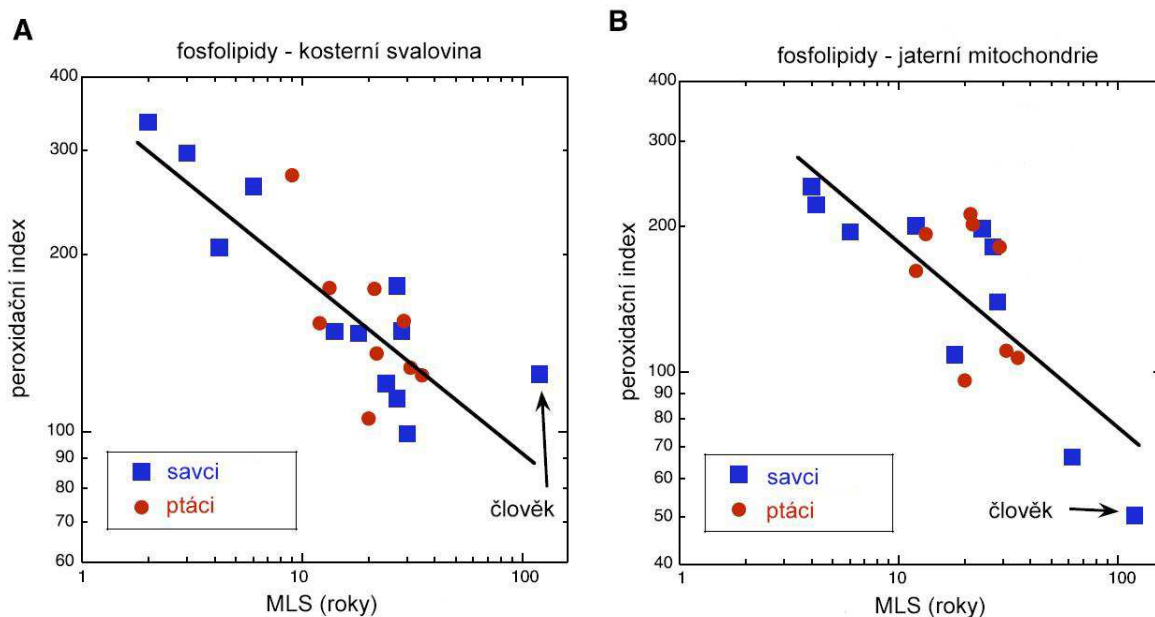


Obr. 7: Obsah MK ve fosfolipidech kosterní svaloviny (A), jater (B) u 3 linií *Mus musculus* (Idaho, Majuro a laboratorní DC), které se liší svou MLS. Ve sloupcích jsou vyneseny hodnoty následujících MK (od spodu): 16:0, 18:0, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7, 18:2 ω 6, 20:4 ω 6, 22:5 ω 3, 22:6 ω 3 - DHA. Obsah MK není v grafech 100%, protože je zobrazeno pouze 8 hlavních MK. MK jsou v grafech také rozděleny na SFA, MUFA, a PUFA – ω 3 a ω 6. Graf C ukazuje vypočítaný peroxidační index pro tyto 3 linie myši (převzato a upraveno z Hulbert et al., 2006b).

Další vnitrodruhová studie ukazuje vysoce rezistentní tkáně k poškození a nízký oxidační stres, tedy i snížený PI (snížený obsah DHA a kys. arachidonové) u tkání sleziny a mozku samic výjimečně dlouhověkých myši domácích kmene BALB/c (cca 128 týdnů) oproti starým jedincům tohoto kmene (cca 76 týdnů) (Arranz et al., 2013), což by mohla být ale jen změna spojená s věkem. Stejně tak je to i u mitochondrií kosterní svaloviny dlouhověkého křečka bělonohého (*Peromyscus leucopus*, MLS více než 8 let v zajetí) v porovnání s laboratorní myši kmene C57BL/6J (MLS cca 3,5 roku v laboratorních podmínkách) (Shi et al., 2013). Dalším příkladem je porovnání kosterní svaloviny, srdeční tkáně a jaterních mitochondrií dlouhověkých myši kmene *Ames dwarf* s divokým typem tohoto kmene, kde byl opět zjištěn stejný celkový obsah PUFA, avšak nižší obsah ω 3-PUFA (hlavně DHA) u dlouhověkých jedinců (Valencak and Ruf, 2013).

Kosterní svalovina a jaterní mitochondrie, savčích a ptačích druhů, ukazují opět negativní korelaci mezi PI a MLS (obr. 9) (Hulbert et al., 2007). Když zůstaneme u porovnávání savců a ptáků, nalezneme další příklad této korelace, a to u srdeční tkáně stejně velkých druhů,

myši (MLS = 3,5 roku), kanárka (*Serinus canaria*, MLS = 24 let) a andulky (*Melopsittacus undulatus*, MLS = 21 let), kdy i přes mnohem vyšší metabolismus, mají kanárek a andulka mnohem delší život, a to se zdá být především díky sníženému obsahu polynenasycené DHA v membránách a nízkému PI (Pamplona et al., 1999a). Později bylo také prokázáno menší oxidační poškození a méně komplexu I (zodpovědného za produkci ROS) v mozku u těchto druhů ptáků, než u myši, což s rychlostí stárnutí a délkou života také koreluje (Pamplona et al., 2005). Vyšší odolnost ptačích membrán dlouhověkých druhů byla prokázána i na jejich fibroblastech, které byly vystavovány různým buněčným stresorům (Harper et al., 2011).



Obr. 8: Vztah mezi maximální délkou života savců a ptáků a peroxidačním indexem fosfolipidů kosterní svaloviny (A) a fosfolipidů mitochondriálních jaterních buněk (B) (převzato a upraveno z Hulbert et al., 2007).

Studie provedené například i na lidských erythrocytech od potomků rodičů, žijících déle než 90 let, vykazovaly nižší PI, než od kontrolních vzorků s kratší délkou života jejich rodičů, a to hlavně díky sníženému obsahu PUFA (C18:2, C20:4) a naopak zvýšenému obsahu MUFA (C16:1, trans C18:1) (Puca et al., 2008). Plazmatické lipidy potomků lidí, žijících déle než 90 let, sice neukazovaly žádné signifikantní rozdíly u mužů, kdežto lipidy dcer dlouhověkých rodičů vykazovaly více MUFA než PUFA oproti dcerám rodičů s kratší délkou života, s čímž může být spojená vyšší resistance k oxidačnímu stresu (Gonzalez-Covarrubias et al., 2013). Jedna z nejnovějších studií, zkoumající lidské plazmatické lipidy, znovu přináší podobné výsledky jako předchozí, a to takové, že lidé s výjimečnou délkou života mají vyšší obsah rezistentních lipidů k lipidové peroxidaci (Jové et al., 2017). Postup, jakým se k těmto výsledkům došlo, byl ovšem

velmi odlišný od předchozích, kde porovnávali stejně staré potomky dlouhověkých lidí a v této studii porovnávali přímo různě staré jedince (dospělé, staré a extrémně staré) mezi sebou (Jové et al., 2017), což není podle mě vhodně navržený experiment, vzhledem k tomu, že se dle některých prací (Masella et al., 1995; Hulbert and Else, 2000; Andersson et al., 2000; Modi et al., 2008) mění složení membrán s věkem.

Při porovnání fosfolipidového složení tří typů tkání (mitochondrie jater, kosterní svaloviny a mozku) u tří druhů savců s různou MLS (myš domácí MLS = 4 roky, prase MLS = 27 let a člověk MLS = 122 let) se také jasně ukázala nižší koncentrace fosfolipidů citlivých k peroxidaci u lidí, kteří mají nejdelší MLS, a to s největším rozdílem mezi druhy u tkáně kosterní svaloviny. Dále se ukázalo, že myš a prase mají vyšší obsah PUFA u všech tkání, oproti člověku, který má více MUFA (hlavně C18:1) (Cortie et al., 2015)

Novější studie, ve které byla zkoumána jaterní tkáň 107 druhů ptáků různého věku a velikosti patřících do celkem 16 různých řádů, ovšem přinesla (při statistické kontrole na tělesnou hmotnost a fylogenezi) **nové a rozdílné výsledky oproti ostatním dosavadním studiím**. PI a obsah MUFA pozitivně korelovaly s MLS, zatímco obsah PUFA a ω 6 PUFA korelovaly negativně. Ukázala také, že další důležitou vlastností MK je i délka řetězce. Autoři na základě výsledků navrhli, že délka života pozitivně koreluje, kromě obsahu MUFA, také s délkou řetězce MK a to hlavně s dlouhými vysoce nenasycenými ω 6 MK (Galván et al., 2015). S touto novou hypotézou však nesouhlasí jedna starší studie na 11 savčích druzích včetně člověka s MLS v rozmezí od 3,5 do 120 let zkoumající plazmatické volné MK, kde naopak prokázali negativní korelaci mezi MLS a koncentrací plazmatických MK s dlouhým řetězcem i peroxidačním indexem (Jové et al., 2013). Zda tyto nesrovnalosti souvisí s rozdíly mezi ptáky a savci, či s rozdíly mezi lipidy v krevní plazmě a v tkáňových membránách, není jasné.

Další recentní práce zkoumala lipidovou koncentraci (jak energetických triacylglycerolů, tak i membránových fosfolipidů) v 6 tkáních (játra, svalovina, ledviny, srdce, mozková kůra a mozeček) u 35 druhů savců (primáti – vč. člověka, hlodavci a letouni) s různě dlouhou MLS. U dlouhověkých druhů byl zjištěn vyšší stupeň nasycenosti membrán, tím i nižší obsah dvojných vazeb a nižší PI, oproti krátkověkým, zřejmě jako ochrana před oxidačním stresem, ale také vyšší koncentrace nenasycených triacylglycerolů (energetických lipidů) u téměř všech tkání, což by mohlo v důsledku znamenat pomalejší produkci energie (oproti nasyceným), kvůli obsahu dvojných vazeb, které je náročnější odbourávat při využívání těchto lipidů, a tím pomalejší metabolismus (Bozek et al., 2017).

Velkou výjimkou v obsahu MK je **tkáň mozková**, která je velmi evolučně zakonzervovaná a nevykazuje takové mezidruhové rozdíly jako ostatní tkáně a obsahuje oproti nim mnohem více MUFA a méně PUFA a téměř konstantní obsah DHA u savců, nehlédě na jejich velikost (Couture and Hulbert, 1995; Hulbert et al., 2006a; Hulbert, 2007, 2008; Bozek et al., 2017). Tento konstantní obsah DHA v mozku savců by mohl být proto, že kdyby se spolu s rostoucí velikostí těla snižoval obsah DHA v mozku, mohlo by to zpomalit i chování druhu, a to by nebylo selektivně výhodné (Hulbert, 2008).

Oproti téměř stabilním výsledkům v korelacích mezi délkou života a složením membrán (DBI, PI) je v druhé části této teorie mnohem více nejasností. Můžeme najít spoustu studií, vyvracejících souvislost mezi složením membrán a rychlostí metabolismu, kterou predikuje MPTA. Studie na myších selektovaných na vyšší a nižší BMR, ukazuje vyšší DBI a také vyšší množství některých UFA, a to hlavně DHA, u jedinců s nižším BMR. To je tedy naprosto opačný výsledek než MPTA předpokládá (Brzęk et al., 2007). Wone et al. (2013) testoval játra a svalovinu končetin, také u myší, ale selektovaných na vysoký metabolismus a nedošel k žádným signifikantním rozdílům v procentuálním zastoupení MK nebo nenasyceností membrán. Stawski (2015) také vyvrací MPTA, když se mu u norníků (*Myodes glareolus*), selektovaných na vyšší BMR a kontrol, nepodařilo zjistit žádné signifikantní vztahy mezi složením membrán (konkrétními MK) a rychlostí metabolismu. Hlavní rozdíly, které ovšem vyšly najevo, se týkaly změn délky řetěze MK, které následně mohou ovlivnit aktivitu transmembránových proteinů (Stawski et al., 2015). Bylo pozorováno, že nejvyšší aktivitu mají transmembránové proteiny v membránách se středně dlouhými řetězci MK (C18) a kratší, či delší řetězce způsobují snížení jejich aktivity. Tyto proteiny mohou tedy různě ovlivňovat aktivitu orgánů (Lee, 2004, 2011; Gustavsson et al., 2011).

A protože rychlost metabolismu pozitivně koreluje s velikostí vnitřních orgánů (Holliday et al., 1967; Wiersma et al., 2012), což u jedné studie zvýšení metabolismu také způsobilo (Brzęk et al., 2007), je možné, že zvýšení metabolismu u těchto studií, vedlo pouze ke zvětšení vnitřních orgánů spíše, než ke změně membránového složení (Brzęk et al., 2007).

Vnitrodruhové studie tedy nevykazují žádné jasné korelace, a pokud se podíváme na studie mezidruhové, opět narážíme na pochybnosti. Kanárek a andulka měli, i přes mnohem vyšší metabolismus, méně nenasycené membrány než myš (Pamplona et al., 1999a), stejně jako měl holub méně nenasycené membrány oproti potkanovi (Pamplona et al., 1996) i přes

vyšší metabolismus, který mají ptáci všeobecně oproti stejně velkým savcům (Hickey et al., 2012).

Problematika vlivu složení membrán na rychlost metabolismu je složitější, než se na první pohled může zdát. Studie, porovnávající obsah různých MK v membránách a rychlost metabolismu endotermních obratlovců, nepotvrzují pacemakerovou teorii stárnutí. Je možné, že je to proto, že se tento předpoklad vyvíjel z teorie vzniklé na porovnávání endotermních a ektotermních obratlovců (Hulbert and Else, 1999), což může být rozdílné oproti porovnávání savců samotných, neboť metabolismus ektotermů je velmi ovlivňován okolní teplotou a to by mohlo vést k trochu odlišným mechanismům na buněčné úrovni. Tato část teorie o vlivu složení membrán na metabolismus, by tedy mohla být platná pouze při porovnávání ektotermů a endo-termů, nikoliv však při porovnávání endo-termů mezi sebou. Studií na toto téma jsem ale našla jen málo, proto by bylo do budoucna určitě vhodné provést některé další, které by se věnovali porovnávání samotných endo-termů, aby vznikl alespoň podobně široký vhled na tuto problematiku, jako na problematiku složení membrán a délku života.

9 Závěr

Touto rešerší jsem došla k závěru, že složení membrán je zásadní pro délku života živočichů, a spolu s tím může být jednou z hlavních determinant životních strategií. Ve většině studií (jak mezidruhových, tak i vnitrodruhových) se ukázal signifikantní vztah mezi délkou života a obsahem různých MK v membránách tkání i mitochondrií. Přidání MK s jednou dvojnou vazbou, způsobí zvýšení fluidity, ale přidání více dvojných vazeb již nemá takový účinek na fluiditu, kdežto velmi zásadně ovlivňuje citlivost k peroxidačnímu poškození. Důležitý byl především obsah DHA a jiných vysoce polynenasycených $\omega 3$ MK, velmi citlivých k peroxidaci, které byly nacházeny ve zvýšené míře u živočichů s kratší délkou života, oproti dlouhověkým druhům. Také se v jedné studii jaterní tkáně nově přišlo na pozitivní vztah mezi délkou života a délkou řetězce MK, a to hlavně $\omega 6$ MK, zatímco studie krevní plazmy ukázala opak, a to negativní korelaci mezi koncentrací plazmatických MK s dlouhým řetězcem a délkou života. Velikost těla, která ovlivňuje téměř každý proces, který se v tělech živočichů odehrává, musela být pro získání signifikantních výsledků z dat statisticky odfiltrovávána, stejně jako vliv fylogenetické příbuznosti druhů. I po odfiltrování těchto vlivů zůstaly výsledky u většiny studií signifikantní.

Práce se zabývala hlavně ptačími a savčími druhy. Ptáci mají oproti stejně velkým savcům vyšší metabolismus i MLS, a zároveň mnohem méně nenasycené membrány, jež jsou odolnější k oxidačnímu stresu. Tato kombinace intenzivnějšího metabolismu na straně jedné a delšího života a méně nenasycených membrán na straně druhé je v rozporu s pacemakerovou teorií. Stejně tak tuto teorii nepotvrdily ani vnitrodruhové studie savců, které ukázaly buď vyšší polynenasycenost u jedinců s nižším metabolickým výdejem nebo žádné signifikantní rozdíly.

Jako vhodný model pro studium složení membrán se mi zdají fibroblasty a krevní vzorky, které vykazují stejné korelace jako ostatní tkáně, ale nevyžadují usmrcení živočichů.

Z dosavadních studií je zřejmé, že délka života jasně závisí na složení membrán. Stále ale není úplně jasné, jestli je délka života determinována stejnými buněčnými a molekulárními mechanismy u všech druhů nebo jestli jsou tyto změny individuální a druhově odlišné.

10 Literatura

Sekundární zdroje označeny: *

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science). *

Andersson, A., Sjödin, A., Hedman, A., Olsson, R., and Vessby, B. (2000). Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipids in trained and untrained young men. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *279*, E744–E751.

Arranz, L., Naudí, A., De la Fuente, M., and Pamplona, R. (2013). Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age* *35*, 621–635.

Ayala, A., Munoz, M.F., and Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2014*, e360438.

Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production–DNA damage mechanism? *Biol. Rev.* *79*, 235–251.

Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., López-Torres, M., and Pèrez-Campo, R. (1994). A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. Mol. Biol.* *108*, 501–512.

Bielski, B.H., Arudi, R.L., and Sutherland, M.W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* *258*, 4759–4761.

Bozek, K., Khrameeva, E.E., Reznick, J., Omerbašić, D., Bennett, N.C., Lewin, G.R., Azpurua, J., Gorbunova, V., Seluanov, A., Regnard, P., et al. (2017). Lipidome determinants of maximal lifespan in mammals. *Sci. Rep.* *7*, 5.

Brand, M.D., Turner, N., Ocloo, A., Else, P.L., and Hulbert, A.J. (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* *376*, 741–748.

Bretscher, M.S., and Munro, S. (1993). Cholesterol and the golgi apparatus. *Science* *261*, 1280–1282.

Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., and West, G.B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* *85*, 1771–1789.

Brzęk, P., Bielawska, K., Książek, A., and Konarzewski, M. (2007). Anatomic and molecular correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiol. Biochem. Zool. Ecol. Evol. Approaches* *80*, 491–499.

Buttemer, W.A., Battam, H., and Hulbert, A.J. (2008). Fowl play and the price of petrel: long-living *Procellariiformes* have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living *Galliformes*. *Biol. Lett.* *4*, 351–354.

- Cohen, G. (1982). Production of ethane and pentane during lipid peroxidation: biphasic effect of oxygen. In *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, K. Yagi, ed. (Academic Press), pp. 199–211.
- Cortie, C.H., Hulbert, A.J., Hancock, S.E., Mitchell, T.W., McAndrew, D., and Else, P.L. (2015). Of mice, pigs and humans: An analysis of mitochondrial phospholipids from mammals with very different maximal lifespans. *Exp. Gerontol.* *70*, 135–143.
- Costantini, D. (2010). Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment.
- Couture, P., and Hulbert, A.J. (1995). Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J. Membr. Biol.* *148*, 27–39.
- Duška, F., and Trnka, J. (2007). *Biochemie v souvislostech, 1. díl - základy energetického metabolismu* (Praha: Karolinum).*
- Else, P.L., and Hulbert, A.J. (2003). Membranes as metabolic pacemakers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *30*, 559–564.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* *408*, 239–247.
- Frank Kneepkens, C.M., Lepage, G., and Roy, C.C. (1994). The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* *17*, 127–160.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* *201*, 875–880.*
- Fukunag, M., and Yielding, K.L. (1979). Fate during cell growth of yeast mitochondrial and nuclear DNA after photolytic attachment of the monoazide analog of ethidium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *90*, 582–586.
- Galván, I., Naudí, A., Erritzøe, J., Møller, A.P., Barja, G., and Pamplona, R. (2015). Long lifespans have evolved with long and monounsaturated fatty acids in birds. *Evolution* *69*, 2776–2784.
- Gensler, H.L., and Bernstein, H. (1981). DNA damage as the primary cause of aging. *Q. Rev. Biol.* *56*, 279–303.
- Gonzalez-Covarrubias, V., Beekman, M., Uh, H.-W., Dane, A., Troost, J., Paliukhovich, I., van der Kloet, F.M., Houwing-Duistermaat, J., Vreeken, R.J., Hankemeier, T., et al. (2013). Lipidomics of familial longevity. *Aging Cell* *12*, 426–434.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* *51*, 887–898.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* *337*, 331–337.

- Gustavsson, M., Traaseth, N.J., and Veglia, G. (2011). Activating and deactivating roles of lipid bilayers on the Ca²⁺-ATPase/phospholamban complex. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 10367–10374.
- Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Arcemis, C.J., and Catalá, A. (2000). Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 73–79.
- Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., and Catalá, A. (2009). High resistance to lipid peroxidation of bird heart mitochondria and microsomes: Effects of mass and maximum lifespan. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 154, 409–416.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501–514.
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Harman, D. (1962). Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life. *Radiat. Res.* 16, 753–763.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 145–147.
- Harman, D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7124–7128.
- Harper, J.M., Wang, M., Galecki, A.T., Ro, J., Williams, J.B., and Miller, R.A. (2011). Fibroblasts from long-lived bird species are resistant to multiple forms of stress. *J. Exp. Biol.* 214, 1902–1910.
- Harwood, J.L. (2007). Lipid metabolism. In *The Lipid Handbook*, (London: Taylor & Francis Group), pp. 637–702.*
- Hazel, J.R. (1989). Cold adaptation in ectotherms: regulation of membrane function and cellular metabolism. In *Animal Adaptation to Cold*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 1–50.*
- Herrero, A., Portero-Otín, M., Josep Bellmunt, M., Pamplona, R., and Barja, G. (2001). Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 122, 427–443.
- Hickey, A.J.R., Jüllig, M., Aitken, J., Loomes, K., Hauber, M.E., and Phillips, A.R.J. (2012). Birds and longevity: Does flight driven aerobicity provide an oxidative sink? *Ageing Res. Rev.* 11, 242–253.
- Hoch, F.L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 1113, 71–133.
- Holliday, M.A., Potter, D., Jarrah, A., and Bearg, S. (1967). The relation of metabolic rate to body weight and organ size. *Pediatr. Res.* 1, 185–195.

- Holman, R.T. (1954). Autoxidation of fats and related substances. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 2, 51–98.
- Hulbert, A.J. (2003). Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206, 2303–2311.
- Hulbert, A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234, 277–288.
- Hulbert, A.J. (2007). Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids* 42, 811–819.
- Hulbert, A.J. (2008). The links between membrane composition, metabolic rate and lifespan. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 150, 196–203.
- Hulbert, A.J., and Else, P.L. (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199, 257–274.
- Hulbert, A.J., and Else, P.L. (2000). Mechanisms underlying the cost of living in animals.
- Hulbert, A.J., Faulks, S., Buttemer, W.A., and Else, P.L. (2002). Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J. Exp. Biol.* 205, 3561–3569.
- Hulbert, A.J., Faulks, S.C., and Buffenstein, R. (2006a). Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 1009–1018.
- Hulbert, A.J., Faulks, S.C., Harper, J.M., Miller, R.A., and Buffenstein, R. (2006b). Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech. Ageing Dev.* 127, 653–657.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., and Buttemer, W.A. (2007). Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87, 1175–1213.
- Hulbert, A.J., Beard, L.A., and Grigg, G.C. (2008). The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Exp. Gerontol.* 43, 729–733.
- Jové, M., Naudí, A., Aledo, J.C., Cabré, R., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., and Pamplona, R. (2013). Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Sci. Rep.* 3, 3346.
- Jové, M., Naudí, A., Gambini, J., Borrás, C., Cabré, R., Portero-Otín, M., Viña, J., and Pamplona, R. (2017). A stress-resistant lipidomic signature confers extreme longevity to humans. *J. Gerontol. Ser. A* 72, 30–37.
- Käkelä, R., and Hyvärinen, H. (1995). Fatty acids in the triglycerides and phospholipids of the common shrew (*Sorex araneus*) and the water shrew (*Neomys fodiens*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 112, 71–81.
- Kirkwood, T.B.L. (1977). Evolution of ageing. *Nature* 270, 301–304.

- Kirkwood, T.B.L. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437–447.
- Koval, M., and Pagano, R.E. (1991). Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1082, 113–125.
- Kris-Etherton, P.M., and Yu, S. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1628S–1644S.
- Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1666, 62–87.
- Lee, A.G. (2011). Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends Biochem. Sci.* 36, 493–500.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., and Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 6, 19.
- MacArthur, R.H., and Wilson, E.O. (1967). *The Theory of Island Biogeography* (Princeton, N.J.: Princeton University Press).
- Masella, R., Pignatelli, E., Marinelli, T., Modesti, D., Verna, R., and Cantafora, A. (1995). Age-related variations in plasma and liver lipids of Yoshida rats: a comparison with Wistar rats. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 111, 319–327.
- McMullen, T.P., and McElhaney, R.N. (1996). Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1, 83–90.
- McMullen, T.P.W., Lewis, R.N.A.H., and McElhaney, R.N. (2004). Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, 459–468.
- McNab, B.K. (1997). On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol. Zool.* 70, 718–720.
- Medawar, P.B. (1952). *An unsolved problem of biology* (London: H.K. Lewis).
- Meer, G. van (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 247–275.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., and Johnson Jr., J.E. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15, 575–591.
- Modi, H.R., Katyare, S.S., and Patel, M.A. (2008). Ageing-induced alterations in lipid/phospholipid profiles of rat brain and liver mitochondria: implications for mitochondrial energy-linked functions. *J. Membr. Biol.* 221, 51–60.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J., and Buttemer, W.A. (2011). The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLOS ONE* 6, e24138.

Olovnikov, A. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 201, 1496–1499.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.

Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1777, 1249–1262.

Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López Torres, M., and Barja, G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86, 53–66.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M.J., and Barja, G. (1998). Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.* 39, 1989–1994.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G. (1999a). Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Milan Italy* 11, 44–49.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, Jr., Thorpe, Sr., Herrero, A., and Barja, G. (1999b). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* 106, 283–296.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G. (2000a). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 112, 169–183.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., López-Torres, M., and Barja, G. (2000b). Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B286-291.

Pamplona, R., Barja, G., and Portero-Otín, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span - A homeoviscous-longevity adaptation? In *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*, D. Harman, ed. (New York: New York Acad Sciences), pp. 475–490.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E., and Barja, G. (2005). Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age* 27, 267–280.

Pearl, R. (1928). *The Rate of Living* (London: University of London Press).

Pianka, E. (1970). R-Selection and K-Selection. *Am. Nat.* 104, 592–597.

Portero-Otín, M., Requena, J.R., Bellmunt, M.J., Ayala, V., and Pamplona, R. (2004). Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Exp. Gerontol.* 39, 1527–1535.

- Puca, A.A., Andrew, P., Novelli, V., Anselmi, C.V., Somalvico, F., Cirillo, N.A., Chatgialloglu, C., and Ferreri, C. (2008). Fatty acid profile of erythrocyte membranes as possible biomarker of longevity. *Rejuvenation Res.* *11*, 63–72.
- Read, A.F., and Harvey, P.H. (1989). Life history differences among the eutherian radiations. *J. Zool.* *219*, 329–353.
- Réale, D., Garant, D., Humphries, M.M., Bergeron, P., Careau, V., and Montiglio, P.-O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *365*, 4051–4063.
- Ricklefs, R.E. (2000). Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. *Condor* *102*, 9–22.
- Ricklefs, R.E., and Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol. Evol.* *17*, 462–468.
- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Barja, G., and Pamplona, R. (2005). Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 1106–1114.
- Sanz, A., Pamplona, R., and Barja, G. (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.* *8*, 582–599.
- Scrimgeour, C.M., and Harwood, J.L. (2007). Fatty acid and lipid structure. In *The Lipid Handbook*, (London: Taylor & Francis Group), pp. 1–36.
- Shi, Y., Pulliam, D.A., Liu, Y., Hamilton, R.T., Jernigan, A.L., Bhattacharya, A., Sloane, L.B., Qi, W., Chaudhuri, A., Buffenstein, R., et al. (2013). Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *304*, R343–R355.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation: A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *71*, 522–525.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720–731.
- Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* *273*, 59–63.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., and Agarwal, S. (1993). Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *196*, 7–11.
- Speakman, J.R. (2005). Correlations between physiology and lifespan—two widely ignored problems with comparative studies. *Aging Cell* *4*, 167–175.
- Stawski, C., Valencak, T.G., Ruf, T., Sadowska, E.T., Dheyongera, G., Rudolf, A., Maiti, U., and Koteja, P. (2015). Effect of selection for high activity-related metabolism on membrane phospholipid fatty acid composition in bank voles. *Physiol. Biochem. Zool.* *88*, 668–679.

- Stearns, S.C. (1983). The influence of size and phylogeny on patterns of covariation among life-history traits in the mammals. *Oikos* 41, 173–187.
- Stearns, S.C. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Funct. Ecol.* 3, 259–268.
- Stearns, S.C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. (London: Oxford University Press).*
- Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29, 245–255.
- Valencak, T.G., and Ruf, T. (2007). N–3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell* 6, 15–25.
- Valencak, T.G., and Ruf, T. (2013). Phospholipid composition and longevity: lessons from Ames dwarf mice. *Age* 35, 2303–2313.
- White, C.R., and Kearney, M.R. (2013). Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *J. Comp. Physiol. B* 183, 1–26.
- Wiersma, P., Nowak, B., and Williams, J.B. (2012). Small organ size contributes to the slow pace of life in tropical birds. *J. Exp. Biol.* 215, 1662–1669.
- Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11, 398–411.
- Williams, J.B., Miller, R.A., Harper, J.M., and Wiersma, P. (2010). Functional linkages for the pace of life, life-history, and environment in birds. *Integr. Comp. Biol.* 50, 855–868.
- Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 82, 969–974.
- Wone, B.W.M., Donovan, E.R., Cushman, J.C., and Hayes, J.P. (2013). Metabolic rates associated with membrane fatty acids in mice selected for increased maximal metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 165, 70–78.
- Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 822, 267–287.
- Yin, H., Xu, L., and Porter, N.A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944–5972.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27, 339–344.
- Zielinski, Z.A.M., and Pratt, D.A. (2017). Lipid peroxidation: kinetics, mechanisms, and products. *J. Org. Chem.* 82, 2817–2825.