

**XX. reál- és humántudományi Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia (ETDK)**

**Kolozsvár, 2017. május 18–21.**

# **Öregedés, életmenet és oxidatív stressz madaraknál: egy összehasonlító vizsgálat**

**Szerző:**

**Pénzes Janka**

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Biológia és Geológia Kar, biológia szak,  
alapképzés, III. év

**Témavezető:**

**dr. Vágási István Csongor** egyetemi adjunktus,

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Biológia és Geológia Kar

## Tartalomjegyzék

Bevezető .....	2
Módszerek .....	8
Mintavétel.....	8
Biokémiai mérések .....	9
Öregedés, életmenet és lehetséges zavaró tényezők.....	11
Statisztikai elemzések.....	13
Eredmények .....	15
Életmenet jellegek közötti összefüggések .....	15
Az öregedés oxidatív stressz elmélete (ÖOSE).....	17
Az életmenetek oxidatív stressz elmélete (ÉOSE) .....	18
Tárgyalás .....	20
Az öregedés oxidatív stressz elmélete (ÖOSE).....	21
Az életmenetek oxidatív stressz elmélete (ÉOSE) .....	24
Köszönetnyilvánítás .....	26
Irodalomjegyzék .....	27

## Bevezető

Az öregedés megértésére való törekvés egyidős az emberiséggel. Az öregedés vizsgálata napjainkban is a biológia egyik fontos és időszerű témája, mely széles evolúciós és humán egészségügyi vonatkozással bír (Kirkwood & Austad 2000). Az életkor előrehaladtával fokozódó fiziológiai funkcióvesztést, valamint ezzel párhuzamosan növekvő elhalálozási esélyt és csökkenő szaporodási teljesítményt nevezünk öregedésnek (Rose 1991). Mivel az egyedeket tekintve számos negatív hozadékkal jár, széles körben kutatott kérdés, hogy milyen evolúciós folyamatok vezetnek az öregedés kialakulásához (Rose 1991). Bár az öregedés általános jelenségnek számít az élővilágban (Jones *et al.* 2014), az olyan ritka fajok megléte, melyek nem öregednek (pl. barlangi vakgöte *Proteus anguinus* vagy csupasz turkáló *Heterocephalus glaber*; (Pérez *et al.* 2009; Voituron *et al.* 2011)), szintén előtérbe helyezi az öregedés mögött rejlő folyamatok megértésének fontosságát.

Az öregedés evolúciós eredetének és mechanizmusainak magyarázatára számos elmélet született. Egy külön csoportot alkotnak az öregedés evolúciós elméletei, melyeknek a különböző mutációs és szelekciós folyamatok közti kölcsönhatások képezik az alapját (Gavrilov & Gavrilova 2002; Haussmann & Treidel 2015). Az öregedés evolúciós elméleteinek fontos alaptézise, hogy a szelekció hatása az életkor előrehaladtával gyengül, hiszen egy populációban a legtöbb egyed fiatal felnőtt korban hoz létre sikeresen másolatokat önmagáról, majd a túlélési és szaporodási sikere rohamosan csökken idős felnőtt korban. Peter Medawar „mutáció felhalmozódás elmélete” szerint az olyan káros mutációkra, melyek csak idős korban fejtik ki ártalmas hatásukat kisebb szelekciós nyomás hat, mint a már fiatal korban károkat okozó mutációkra. Ennek oka az, hogy a vadon élő állatok nagy hányada fiatalon szaporodik és ezzel sikeresen továbbörökíti öregkorban kifejeződő káros mutációit még mielőtt ezek megnyilvánulhatnának (Haussmann & Treidel 2015). George C. Williams által megfogalmazott „antagonista pleiotrópia elmélet” azt feltételezi, hogy léteznek olyan gének, melyek több életmenet tulajdonságra hatnak (pleiotrópia) ellentétes irányba (antagonista). Az elmélet szerint egy olyan gén/mutáció, amely a fiatalkori reprodukzív sikert jelentősen növeli, akkor is fennmaradhat a populációban, ha ezzel párhuzamosan csökkenti az öregkori túlélési és/vagy szaporodási sikert (Gavrilov & Gavrilova 2002; Flatt & Promislow 2007). Egy másik fontos elmélet Thomas Kirkwood „eldobható test elmélete”, mely szerint a testi sejtek működésének megőrzéséhez és károsodásaik javításához szükséges folyamatok jelentős mértékű energiát igényelnek. Emiatt a szaporodásba fektetett források csakis a sejtszintű károsodások kivédésének és javításának rovására növelhetők, ami a korral fokozódó

funkcióvesztést és öregedést eredményez (Kirkwood & Austad 2000). Bár ez az elmélet az öregedés evolúcióját magyarázza, kiemelkedő szerepet kapnak benne azok az élettani folyamatok, amelyek felelősek a szaporodás és testi épség megőrzése közötti csereviszony vezérléséért (pl. oxidatív stressz; lásd lentebb), illetve amelyek felelősek a testi épség megőrzéséért és a keletkező reverzibilis testi károk kijavításáért. A fentebbi tulajdonságai miatt az „eldobható test elmélet” egyrészt egy kombinációja az öregedés evolúciós és mechanisztikus megközelítéseinek, másrészt kapcsolatban áll az életmenet elmélettel is, hiszen ennek fontos összefüggésére, a szaporodási és túlélési ráták fordított kapcsolatára épül (lásd lentebb).

Az öregedés mechanizmusát vizsgáló elméletek arra keresik a választ, hogy milyen élettani és sejttani folyamatok felelősek az öregedésért (Hausmann & Treidel 2015). Ezek közül az egyik legkiemelkedőbb és legtöbb figyelmet kapott elmélet az „öregedés oxidatív stressz elmélete” (ÖOSE) vagy régebbi nevén az „öregedés szabadgyök elmélete” (Beckman & Ames 1998; Finkel & Holbrook 2000b). Az ÖOSE szerint az aerob sejtek normális működése közben termelődő reaktív oxigénformák (ROF) által előidézett oxidatív sejtkárosodás felelős az öregedésért. Habár a különböző intracelluláris (főleg a mitokondriumban zajló) oxidoredukciós folyamatok nyomán keletkező ROF kis mennyiségben a sejtek normális működéséhez elengedhetetlen jelmolekulák és a kórokozókkal szembeni védekezésben is kulcsszerepük van (Finkel 1998), amennyiben termelődésük meghaladja ezt a szintet és az antioxidáns védekezési rendszer nem képes ezeket semlegesíteni oxidatív stressz lép fel. Oxidatív stressz következtében vitális sejtalkotó molekulák (lipidek, fehérjék és DNS) irreverzibilisen károsodhatnak, és az efféle károk felhalmozódása végül a sejtek funkcióvesztését okozhatja (Finkel & Holbrook 2000a). A sejtek funkcióvesztése idővel nagyobb léptékben is megmutatkozik fontos szervek működési zavara és időskori betegségek kialakulása formájában, amelyek végső soron növelik az elhalálozás esélyét (Kirkwood & Kowald 2012).

Az ÖOSE-t kezdetben támogató korrelatív vizsgálatok után következtek azok a genetikai manipulációs vizsgálatok, amelyekben a kutatók vagy fokozták a ROF semlegesítését végző antioxidáns enzimeket kódoló gének expresszióját vagy génkiütéssel korlátozták az antioxidáns enzimek általi védekezés hatékony működését. Ezek a kísérletek abból a feltételezésből indultak ki, hogy a ROF hatékonyabb (fokozott antioxidáns génexpresszió) vagy kevésbé hatékony (génkiütés) semlegesítése hosszabb, illetve rövidebb élethosszt eredményez (Gems & Doonan 2009; Barja 2013). A nagyszámú laboratóriumi modellszervezeteken (sörélesztő *Saccharomyces cerevisiae*, fonálféreg *Caenorhabditis*

*elegans*, ecetmuslica *Drosophila melanogaster* és egér *Mus musculus*) végzett genetikai kísérletek azonban ellentmondásos és gyakran az ÖOSE-vel ellentétes eredményeket szolgáltatottak, aminek köszönhetően többen megkérdőjelezték az ÖOSE helyességét (Gems & Doonan 2009; Speakman & Selman 2011). Fontos kiemelni azonban az ÖOSE legfontosabb aspektusát, ami árnyalja a genetikai kísérletekre alapozott, ÖOSE-t ért kritikákat. Az ÖOSE szerint az öregedés elsősorban nem a ROF-val szembeni antioxidáns védekezés hatékonyságától függ, hanem a felhalmozódott oxidatív sejtkároktól (Barja 2013). A sejtszintű oxidatív károsodás egy rendkívül komplex hálózat számos összetevőjének eredője, amiből az antioxidáns védekezés mindössze egyetlen tényező (Pamplona & Barja 2011). Ez az oka annak, hogy kevés sikerrel jártak az antioxidánsok adagolásán alapuló élettartam növelését célzó kísérletek embereknél és laboratóriumi körülmények közt tenyésztett modellszervezeteken. Ráadásul az antioxidáns védekezés önmagában is egy alhálózat, amit számos enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns redundáns és komplementer kapcsolatai alkotnak. Ennek következtében egyetlen antioxidáns enzim kódoló gén kifejeződésének fokozása rövidítheti az élettartamot, szemben az ÖOSE által prediktált hosszabb élettartammal, azáltal, hogy felboríthatja a homeosztatis redox állapotot és ezzel gátolhatja a ROF esszenciális funkcióit (Bokov, Chaudhuri & Richardson 2004).

Az sejtszintű oxidatív károsodás mértéke főleg a következő tényezőktől függ: a légzési lánc I.-es komplexének mennyisége a belső mitokondriális membránban, mitokondriális membrán lipid összetétele, antioxidáns enzimek és molekulák, membrán potenciál, szétkapcsoló fehérjék aktivitása, fehérjék metionin tartalma, DNS guanin tartalma és reverzibilis károkat javító mechanizmusok hatékonysága (Pamplona & Costantini 2011; Barja 2013). Ezen oxidatív fiziológiai adaptációk közül hármát vizsgáltak behatóbban sokfajos filogenetikus összehasonlító módszerrel. Eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a hosszú élettartam egyrészt az alacsony ROF termeléssel, másrészt a membránok alacsony többszörösen telítetlen zsírsav összetételével függ össze (Hulbert *et al.* 2007; Pamplona & Barja 2011; Barja 2013; Galván *et al.* 2015). Harmadrészt, az élettartam fajok közötti változatosságát az antioxidáns védekezés úgy tűnik nem képes magyarázni (Barja 2013).

Aerob sejtekben a ROF képződésének elsődleges forrása a belső mitokondriális membrán szintjén működő, a sejtek energiaszükségletének jelentős részét fedező ATP képzéséért felelős, terminális oxidációban részt vevő elektrontranszportlánc (Barja 2007). A ROF képződésének mérséklése elsősorban az elektrontranszportlánc I.-es komplexének szintjén valósul meg, ugyanis a ROF jelentős része itt termelődik. Az I.-es komplex alacsonyabb számát figyelték meg például házi galamboknál (*Columba livia domestica*), akik

a laboratóriumi patkányokkal azonos testsúlyúak, ám lényegesen hosszabb élettartamúak (Lambert *et al.* 2010). A semlegesítésre nem kerülő ROF károsító hatásának kivédésére szolgáló strukturális mechanizmusok közül az egyik a membránok kettős lipid rétegének alkotásában résztvevő foszfolipidek többszörösen telítetlen zsírsavláncaiban a kettős kötések száma. Több emlősökön, madarakon és gerincteleneken végzett vizsgálatban kivétel nélkül azt találták, hogy a sejtet és sejtszervecskéket burkoló membránok foszfolipidjeinek alkotásában részt vevő telítetlen zsírsavláncokban a kettős kötések száma rövid élettartamú fajoknál sokkal nagyobb, míg a telített/telítetlen zsírsavak aránya nem mutatott összefüggést az élettartammal (Naudí *et al.* 2011). A többszörösen telítetlen zsírsavak kettős kötéseinek alkotásában részt vevő metilén csoportok könnyen reakcióba lépnek a különböző ROF-al, így a kettős kötések számának növekedésével a zsírsavlánc sokkal fogékonyabb lesz a peroxidatív károsodásokra. Jelenlétük ezenkívül növeli a membránok fluiditását, ezáltal átjárhatóbbá téve az oxigén és különböző szabadgyökök számára, valamint a telítetlen zsírsavak károsodása nyomán keletkező termékek közül a peroxil gyökök a szomszédos zsírsavláncokkal vagy a membrán alkotásában résztvevő fehérjékkel reakcióba lépve szintén strukturális károsodásokat okoznak (Pamplona 2008). Azonban nincs tudomásunk olyan összehasonlító vizsgálatról, ami ellenőrizte volna azt a feltevést, hogy a hosszú élettartam alacsony oxidatív lipid károsodással függ össze, a mi vizsgálatunk tehát e tekintetben az elsők közt szerepel. A harmadik széles körben vizsgált adaptáció az antioxidáns enzimek és molekulák aktivitása. Számos ROF-t semlegesíteni képes antioxidáns molekula áll rendelkezésre. Ilyenek a szuperoxid anionból hidrogén-peroxidot és szinglett oxigént képző szuperoxid diszmutáz, illetve a kataláz és a glutation peroxidáz. Ezenkívül ide tartoznak még az endogén úton termelt vagy táplálék által szervezetbe bevihető más antioxidánsok, például az ubiquinonok, a glutation, a vízben oldódó C-vitamin, az E-vitamin, karotinoidok (Monaghan, Metcalfe & Torres 2009; Pamplona & Costantini 2011). Az antioxidáns védekezés azonban látszólag nem függ össze vagy negatívan függ össze az élettartammal, ami ellenkezik az ÖOSE által prediktált pozitív összefüggéssel (Barja 2013). Azonban az eddigi antioxidánsokkal kapcsolatos összehasonlító vizsgálatok vagy kis mintaszámra korlátozódtak (pl. néhány fajpár összehasonlítása), vagy az elemzések során nem vették figyelembe a testtömeg és közös őstől való leszármazás hatásait, vagy a mintavételezés nem a szaporodási időszakokra korlátozódott (Speakman 2005b; Cohen *et al.* 2008; Barja 2013).

A fajok életmenet jellegeiben (pl. növekedési, szaporodási és túlélési ráta) fellelhető széles változatosság számos életmenet stratégiát eredményez, amelyek egy ún. lassú–gyors életmenet tengelyt határoznak meg. A tengely egyik pólusán a gyors életmenetű fajok

helyezkednek el, melyek intenzív növekedési és szaporodási rátával, valamint magas mortalitási rátával és rövid élettartammal jellemezhetőek, míg a velük ellentétes mintázatot mutató lassú életmenetű fajok képviselik a tengely másik pólusát. Ezen széles változatosság magyarázatát keresi az életmenet elmélet. A negatív csereviszonyok központi szerepet játszanak az életmenet elméletben és főképp ezzel magyarázzák a szaporodási és túlélési ráták fordított kapcsolatát. Eszerint a limitált mennyiségben rendelkezésre álló források egy adott életmenet jelleg irányába való allokálása egy másik életmenet jellegbe való befektetés rovására történhet (Stearns 1989). Például a növekedési ráta és a szaporodási siker növelése a saját testi sejtek épségének a rovására történhet (Flatt & Promislow 2007), mely az „eldobható test elmélet” alap gondolata (Kirkwood & Austad 2000). A szaporodási és túlélési ráta közötti csereviszony mögött rejlő élettani folyamatok megértése kulcsfontosságú (Zera & Harshman 2001). Egyik ilyen lehetséges mechanizmus az oxidatív stressz, amely az utóbbi időben nagy figyelmet kapott az ökoфизиológusok körében, akik szerint az oxidatív állapot nemcsak az öregedés, hanem általánosabban az életmenetek evolúcióját is vezényelheti (Costantini 2008; Monaghan *et al.* 2009; Dowling & Simmons 2009; Buttemer, Abele & Costantini 2010; Cohen, de Magalhães & Gohil 2010; Isaksson, Sheldon & Uller 2011; Selman *et al.* 2012; Metcalfe & Monaghan 2013; Blount *et al.* 2016). Az „életmenetek oxidatív stressz elmélete” (ÉOSE) szerint a fokozott szaporodás oxidatív költségeket von maga után, ami végső soron növeli a mortalitási rátát és/vagy lerövidíti az élethosszt (Metcalfe & Monaghan 2013). A feltevést ellenőrző számos vizsgálat látott napvilágot, melyeknek eredményei azonban ellentmondásosak (Metcalfe & Monaghan 2013; Speakman & Garratt 2014; Blount *et al.* 2016). Az ÉOSE-t támogató vizsgálatok egyike egy meta-analízises összesítő vizsgálat, amelyben azt találták, hogy a szaporodási befektetés növekedésével a vérben található oxidatív stressz markerek szintje jelentős növekedést mutatott, ugyanakkor a szaporodó és nem szaporodó egyedeket összehasonlítva, az előbbieknél bizonyos szöveti sejtek jelentősen alacsonyabb oxidatív károsodást mutattak (Blount *et al.* 2016). Zebrapintyeknél (*Taeniopygia guttata*) a szaporodási erőfeszítéssel csökkent az antioxidáns védekezés intenzitása (Wiersma *et al.* 2004). Egy vadonélő faj, a villás viharfecske (*Oceanodroma leucorhoa*) esetében szintén negatív összefüggést találtak az éves reprodukciós ráta és a teljes antioxidáns kapacitás között (Cohen *et al.* 2009). Az ellentmondásos eredmények oka egyrészt abban keresendő, hogy a legtöbb eddigi vizsgálatban főképp az antioxidáns védekezést mérték az oxidatív károsodás mérése nélkül (Monaghan *et al.* 2009; Buttemer *et al.* 2010; Cohen *et al.* 2010). Másrészt nagyon kevés olyan faj közötti összehasonlító vizsgálat látott napvilágot, melyekben az oxidatív károsodások mértékét a fajok eltérő életmenet stratégiáinak

függvényében vizsgálták volna (Cohen *et al.* 2008), ezáltal rálátást nyerve az életmenet jellegek oxidatív stresszel való összefüggésére.

Az ÖOSE-nek és az ÉOSE-nek tesztelésére 88 vadon élő európai madárfajon alapuló összehasonlító vizsgálatot végeztünk. Az öregedés ütemének becslésére a maximális élettartamot használtuk, az életmenet jellemzésére pedig a kurrens költés értékét (lásd (Bókony *et al.* 2009)), a felnőttkori éves mortalitási rátát és a lassú–gyors életritmus tengelyt vettük figyelembe. Az oxidatív állapot mérése érdekében vérmintákat gyűjtöttünk, melyből nem-enzimatis antioxidáns paramétereket (húgysav, teljes glutation szint és teljes antioxidáns kapacitás) és a lipidek oxidatív károsodásának mértékét (malondialdehid) mértük. Az ÖOSE-nek egyik fő predikciója, hogy a hosszú életű fajok kisebb szintű oxidatív károsodást szenvednek el (Kirkwood & Austad 2000a; Bokov, Chaudhuri & Richardson 2004). Az elmélet alapján ezenkívül azt vártuk, hogy a hosszabb életű fajoknál erőteljesebb antioxidáns kapacitást találunk (Bokov *et al.* 2004). Az ÉOSE egyik fontos predikciója, hogy azon fajok esetén magasabb az oxidatív stressz, melyeknél a kurrens (jelenlegi) szaporodási eseménybe való befektetés jelentős részét teszi ki az élettartam alatti teljes szaporodási befektetésnek (azaz magas a kurrens szaporodás értéke vagy más szóval gyors az életmenetük; (Monaghan *et al.* 2009; Metcalfe & Monaghan 2013)). Az ÉOSE további predikciója, hogy a fokozott oxidatív stressz (vagyis alacsony antioxidáns szint és/vagy magas oxidatív károsodás) növeli a mortalitási rizikót (Metcalfe & Monaghan 2013; Blount *et al.* 2016). Az öregedés és életmenetek oxidatív stresszel való kapcsolatának megértéséhez jelentősen hozzájárulhat egy több fajt magába foglaló összehasonlító vizsgálat. Az ÖOSE-ét tesztelő előző összehasonlító vizsgálatok száma kevés (Beckman & Ames 1998), a meglévők pedig kis számú fajt magukba foglaló vizsgálatok (Buttemer *et al.* 2010) vagy nem kontrollálnak a fajok testtömegére és a fajok közös őstől való leszármazására (Speakman 2005a). Az eddig született egyik legátfogóbb vizsgálat az ÉOSE-t tekintve egy madarakon végzett összehasonlító vizsgálat, melyben azonban csak az antioxidánsok szintjét mérték, oxidatív károsodásra utaló markereket nem (Cohen *et al.* 2008). A madárfajok kiváló alanyai az ilyen vizsgálatoknak sajátos oxidatív fiziológiájuk és életmenetük miatt. Élettartamuk másfélszer hosszabb, mint a velük azonos testtömegű emlősfajoké, annak ellenére, hogy a tömegegységre számított metabolikus rátájuk akár kétszer is nagyobb lehet (Holmes & Martin 2009). Izolált sejteken laboratóriumi körülmények közt kimutatták, hogy a galambok mitokondriumaiban a ROF képződési rátája jelentősen alacsonyabb, mint patkányok esetén (Barja & Herrero 1998). Azonban az olyan terepi vizsgálatok fontossága melyek révén kapcsolatba hozhatóak a vadon élő madárfajok életmenet jellegei és oxidatív fiziológiájuk



paraméterei elengedhetetlenek a folyamat megértéséhez, mely révén intenzív metabolikus rátájuk ellenére hosszú élettartamot mutatnak.

## Módszerek

### Mintavétel

A vizsgálatban megmintázott 601 madarat 2011 és 2013 között fogtuk be függönyhálóval Romániában. Mivel célkitűzéseink között szerepelt a szaporodás oxidatív költségének a meghatározása, a mintavételezéseket a szaporodási időszak csúcsához időzítettük (május és július között). Ennek sikerességét számos faj tojóján megfigyelhető kotlófoltok is megerősítették. A mintavételezések helyszínei (összesen 42 helyszín, 8 megyéből) előzetes tudásunk alapján voltak megválasztva, oly módon hogy minél nagyobb legyen a vizsgálatban szereplő fajok száma és a fajokon belüli egyedszám. Az egyes fajok egyedei túlnyomórészt különböző helyszíneken és/vagy különböző alkalmakkor voltak befogva, ezért a minták átlagai a mintázott fajokra reprezentatívak. Befogás után a madarakat fémgyűrűkkel láttuk el (megelőzve az egyedek ismételt mintázását), meghatároztuk a kort (csak a felnőtt egyedektől vettünk vérmintát) és a nemet, amennyiben lehetséges volt morfológiai és/vagy tollazati bélyegek alapján (a 85 fajból 28-nál [32,9 %] volt ez lehetetlen a szexuális monomorfizmus miatt). Ezt követően vérmintát vettünk (kb. 30–300  $\mu$ L testmérettől függően) heparinizált kapillárisokba. A kistestű fajoktól egy mintavételből származó vérmennyiség gyakran csak egy aliquot rész (lásd lentebb) készítéséhez volt elegendő, ami miatt a mintaszám az egyes oxidatív markerek esetében változó. A vérminta levétele a madár hálóba repülését követően a lehető legrövidebb időn belül megtörtént (15 percen belüli mintavételre törekedtünk; átlag  $\pm$  szórás =  $9,34 \pm 4,72$  perc). A mintavételezést a Román Tudományos Akadémia engedélyezte (2257-es számú engedély). A mintavételezést követően a madarak sérülések nélkül, jó állapotban kerültek elengedésre. A mintákat maximum 10 órán keresztül fénytől elzárva, hűtött dobozban tároltuk, a vérplazmát és alakos elemeket különválasztottuk centrifugálással (5 perc, 5000 percenkénti fordulatszám). Ezt követően a plazmát aliquot részekre osztottuk a mérendő oxidatív paraméterek függvényében és ezeket, valamint a vörösvérsejteket  $-50^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a laboratóriumi mérések időpontjáig. A minták előbbieken felsorolt standard módszerek alapján való gyűjtése minimalizálta az eredmények földrajzi régió, évszak, életkor és különböző stressz tényezőknek való kitettség miatti esetleges heterogenitását (csak Romániában, csak költési időszakban és kizárólag felnőtt egyedektől, rövid időintervallumot

lefedve mintáztunk). Ez a standardizálás elengedhetetlen, hiszen a redox állapotot jellemző élettani paraméterek érzékenyek lehetnek számos fentebb felsorolt tényezőre.

### Biokémiai mérések

Az egyedek oxidatív állapotának jellemzésére három antioxidáns markert mértünk (teljes antioxidáns kapacitás, TAK, húgysav, HS, és teljes glutation szint, tGSH), valamint a membránlipidek károsodásának mértékét egy paraméterrel jellemeztük (malondialdehyd, MDA). A TAK egy összetett paraméter, mely a vérplazmában található nem-enzimatikus antioxidánsok (vitaminok, fehérjék szulfhidril csoportjai és húgysav) összesített szabadgyökökkel szembeni védekezőképességét fejezi ki. A TAK mérési módszer egy kereskedelmi kit útmutatója alapján történt (CaymanChemical, AnnArbor, MI). A vérplazma (5 µL) tízszeresére lett hígítva (1:10 v:v) a mérési oldatban, majd hozzáadtuk a kromogén anyagot (ABTS-2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-szulfoninsav]), metmioglobint és hidrogén peroxidot (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ezt követően pedig 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében az ABTS oxidációja a metmioglobin által ABTS<sup>+</sup>-t eredményez, ami kékeszöldes színt ad az oldatnak. A plazmában található antioxidánsok megakadályozzák az ABTS oxidálódását, elnyomva a 750 nm-en észlelhető abszorbanciát a koncentrációjukkal egyenes arányban (Rice-Evans & Miller 1994). Ez a kumulatív antioxidáns kapacitás összehasonlításra kerül a Trolox-éval (standard oldat), ami egy vízzoldékony tokoferol (E-vitamin) analóg és a TAK mértékegysége mM Trolox-egyenérték (kalibrált standard görbe,  $R^2 = 0,98$ ). Mivel a HS a TAK egy fő komponense, a TAK és HS közötti regresszió alapján kiszámoltuk a TAK reziduumokat, ami egy HS-től független TAK mérőszám (Cohen, Klasing & Ricklefs 2007). A plazma HS koncentrációját spektrofotometriás módszerrel mértük egy kereskedelmi kipurikáz/peroxidázalapú mérési módszerével (UricAcidliquicolor, Human, Wiesbaden, Germany). 250 µL reagenst adagoltunk 5 µL plazmához és 50°C-on inkubáltuk 5 percig. Az abszorbanciát 520 nm-en olvastuk le. A végső HS értékek mg/dL plazma formájában vannak kifejezve.

A GSH a legjelentősebb intracelluláris, nem-enzimatikus antioxidáns (Galván & Alonso-Alvarez 2008). A teljes GSH (tGSH) szintet egy kereskedelmi kit által előírt módszerrel mértük (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) követve a Galván és Alonso-Alvarez (Galván & Alonso-Alvarez 2008) és Hōrak és mtsai. (Horak *et al.* 2010) által előírt módszereket némi módosítással. Miután a minták jégen kiolvadtak, az eritrocitákat háromszor átmostuk fiziológiás sóoldattal és centrifugáltuk 600× g-n 10 percig 4°C-on. Ezt követően,

mivel az eritrociták mennyisége változott mintáról mintára, lemértük a mintában lévő eritrociták tömegét, majd deproteinizáltuk 5-szulfoszalicilsavat (SSA; 1:1 w:v) hozzáadva a tömeg függvényében (vagyis 100-mg eritrocitát 100 $\mu$ L 5%-os SSA-ban oldottunk fel). Ezután az oldatot erőteljesen vortexeltük, majd 10 percig jégen tároltuk. Végül 10000 $\times$  g-n és 4 C-on centrifugáltuk a kicsapódott fehérjék eltávolítása céljából. A felülúszó folyadékból 5  $\mu$ L-t egy Eppendorfba pipettáztunk, tízszeresére hígítottuk és ezt az oldatot használtuk a tGSH koncentráció mérésére a gyártó utasításait követve. A tGSH meghatározása egy kinetikus mérésalapján történik, melyben a GSH nmol-nyi mennyiségei a 2-nitrobenzolsavat 5-thio-2-nitrobenzolsavra (TNB) redukálják, miközben oxidált GSSG képződik, mely a glutation reduktáz és NADPH által újra GSH-ra redukálódik. A TNB termék által keltett sárga szín arányos a GSH mennyiséggel. Az abszorbancia spektrofotométerrel volt mérve 412 nm-en 1 percenként egy 5 perces intervallumot lefedve és változása egy standard görbe abszorbancia értékeihez volt viszonyítva, melyben a GSH-ból készített sorozatos hígítások kerültek lemérésre. A végső értékek nmol/mg eritrocita mértékegységgel fejeztük ki.

A MDA egy karbonil vegyület, mely a membránlipidek többszörösen telítetlen zsírsavláncainak ROF általi peroxidatív károsodása nyomán keletkezik, emiatt az oxidatív stressz széles körben használt paramétere (Del Rio, Stewart & Pellegrini 2005). A plazma MDA szintje nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel volt mérve a TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) módszer helyett, magasabb megbízhatósága miatt (Del Rio *et al.* 2005). A Karatas és mtsai. (Karatas, Karatepe & Baysar 2002) által kidolgozott gyors és érzékeny módszerrel dolgoztunk a madarak kis plazmamennyiségeihez igazodva Noguera és mtsai. nyomán (Noguera *et al.* 2011). 10  $\mu$ L plazmához 50  $\mu$ L 0,1 M-os perklórsavat és 90  $\mu$ L ultratiszta vizet adagoltunk (1:15 v:v hígítást elérve). Az így keletkezett oldatot 4500 $\times$ g-n 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóból 100  $\mu$ L-t injektáltunk a HPLC oszlopba. A mozgó fázist 30 mM-os kálium-foszfát és metanol keveréke (65:35, v:v %) képezte és a folyadék áramlásának sebességét a HPLC oszlopban 0,5 mL/perc értékre állítottuk. A MDA retenciója 6 perc körül volt. A minták MDA koncentrációját egy kalibrált görbe segítségével határoztuk meg ( $R^2 = 0,99$ ), mely egy standardsorozat alapján készült a 1,1,3,3-tetraetoxipropán (Sigma-Aldrich) savas hidrolízisét követő sorozathígítás eredményeként. Az eredmények  $\mu$ g/mL formájában fejeztük ki és az értékek nem voltak visszaszorozva a 15-szörös hígítással.

Tudomásunk szerint ez az első vizsgálat, amelyben ennyire nagyszámú és változatos madárfajnál mértek MDA-t, továbbá a TAK, HS és tGSH szintjét elsőként vizsgáljuk ilyen nagyszámú európai madárfajon. A mért paraméterek közül egyik sem érzékeny a befogástól

vérvételig eltelt időre és a tárolás időtartamára (eredmények nincsenek bemutatva). A HS koncentrációja szignifikáns pozitív összefüggést mutat a TAK értékével (fajsztű korreláció:  $r = 0,32$ , 95% CI: 0,12–0,50,  $t = 3,07$ ,  $df = 82$ ,  $P = 0,003$ ) előző vizsgálatok eredményeivel összhangban (Cohen *et al.* 2008). A fajsztű HS-től független TAK-t az egyedi szinten mért TAK és HS közötti regresszió reziduuumainak fajonkénti átlagolásával számoltuk ki (lásd (Cohen *et al.* 2008)).

## Öregedés, életmenet és lehetséges zavaró tényezők

Az öregedés üteme kiszámítható mortalitási görbék alapján (Gompertz függvény). Ilyen demográfiai adatok azonban számos faj esetén nem állnak rendelkezésre. Ennek hiányában a maximális lehetséges élettartamot (MLÉ) használtuk, hiszen, bár nem tökéletes (de Magalhães, Costa & Church 2007; de Magalhães & Costa 2009), viszonylag megbízható módon jellemzi az öregedési rátát (Magalhães & Church 2006). Továbbá a MLÉ sok fajra elérhető (lásd lentebb), emiatt gyakran használt összehasonlító vizsgálatokban. Nem mellékes az sem a MLÉ használatát tekintve, hogy egy öregedési elméletnek eleve fontos feladata megválaszolni azt is, hogy miért különböznek fajok MLÉ tekintetében (Magalhães & Church 2006; Hulbert 2008; Barja 2013). A MLÉ adatok az AnAge internetes adatbázisból voltak begyűjtve (URL: <http://genomics.senescence.info/species/>; (de Magalhães & Costa 2009) figyelembe véve, hogy vadon élő vagy fogságban tartott egyedek adatai alapján volt számolva a MLÉ, illetve hogy mekkora mintaszámon alapul a MLÉ becslése, ugyanis a MLÉ annál hitelesebb, minél nagyobb egyedszám alapján van kiszámolva (Galván *et al.* 2015; Møller 2006). Azon fajokra, melyek hiányoztak az AnAge adatbázisból, az EURING adatbázisból (URL: <http://www.euring.org/data-and-codes/longevity-list>) gyűjtöttük ki a MLÉ adatot. A két forrásból származó MLÉ értékek erősen pozitívan korrelálnak ( $r = 0,86$ , 95% CI = 0,79–0,91,  $t = 14,09$ ,  $df = 68$ ,  $P < 0,001$ ).

Az egyedek életmenetét a kurrens költés értékével, az életmenet ütemével (lassú–gyors életritmus tengely) valamint az éves felnőttkori mortalitási rátával jellemeztük. A kurrens költés értéke egy a fajra jellemző átlagos méretű fészekalj élettartam alatti szaporodási erőfeszítéshez történő százalékos hozzájárulását fejezi ki és a következő képlettel számolható:  $\log_{10}(\text{fészekaljméret}/(\text{fészekaljméret} \times \text{évi átlagos fészekaljak száma} \times \text{átlagos szaporodási élettartam}))$  (lásd (Bókony *et al.* 2009)). Az átlagos szaporodási élettartam az éves felnőttkori mortalitási ráta reciproka. A kurrens költés értéke így nagyobb (közelebb áll 1-hez) olyan fajoknál, melyek nagyobb mértékben fektetnek a jelenlegi szaporodási eseménybe

ellentétben azokkal, melyek a jövőbeni szaporodási eseményekbe fektetnek többet (kurrens költség értéke közelebb áll 0-hoz). Az átlagos fészekalj méret és a fészekaljak átlagos évenkénti száma Snow és mtsai. monográfiájából lettek kigyűjtve (Snow, Perrins & Cramp 1998). A felnőttkori éves mortalitási ráta főképp két nagyobb adatsorból származik (Møller 2006; Székely *et al.* 2014), amit néhány más forrásból kiegészítettünk. A három forrásból származó felnőttkori mortalitási ráták értékei erősen pozitívan korrelálnak egymással (Spearman-féle rangkorreláció, minden  $\rho > 0,69$ , minden  $P < 0,001$ ). A végső felnőttkori mortalitási ráta értékek a három forrásból származó értékek átlagai. A lassú–gyors életritmus tengely jellemzése érdekében hat életmenet jelleget (testtömeg, tojástömeg, fészekalj méret, kotlási időszak hossza, röptetési időszak hossza és MLÉ; minden érték log10 transzformált formában) használtunk (lásd pl. (Swanson & Dantzer 2014)). A 6 életment jelleg alapján egy filogenetikai főkomponens analízist végeztünk a ‘*phyl.pca*’ függvény használatával (‘*phytools*’ R csomag; (Revell 2012) (R argumentumok: *method* = “lambda”, *mode* = “cov”; törzsfát lásd lentebb). Az első két főkomponens (PC1 és PC2) együttesen az életritmus varianciájának 85,46%-át magyarázta (1. táblázat). A PC1-nek pozitív főkomponens súlyai vannak az összes életmenet jelleg esetében kivéve a fészekalj méretét, míg a PC2-nek erős negatív súlya van a MLÉ esetében (1. táblázat). Emiatt a PC1-et a lassú–gyors életritmus tengelyként értelmezzük, míg a PC2-t egy öregedés tengelyként.

**1. táblázat:** Filogenetikai főkomponens analízis eredményei az első két főkomponens (PC1 és PC2) súlyainak és a főkomponensek által magyarázott életmenet varianciának a feltüntetésével. Mind a 6 életment jelleg log10 transzformáció után került az elemzésbe.

<b>életmenet jelleg</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
% magyarázott variancia	70,39	15,07
testtömeg	0,983	0,096
tojástömeg	0,935	0,116
MLÉ	0,431	-0,902
kotlási időszak	0,249	-0,076
röptetési időszak	0,270	0,073
fészekalj méret	-0,355	0,098

## Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az R 3.2 (R Core Team 2015) programmal végeztük. Mind a négy általunk használt redox állapotot jellemző paraméter használható filogenetikai komparatív elemzésekben, ugyanis teljesítik azt a feltételt, hogy fajspecifikusak (a fajtársak jobban hasonlítanak egymásra, mint bármely más faj egyedére; lásd (Vágási *et al.* 2016)). A testtömeg az egyik legjelentősebb életmenet jelleg, ami számos morfológiai, biokémiai és viselkedési jeggyel összefügg. Nem kivétel ez alól a MLÉ és a redox fiziológiai rendszer számos összetevője sem (pl. mitokondriális ROF termelődési ráta és a mitokondriális membrán többszörösen telítetlen zsírsavlánc tartalma (Buttemer *et al.* 2010)). Az elemzések során emiatt kontrolláltunk a testtömegre. Ugyanakkor kontrolláltunk a közös őstől való leszármazásra (vagyis a törzsfára), hogy tekintettel legyünk a fajok egymástól való függőségére (Speakman 2005b; Buttemer *et al.* 2010). Erre a két zavaró tényezőre való kontrollálással válik lehetővé annak az érdekes kérdésnek a megválaszolása, hogy a testtömegtől független MLÉ mutat-e összefüggést az antioxidáns védekező kapacitással és/vagy a sejtkomponensek oxidatív károsodásával (Buttemer *et al.* 2010). E kérdés megválaszolása kulcsfontosságú eleme az ÖOSE-nek.

Az ÖOSE tesztelésére a 2. táblázat (a) részében feltüntetett modelleket használtuk. A PC2-t (öregedés tengely) és a MLÉ-t a négy redox paraméter függvényében vizsgáltuk. Az MLÉ modellbe a testtömeg fix hatásként került be. Ezenkívül a fejlődési időszak hosszára (kotlási + röptetési időszak) is kontrolláltunk, hiszen ez is befolyásolhatja az öregedést és az oxidatív stressz mértékét (Ricklefs 2010). A testtömeg és fejlődési idő mellőzve volt a PC1 (életritmus tengely) modellből, hiszen mindkettő aközé a 6 jelleg közé tartozik, amelyen alapult a filogenetikai főkomponens elemzés és a PC1 és PC2 tengelyek kinyerése.

Az ÉOSE tesztelésére a 2. táblázat (b) részében feltüntetett modelleket használtuk. Az első öt modell azt prediktálja, hogy a szaporodásba való befektetés oxidatív költségekkel jár. Ezért öt különböző modellt építettünk, melyekben az öt redox paraméter külön-külön függő változóként szerepelt és a kurrens költség értéke, a testtömeg, valamint az aktuális redox paraméterrel összefüggést mutató más redox paraméterek kerültek be fix hatásként az egyes modellekbe (2. táblázat). A következő modell azt prediktálta, hogy a felnőttkori éves mortalitási ráta az oxidatív fiziológiától függ. És végül a legutolsó predikció az volt, hogy az életmenetek lassú–gyors tengelye az oxidatív fiziológia függvénye. Ennek tesztelésére a PC1 került be függő változóként a modellbe, míg a redox markerek és a testtömeg magyarázó változókként. Az egyes modellekbe azért került be egyszerre több redox állapotot jellemző

paraméter, mert ezek egymással is összefüggést mutatnak (Vágási *et al.* 2016), ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy összefügg-e bármelyikük a függő változóval a többi redox paramétertől függetlenül. Minden változót log10 transzformáltunk, hogy a normalitási feltételnek eleget tegyenek. A teljes (szaturált) modelleket minimum modellekre egyszerűsítettük visszafelé történő kiléptetés módszerével, ahol a megengedőbb  $P < 0,1$  kritériumot alkalmaztuk, hogy megtarthassuk a marginális magyarázó változókat is (vagyis, amelyeknél  $0,05 < P < 0,1$ ).

Annak érdekében, hogy figyelembe vegyük a fajok egymástól való függését a közös leszármazás következtében, filogenetikai általánosított legkisebb négyzetek (PGLS) modelleket készítettünk, melyben a filogenetikai összetevő (Pagel  $\lambda$ ; (Page 1999)) maximum likelihood módszerrel volt kiszámítva. Hogy kontrolláljunk a törzsfák bizonytalanságára, 1000 azonosan helyes filogenetikai fát töltöttünk le a birdtree.org (Jetz *et al.* 2012) oldalról a Hackett és mtsai. (Hackett *et al.* 2008) által megépített váz alapján, majd az 1000 törzsfát egy ultrametrikus konszenzus fává olvastottuk össze a SumTrees program segítségével (Sukumaran & Holder 2010). Minden PGLS modell a teljes fajokészletet magába foglalta és a modelleket súlyoztuk az aktuális redox függő változó fajon belüli mintaszámára (mintázási erőfeszítés) a ‘gls’ függvény segítségével (‘nlme’ R csomag (Pinheiro *et al.* 2015)). Erre azért volt szükség, hogy a jól és kevésbé jól mintázott fajok lehetséges torzító hatását kizárjuk.

**2. táblázat:** A vizsgált hipotézisek és a tesztelésükre használt modellek. TAK – teljes antioxidáns kapacitás; HS – húgysav; TAKhs – TAK reziduuma TAK és HS közötti regresszióból; tGSH –teljes glutation; MDA – malondialdehid; törzsfa – datált filogenetikai törzsfa; PC1 – első főkomponens (életritmus tengely); PC2 – második főkomponens (öregedés tengely).

Függő változó	Fix hatás	Random hatás
<i>(a) öregedés oxidatív stressz elmélete (ÖOSE)</i>		
<i>1.1 predikció: az alacsonyabb antioxidáns kapacitás és/vagy az intenzívebb oxidatív károsodás rövidebb élettartammal függ össze</i>		
maximális élettartam	testtömeg + TAK+ HS + TAKhs + tGSH + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
PC2 (öregedés tengely)	TAK+ HS + TAKhs + tGSH + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
<i>(b) életmenetek oxidatív stressz elmélete (ÉOSE)</i>		

<i>2.1 predikció: a szaporodási erőfeszítés oxidatív költséggel jár</i>		
TAK	testtömeg + kurrens költség értéke + HS + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
HS	testtömeg + kurrens költség értéke + TAK + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
TAKhs	testtömeg + kurrens költség értéke + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
tGSH	testtömeg + kurrens költség értéke	törzsfa, Pagel $\lambda$
MDA	testtömeg + kurrens költség értéke + TAK + HS	törzsfa, Pagel $\lambda$
<i>2.2 predikció: az oxidatív stressz megnöveli a mortalitási rátát</i>		
felőttkori mortalitás	testtömeg + TAK + HS + TAKhs + tGSH + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$
<i>2.3 predikció: az életmenet összefüggést mutat az oxidatív fiziológiával; a gyors életmenetű fajok antioxidáns kapacitása alacsonyabb és/vagy oxidatív károsodásuk mértéke nagyobb</i>		
PC1 (életritmus tengely)	testtömeg + TAK + HS + TAKhs + tGSH + MDA	törzsfa, Pagel $\lambda$

Megvizsgáltuk azt is, hogy az eredményeink a MLÉ-t tekintve érzékenyek-e arra, ha bevesszük vagy kihagyjuk azokat a fajokat, amelyeknél a MLÉ kis mintaszám ( $n \leq 100$ ) alapján volt becsülve, illetve ha bevesszük vagy kihagyjuk azokat a fajokat, amelyeknél a MLÉ fogságban tartott egyedek alapján van kiszámolva (Galván *et al.* 2015). Az eredményeink szerint e két tényező nem változtatta szignifikáns módon az eredményeket (eredmények nincsenek bemutatva), így ezen fajok bevonásával végeztük el a végső elemzéseket.

## Eredmények

### Életmenet jellegek közötti összefüggések

Első körben olyan modelleket építettünk, amelyek alapján látható, hogy milyen kapcsolat van az egyes életmenet jellegek és a testtömeg között (3. táblázat), valamint az egyes életmenet jellegek között miután kontrollálunk a testtömegtől való függőségükre (4. táblázat). A 3. táblázat alapján látható, hogy az elemzések során a testtömeg allometrikus hatása miatt fontos kontrollálni a modellekben a testtömeg zavaró hatására. Az MLÉ és a többi életmenet jelleget egymással való összefüggése javarészt a testtömegtől való közös függőségükre vezethető vissza, hiszen amennyiben nem kontrollálunk a testtömegről, a 20 összefüggés közül 11 szignifikáns (eredmények nincsenek bemutatva) vagy marginálisan szignifikáns, míg testtömegről való kontrollálás után 20-ból mindössze 4 szignifikáns (4. táblázat). Ez azt mutatja, hogy az egyes



életmenet jellegek joggal külön modellekben elemezhetők, amennyiben a testtömegre kontrollálunk.

**3. táblázat:** MLÉ és életmenet jellegek a testtömeg függvényében. A szignifikáns és marginálisan szignifikáns értékek félkövér karakterekkel vannak feltüntetve.

Életmenet jelleg	$\beta \pm SE$	$t$	$P$	Pagel $\lambda$
MLÉ	0,19 $\pm$ 0,05	3,68	< <b>0,001</b>	0,28
Éves felnőttkori mortalitási ráta	-0,14 $\pm$ 0,03	5,27	< <b>0,001</b>	0,31
Fejlődési időszak hossza	0,05 $\pm$ 0,03	1,80	<b>0,075</b>	1,00
Fészekaljméret	-0,10 $\pm$ 0,04	2,70	<b>0,008</b>	0,99
Kurrens költség értéke	-0,13 $\pm$ 0,07	1,84	<b>0,071</b>	0,73

**4. táblázat:** Az öregedési és életmenet jellegek közti összefüggések a testtömegre kontrollálva. A táblázat első sorában szereplő értékek a függő változók. A  $\beta$  és  $t$  van feltüntetve; a  $P$  értékekre a felső indexben lévő szimbólumok utalnak: ns > 0,1, ~  $\leq$  0,1, \*  $\leq$  0,05, \*\*  $\leq$  0,01, \*\*\*  $\leq$  0,001. MLÉ – maximális lehetséges élettartam, FMR – felnőttkori mortalitási ráta, FIH – fejlődési időszak hossza, FÉM – fészekaljméret, KKÉ – kurrens költség értéke. A szignifikáns és marginálisan szignifikáns értékek félkövér karakterekkel vannak feltüntetve.

	MLÉ	FMR	FIH	FÉM	KKÉ
MLÉ	–	-0,20, 0,76 <sup>ns</sup>	-0,01, 0,04 <sup>ns</sup>	-0,03, 0,16 <sup>ns</sup>	-0,01, 0,07 <sup>ns</sup>
FMR	-0,05, 0,70 <sup>ns</sup>	–	-0,04, 0,34 <sup>ns</sup>	0,09, 0,93 <sup>ns</sup>	<b>0,15, 2,98<sup>**</sup></b>
FIH	0,01, 0,13 <sup>ns</sup>	-0,03, 0,35 <sup>ns</sup>	–	0,01, 0,19 <sup>ns</sup>	-0,04, 0,98 <sup>ns</sup>
FÉM	-0,01, 0,16 <sup>ns</sup>	0,16, 1,34 <sup>ns</sup>	0,04, 0,26 <sup>ns</sup>	–	<b>0,13, 3,82<sup>***</sup></b>

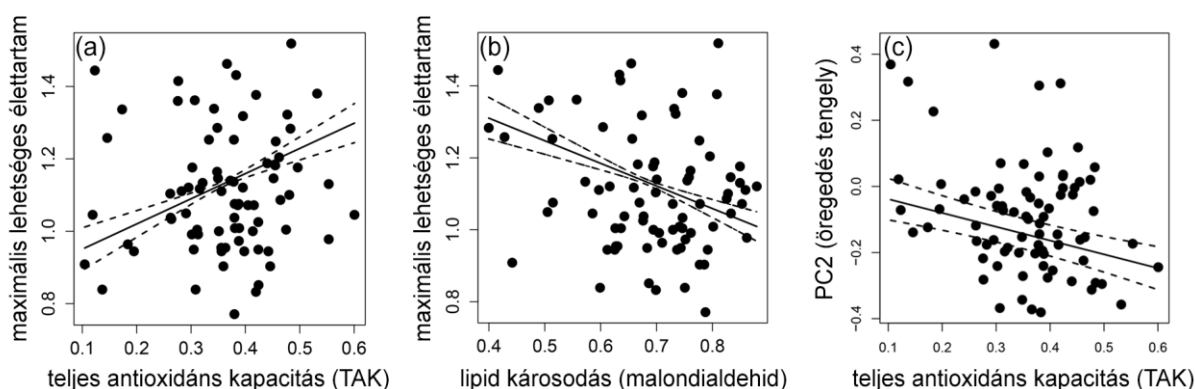
KKÉ	-0,04, 1,34 <sup>ns</sup>	<b>0,91, 3,20**</b>	-0,18, 0,55 <sup>ns</sup>	<b>0,79, 4,18***</b>	–
-----	---------------------------	---------------------	---------------------------	----------------------	---

Az öregedés oxidatív stressz elmélete (ÖOSE)

A hosszabb élettartamú fajoknak (azaz nagyobb MLÉ) nagyobb a testtömege, magasabb a TAK-a (1a ábra) és alacsonyabb a membránlipidek károsodásának mértéke (MDA) (5. táblázat, 1b ábra). A PC2-vel kapcsolatos eredmények is alátámasztják az élettartam és TAK közötti pozitív összefüggést, ugyanis a rövidebb élettartamú fajok (magasabb PC2, lásd 1. táblázat) alacsonyabb TAK értéket mutatnak (5. táblázat, 1c ábra).

**5. táblázat:** A #1 és #2 modellek az 1.1 predikció (2. táblázat) tesztelésére szolgálnak. A szignifikáns és marginálisan szignifikáns értékek félkövér karakterekkel vannak feltüntetve.

Modell	Függő változó	Magyarázó változó	$\beta \pm SE$	<i>T</i>	<i>P</i>
#1	MLÉ	Testtömeg	0,15 ± 0,04	3,50	<b>&lt; 0,001</b>
		TAK	0,86 ± 0,26	3,35	<b>0,001</b>
		MDA	-0,67 ± 0,21	3,23	<b>0,002</b>
#2	PC2 (öregedés tengely)	TAK	-0,42 ± 0,18	2,34	<b>0,022</b>



**1. ábra:** A maximális lehetséges élettartam (MLÉ) kapcsolata a teljes antioxidáns kapacitással (TAK) (a), illetve a membránlipidek károsodásának mértékével (malondialdehid, MDA) (b), valamint az öregedés tengely (PC2) és a TAK közötti kapcsolat (c).

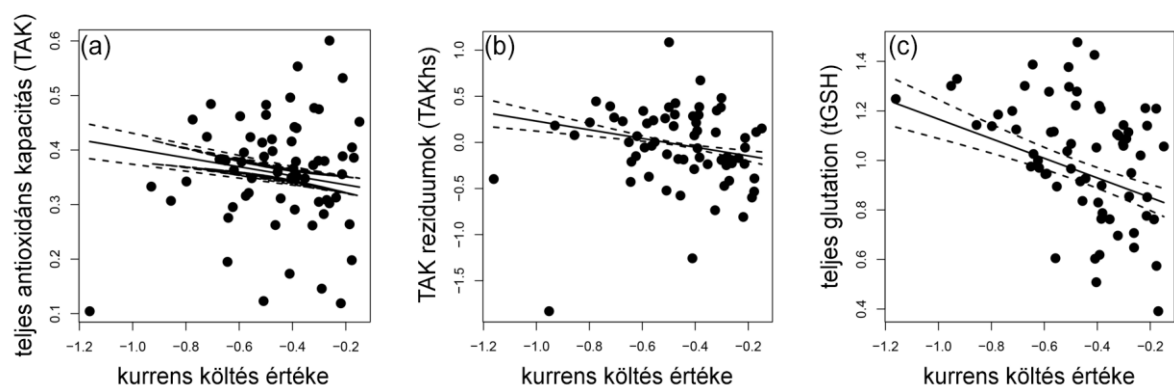
## Az életmenetek oxidatív stressz elmélete (ÉOSE)

A #3–7 modellek eredményei alapján (6. táblázat) azon fajok esetében, melyek a jelenlegi szaporodási erőfeszítésbe fektetnek több energiát (nagyobb a kurrens költség értéke) marginálisan alacsonyabb a teljes antioxidáns kapacitást (TAK; 2a ábra), szignifikánsan alacsonyabb a HS-tól független teljes antioxidáns kapacitás (TAKhs; 2b ábra) és a teljes glutation (tGSH; 2c ábra) koncentráció, illetve marginálisan szignifikánsan magasabb a húgysav (HS) koncentráció. A membránlipidek oxidatív károsodásának mértéke nem mutat összefüggést a kurrens költség értékével.

**6. táblázat:** A 2.1 predikció tesztelésére szolgáló #3–7 modellek (lásd 2. táblázat). A szignifikáns és marginálisan szignifikáns értékek félkövér karakterekkel vannak feltüntetve.

Modell	Függő változó	Magyarázó változó	$\beta \pm SE$	$t$	$P$
#3	TAK	testtömeg	$-0,2 \pm 0,02$	0,97	0,338
		HS	$0,30 \pm 0,12$	2,55	<b>0,014</b>
		MDA	$0,32 \pm 0,13$	2,41	<b>0,019</b>
		kurrens költség értéke	$-0,08 \pm 0,04$	1,87	<b>0,067</b>
#4	HS	testtömeg	$-0,01 \pm 0,03$	0,48	0,635
		TAS	$0,32 \pm 0,13$	2,48	<b>0,016</b>
		MDA	$0,69 \pm 0,12$	6,01	<b>&lt; 0,001</b>
		kurrens költség értéke	$0,09 \pm 0,05$	1,82	<b>0,073</b>
#5	TAKhs	Testtömeg	$-0,02 \pm 0,10$	0,15	0,883

		MDA	$1,01 \pm 0,39$	2,56	<b>0,013</b>
		kurrens költés értéke	$-0,47 \pm 0,20$	2,31	<b>0,024</b>
#6	tGSH	testtömeg	$0,19 \pm 0,06$	3,04	<b>0,004</b>
		kurrens költés értéke	$-0,40 \pm 0,12$	3,18	<b>0,002</b>
#7	MDA	testtömeg	$-0,05 \pm 0,03$	1,74	<b>0,087</b>
		TAK	$0,29 \pm 0,10$	2,72	<b>0,009</b>
		HS	$0,54 \pm 0,08$	6,53	<b>&lt; 0,001</b>



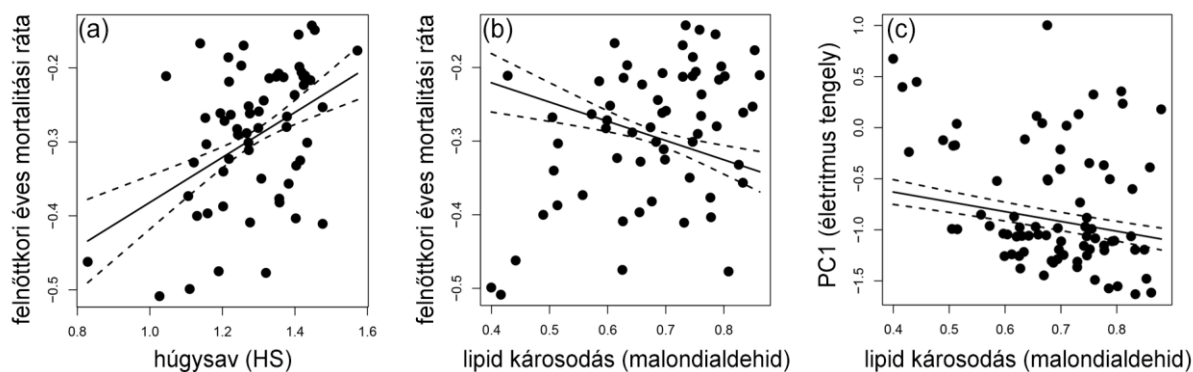
**2. ábra:** A teljes antioxidáns kapacitás (TAK) (a), a TAK reziduumok (vagyis húgysavtól független TAK, TAKhs) (b) és a teljes glutation (tGSH) koncentrációk (c) kapcsolata a kurrens költés értékével.

A #8–9 modellek alapján (7. táblázat) a felnőttkori éves mortalitási ráta értéke szignifikánsan nagyobb a magasabb húgysav (HS; 3a ábra) koncentrációval és marginálisan alacsonyabb a magas membránlipid károsodással (MDA; 3b ábra) bíró fajoknál. A gyors életmenetű fajoknál (alacsonyabb PC1 érték) magasabb a membránlipideket érintő oxidatív károsodás (MDA) mértéke (7. táblázat; 3c ábra). Olyan modelleket is futtattunk, melyekben egyéni életmenet jellegek kerültek be függő változónak (fejlődési időszak és fészekaljméret)

és hasonló eredményeket találtunk; például a magasabb átlagos fészekaljmérettel rendelkező fajok esetén alacsonyabb volt a TAK és a TAKhs (eredmények nincsenek bemutatva).

**7. táblázat:** A 2.2 és 2.3 predikciók (2. táblázat) tesztelésére szolgáló modellek. A szignifikáns és marginálisan szignifikáns értékek félkövér karakterekkel vannak feltüntetve.

Modell	Függő változó	Magyarázó változó	$\beta \pm SE$	$t$	$P$
#8	Felnőttkori mortalitás	Testtömeg	-0,1 ± 0,03	4,10	< <b>0,001</b>
		HS	0,31 ± 0,12	2,52	<b>0,015</b>
		MDA	-0,26 ± 0,14	1,88	<b>0,066</b>
#9	PC1 (életritmus tengely)	MDA	-0,96 ± 0,30	3,26	<b>0,002</b>



**3. ábra:** A felnőttkori mortalitási ráta kapcsolata a húgysavval (HS) (a) és a lipidek oxidatív károsodásával (malondialdehid, MDA) (b), valamint az életritmus tengely (PC1) összefüggése az MDA értékekkel (c).

## Tárgyalás

Bár a modellszervezeteken végzett öregedéssel kapcsolatos molekuláris genetikai vizsgálatok számos előnnyel bírnak, az általuk feltárt eredmények gyakran nem érvényesek vadon élő fajokra (Vleck, Haussmann & Vleck 2007; Flatt & Schmidt 2009; Salmon, Richardson & Pérez 2010; Csiszar *et al.* 2012; Selman *et al.* 2012). A vadon élő szervezeteken végzett összehasonlító vizsgálatok korrelatívak ugyan, de rajtuk keresztül lehetővé válik egy

szélesebb körű általánosítás (Ricklefs 2008, 2010; Holmes & Martin 2009; Cohen *et al.* 2010; Selman *et al.* 2012; Reichard 2016). Az élettartam hosszának fajok közötti varianciáját főképp egyedfejlődési különbségeknek tulajdonítják (Ricklefs 2010). Ezzel szemben a mi vizsgálatunk, mely nagyszámú vadon élő fajt foglal magába és adatainak elemzésekor kontrolláltunk a leszármazásra és a testtömegre, egyértelműen azt mutatja, hogy mind az élettartam, mind pedig az életmenet összefügg az oxidatív károsodás mértékével és/vagy az antioxidáns védekezéssel.

### Az öregedés oxidatív stressz elmélete (ÖOSE)

Vizsgálatunk elsőként mutat rá arra, hogy a hosszabb élettartamú fajoknál alacsonyabb a membránlipidek károsodásának mértéke. Ennek oka nagy valószínűséggel az, hogy membránjaik kisebb mértékben érintkeznek ROF-kal (Buttemer, Abele & Costantini 2010; Barja 2013; Delhay *et al.* 2016) és kevésbé sérülékenyek oxidatív támadásokkal szemben az alacsonyabb többszörösen telítetlen zsírsavlánc tartalmuk miatt (Pamplona 1996; Hulbert *et al.* 2007; Buttemer, Battam & Hulbert 2008; Barja 2013; Galván *et al.* 2015). Ez az eredményünk fontos jelentőséggel bír az ÖOSE-t tekintve a következő szempontok miatt.

A lipidek az oxidatív stressz egyik fontos célpontjai (Monaghan *et al.* 2009; Pamplona & Barja 2011). A mitokondriális membrán foszfolipidjeinek károsodása ezen sejtszervecske működésének zavarát eredményezheti a membránfluiditás és protongradiens módosítása révén, hozzájárulva így az öregedés folyamatához (Pamplona 2008; Paradies *et al.* 2010). A lipid peroxidáció eredményeként képződő karbonil vegyületek (például az MDA) hosszabb felezési idővel rendelkeznek, mint a ROF, könnyen átjutnak a sejtkompartimentumokat elválasztó membránokon, így képződésük helyétől távol is képesek makromolekulákat károsítani, komplexeket képezve bizonyos fehérjékkel (pl. ATP-szintáz és a Krebs-ciklus akonitáz nevű enzime), DNS-el és membrán lipidekkel (előrehaladott lipoxidációs és glikációs végtermékek (Esterbauer, Schaur & Zollner 1991; Hulbert 2008; Monaghan *et al.* 2009; Pamplona 2011b; Pamplona & Barja 2011; Sohal & Orr 2012; Ott *et al.* 2014; Kudryavtseva *et al.* 2014)). Ezzel összhangban rámutattak arra, hogy az élettartam negatív összefüggést mutat az előrehaladott glikációs végtermékek emelkedett szintjével (Sell *et al.* 1996), az MDA–lizin keresztkötések mennyiségével (Ruiz *et al.* 2005) és a mitokondriális DNS (Barja & Herrero 2000; Sanz, Pamplona & Barja 2006; Pamplona 2011a; Pamplona & Barja 2011), valamint fehérjék (Shi *et al.* 2010; Sohal & Orr 2012) károsodásának mértékével. Emlősök mitokondriális genomját összehasonlító vizsgálatban azt

találták, hogy a hosszú élettartamú fajok kevesebb metionint építenek be fehérjéikbe (Aledo *et al.* 2011), ami adaptív, ugyanis ez az oxidatív károsodásokra leginkább érzékeny aminosav (Pamplona & Barja 2011). A komparatív eredményekkel összhangban vannak genetikai manipulációs vizsgálatok is, melyekben a mitokondriális ROF képződési intenzitását és ezáltal az oxidatív károsodás mértékét befolyásolva növelni vagy csökkenteni tudták az élettartamot (áttekintő cikk: (Sastre 2003; Sedensky & Morgan 2006)). Például a *Caenorhabditis elegans* nevű fonálféregnél a glutation transzferázt kódoló gén fokozott expressziója gyorsítja a lipidek peroxidációs termékeinek eltávolítását és ezáltal növeli az élettartamot (Ayyadevara *et al.* 2005). Végezetül, az ÖOSE és más öregedést magyarázó mechanisztikus elméletek kapcsolatban állnak a lipid peroxidációs termékek révén, hiszen a lipid peroxidációs termékek és a szabályozó fehérjék közti keresztkötések számos olyan élettani folyamatot befolyásolhatnak, melyek befolyásolják az öregedést és az öregedéssel kapcsolatos betegségek megjelenését (részletes áttekintő cikk: (Esterbauer *et al.* 1991; Kudryavtseva *et al.* 2014)). Mindent összevetve az ÖOSE-t célszerű lenne tágabban értelmezni és molekuláris szintű károsodások elméletének nevezni (Gems & Doonan 2009b).

Az antioxidáns kapacitás és élettartam közötti kapcsolatot kereső összehasonlító vizsgálatok ellentmondásos eredményei és az antioxidáns génmanipulációs vizsgálatok eredményei miatt, kutatók arra következtettek, hogy az antioxidánsok aktivitása nem magyarázza az élettartam fajok közötti változatosságát (Sanz *et al.* 2006). Az eddigi vizsgálatok nagy része az ÖOSE predikciójával ellenkező negatív kapcsolatot talált az antioxidánsok szintje és az élettartam közt (áttekintő cikk: (Perez-Campo *et al.* 1998; Sanz *et al.* 2006; Barja 2013)). Ezt azzal magyarázták, hogy az antioxidánsok szintje evolúciósan az oxidatív stressz mértéke szerint alakul, és mivel a hosszú élettartamú fajok kisebb mértékű oxidatív stressznek vannak kitéve, nincs szükségük emelkedett szintű antioxidáns aktivitásra (Barja 1998, 2013; Cohen *et al.* 2008; Pamplona & Barja 2011). Ennek ellenére olyan vizsgálatok is vannak, ahol az ÖOSE predikciójával egyező pozitív kapcsolatot találtak az antioxidánsok szintje és az élettartam közt (áttekintő cikk: (Salmon *et al.* 2010)), főleg amikor az oxidatív foszforiláció nyomán keletkező ROF szintje elhanyagolható (Kirkwood & Kowald 2012) és úgy tűnik hosszú élettartamú fajoknál ez a helyzet áll fenn (Barja 2013). Életmenetben és élethosszban eltérő kagylófajokon végzett összehasonlító vizsgálatban ez utóbbi hipotézist támogató eredményeket találtak (áttekintő cikk: (Abele, Brey & Philipp 2009; Buttemer *et al.* 2010)). A mi vizsgálatunk is ezen vizsgálatok sorát erősíti, ugyanis azt találtuk, hogy élettanilag megterhelő körülmények közt, mint amilyen a szaporodás és az utódgondozás, a hosszabb élettartamú fajoknak magasabb a nem-enzimatis antioxidáns

szintje. A hosszú élettartamú fajoknál szelekciós előnyt jelenthetett egy afféle képesség megjelenése, amelynek köszönhetően a szaporodási eseményt megelőzően felerősítsék antioxidáns védekező rendszerüket, hogy kivédjék a testi sejtek károsodását és biztosítsák a jövőbeli fitnesszüket, valamint, hogy utódjaikat védelmezzék, ugyanis a szülők oxidatív állapota befolyásolja az utódok oxidatív állapotát, például az ivarsejtek károsodása révén (Velando, Torres & Alonso-Alvarez 2008; Costantini *et al.* 2010; Barja 2013; Blount *et al.* 2016). Az utódok efféle védelmének adaptív értéke abban rejlik, hogy az élet kezdeti stádiumaiban elszenvedett oxidatív stressz a későbbi életszakaszokban való rátermettséget jelentős mértékben csökkentheti (Hausmann & Heidinger 2015; Blount *et al.* 2016). A szülők saját testi sejtjeinek és az utódaik védelme a hosszú élettartamú fajoknál különösen fontos lehet, mert ezeknél a fajoknál egy utód létrehozása nagy költséggel jár és a késői életszakaszban való szaporodás fontos összetevője az élettartam alatti fitnessznek. Egy másik lehetséges magyarázat az antioxidánsok és élettartam pozitív irányú kapcsolatára a kondíciófüggő szelekció lehet, mely a populációkat a hosszú élettartam és a saját testi sejtek fenntartásának irányába hajtja, amikor a források bőségesek, de az utódonkénti ráfordítás nagyon magas (áttekintő cikk: (Reichard 2016)). Az ellentmondásos eredményeket ugyanakkor a vizsgálatok módszertani különbözősége is okozhatja: a legtöbb eddigi vizsgálat kis fajszámon alapult és nem volt kontrollálva a testtömegre és a leszármazásra (kivéve (Cohen *et al.* 2008)) vagy a mintázás nem kizárólag a szaporodási időszakban történt. Átlagosan alacsonyabb lehet az antioxidánsok alapszintje hosszú élettartamú fajoknál, ugyanakkor szaporodáskor ők mutatják a legnagyobb emelkedést az antioxidánsok szintjében önmaguk és utódaik védelmét szolgálva. Ez a fokozott antioxidáns válaszra vonatkozó hipotézis még bizonyítást kíván.

Az élettartam pozitív összefüggést mutatott a TAK-al, de a HS és GSH szinttel nem. Annak ellenére, hogy a HS-nak fontos szerepe lehet oxidációs termékekkel szembeni védelemben (Vleck *et al.* 2007), mint például a lipidek peroxidációs termékek semlegesítésében (Cohen *et al.* 2008), illetve az előrehaladott glikációs végtermékek kialakulásának megelőzésében (Holmes, Flückiger & Austad 2001), úgy tűnik sokkal inkább a fehérje katabolizmus intenzitását indikálja, minthogy antioxidáns szerepet töltsön be (Hörak & Cohen 2010). A mi vizsgálatunk a Cohen és mtsai. által végzett vizsgálat (Cohen *et al.* 2008) összhangban arra mutat rá, hogy a HS koncentráció nem magyarázza a fajok közti élettartambeli variabilitást. Azonban a HS szintje magasabb értékeket mutat olyan fajoknál, melyeknél magas a lipidek peroxidációs károsodása, ami alátámasztja lehetséges antioxidáns funkcióját. A GSH az egyik legfontosabb intracelluláris antioxidáns tiol csoportjai révén,



valamint a glutation-peroxidáz enzim kofaktora és a redox állapot (GSH:GSSG arány) egyik komponense (Bokov *et al.* 2004; Maher 2005; Sohal & Orr 2012). A glutation transzferázok aktivitásának növelése, melyek a GSH-val egyetemben a sejtek oxidánsoktól és lipid peroxidációtól való védelmét szolgálják, egy evolúciósan konzervatív adaptáció, amely az öregedést lassítja (McElwee *et al.* 2007). A glutamát-cisztein ligáz fokozott működése, mely a GSH szintézis egyik limitáló enzime, 50%-al képes növelni az ecetmuslicák (*Drosophila melanogaster*) élettartamát, feltehetően azért, hogy növeli a GSH:GSSG arányt (Rebrin & Sohal 2008). Ugyanakkor a GSH szint nem mutat lineáris növekedést az oxidatív stressz mértékének növekedésével, mivel a kis mértékű stresszhatások növelik, míg a jelentős mértékűek csökkentik a szintjét (Maher 2005), és akárcsak a HS néha a mitokondriális károsodások kivédése helyett további szabadgyökképződést idéz elő (Cadenas & Davies 2000; Dröge 2002). Ez utóbbiak magyarázhatják, hogy a GSH és HS szintje miért nem függött össze az élettartammal. Az sem elhanyagolható, hogy az antioxidáns rendszer egyes komponenseinek értelmezése sokkal nehezebb, mint a teljes antioxidáns kapacitásé (Monaghan *et al.* 2009).

#### Az életmenetek oxidatív stressz elmélete (ÉOSE)

Az oxidatív stressz akkor képes közvetíteni az életmenetek evolúcióját, ha a következő feltételek teljesülnek: (1) a fokozott reprodukív aktivitás növeli az oxidatív stressz mértékét, (2) az oxidatív stressz csökkenti a jövőbeni szaporodási sikert és/vagy túlélést, illetve (3) az oxidatív stressz magyarázza a fajok közötti életmenetbeli különbségeket. A következőkben ezt a három feltevést tekintem át. Annak ellenére, hogy a szaporodás élettanilag az egyik legmegterhelőbb életesemény (Speakman 2008), meglepően kevés bizonyíték van arra, hogy oxidatív költséggel járna (Monaghan *et al.* 2009; Metcalfe & Monaghan 2013). Ez részben annak tudható be, hogy az eddigi vizsgálatok nagy részében nem mérték a ROF termelődésének és az oxidatív károsodásnak a mértékét, hanem csak az antioxidánsokat mérték (Monaghan *et al.* 2009). Az antioxidáns védekezésről azt feltételezik, hogy kevés energetikai költséggel jár és emiatt nem von el sok energiát a szaporodástól (Blount *et al.* 2016). Azonban olyan zebra-pinty ( *Taeniopygia guttata* ), melyek több fészekaljat költenek ki életük során és több utódot nevelnek fel fészekaljként csak az antioxidáns rendszerük rovására képesek mindezt megtenni (Alonso-Alvarez *et al.* 2004, 2006; Wiersma *et al.* 2004). A *Thamnophis elegans* szalagoskígyó faj hosszú élettartamú ökotípusánál hatékonyabb a mitokondriális elektron transzport (azaz kevesebb ROF képződik), a DNS károsodást javító mechanizmusok és az antioxidáns védekezés, mint a rövid élettartamú ökotípusnál (Robert &

Bronikowski 2010). A mi eredményeik szintén azt mutatják, hogy a jelenlegi szaporodási sikerbe való befektetés (magas kurrens költség érték) kevésbé hatékony antioxidáns védekező rendszerrel jár együtt. A szaporodás antioxidáns költségével szemben egy nemrégiben Selman és mtsai. által készített áttekintő vizsgálat (Selman *et al.* 2012) rámutatott arra, hogy a legtöbb vizsgálat nem talált összefüggést a reprodukzív erőfeszítés és a lipidek peroxidatív károsodása közt, ezért azt a következtetést vonták le, hogy az oxidatív stressz nem játszik kulcsszerepet az életmenet jellegek közt fennálló trade-off viszonyok közvetítésében. Vizsgálatunkban mi sem találtunk magasabb peroxidatív károsodást a magasabb kurrens költség értékkel rendelkező fajoknál. Azonban néhány fajon belüli vizsgálat alátámasztja az ÉOSE-t. Olyan tojó füsti fecskék (*Hirundo rustica*), melyeknek fészekalj mérete mesterségesen növelve volt, magasabb peroxidatív lipidkárosodást szenvedtek el (egy másik vizsgálatunk még le nem közölt eredményei). A kísérletileg fokozott peterakás ecetmuslicáknál alacsonyabb oxidációval szembeni rezisztenciát von maga után (áttekintő cikk: (Dowling & Simmons 2009)). Fontos felismerés ugyanakkor, hogy zebrapintyeknél evolúciós kapcsolat van a ROF-kal szembeni rezisztencia és az élettartam alatti szaporodási események száma közt, melyet egy genetikai korreláció alapján sikerült kimutatni (Kim *et al.* 2010).

Kevés bizonyíték van arra, hogy az oxidatív stressz negatív hatással lenne a jövőbeni szaporodási sikerre. A GSH szintjének kísérleti úton való csökkentése szaporodást megelőzően tojó kanáriknál (*Serinus canaria*) növelte az oxidatív stresszt, késleltette a szaporodási eseményt és a csökkentette a fészekalj méretét (Costantini *et al.* 2016). Ami az oxidatív stressz túlélésre gyakorolt hatását illeti, havasi sarlósfecskéknél (*Tachymarptis melba*) egy pozitív szelekció van az oxidatív stresszel szemben rezisztens egyedek irányába, ugyanis ők hosszabb élettartamúak (Bize *et al.* 2014). Soay birkáknál (*Ovis aries*) az utódok túlélési sikere a szuperoxid diszmutáz aktivitással pozitív kapcsolatban áll, ellenben nem függ össze az MDA szintjével vagy a nem-enzimatikus antioxidánsok kapacitásával (Christensen *et al.* 2016). Ezzel ellentétben egy amerikai madárfajokon végzett összehasonlító vizsgálatban azt találták, hogy az antioxidáns szint negatívan függ össze a túlélési sikerrel (Cohen *et al.* 2008). Vizsgálatunkban szintén azt találtuk, hogy a magasabb HS koncentrációval és alacsonyabb MDA szinttel rendelkező fajok magasabb mortalitási rátával jellemezhetőek. Az éves mortalitási/túlélési ráta az átlagos élettartam mutatója és ez úgy tűnik sokkal inkább külső környezeti tényezők függvénye, kevésbé a belső környezet, mint például az oxidatív állapot függvénye (Flatt & Schmidt 2009; Barja 2013).

Meglepően kevés vizsgálat kereste az életmenetek lassú–gyors tengelye és az oxidatív állapot közti összefüggést nagyszámú vadon élő fajnál. Amit eddig tudunk az, hogy az

intenzív fiatalkori növekedési ráta növeli az MDA szintet és negatívan hat a GSH koncentrációra és ennek bioszintézisére (Metcalfé & Alonso-Alvarez 2010). A mi összehasonlító vizsgálatunk az első, amely rámutat arra, hogy a gyors életmenet (magasabb PC1 érték) magas lipid peroxidációval függ össze. Azonban azt találtuk, hogy a GSH és más antioxidánsok nem függnék össze az életmenetek ritmusával annak ellenére, hogy GSH az életmenet jellegek közti trade-off egyik magyarázó tényezőjeként van számon tartva (Isaksson *et al.* 2011). Hogyan befolyásolhatja az oxidatív stressz az életmenet stratégiák evolúcióját? A klasszikus forrásallokációs trade-off (Y-modell) elve alapján a gyors életmenettel jellemezhető fajok magas reprodukív rátája a testi sejtek védelmének és károsodásaik kijavításának rovására fokozható, ami végső soron növeli a mortalitás esélyét (Kirkwood & Austad 2000). Azonban számos eredmény ellentmond az Y-modellnek (lásd részletesen (Leroi 2001; Isaksson *et al.* 2011; Speakman & Garratt 2014)). Elképzelhető, hogy a szaporodási erőfeszítés nem von el energiát a testi sejtek fenntartásától, hanem a szaporodás közvetlen élettani következményei és antagonistá pleiotrópia révén fejt ki negatív hatását az élettartamra (Flatt & Schmidt 2009; Flatt 2011). Feltehetően az oxidatív stressz indukálása és a testi sejtek károsodása azok az élettani következmények, melyek révén a szaporodási erőfeszítés kifejti az élettartamra gyakorolt negatív hatását (Leroi 2001; Speakman 2008; Monaghan *et al.* 2009; Flatt & Schmidt 2009; Isaksson *et al.* 2011). A ROF-kal kapcsolatban egy érdekes és keveset emlegetett tény azok antagonistá pleiotróp hatása. Számos enzim képez ROF-t, mert ezek szükségesek olyan jelátviteli utak aktiválásában, melyek beindítják a szaporodást vagy kiváltják a reprodukív aktivitást, azonban ezzel párhuzamosan a túlsúlyban levő ROF, melyek nem kerülnek semlegesítésre káros hatásokat eredményeznek (Metcalfé & Alonso-Alvarez 2010; Flatt 2011). Emellett az inzulin/IGF-1 (I-es típusú inzulinszerű növekedési faktor) jelátviteli út egy másik fontos antagonistá pleiotróp jelátviteli út, mely serkenti a reprodukív aktivitást és csökkenti az élettartamot, miközben oxidatív stresszt idéz elő (Tatar, Bartke & Antebi 2003).

## Köszönetnyilvánítás

A vizsgálat kivitelezésben több személy és támogató is közreműködött, akiknek köszönettel tartozunk. A terepmunkákban Vincze Orsolya, Veres-Szászka Judit, Sándor Krisztina, Csiszár Mónika, Osváth Gergely, Marton Attila, Bărbos Lőrinc, Pap Péter László és Fülöp Attila vettek részt. A laboratóriumi mérések során Pătraș Laura, Sesarman Alina és Banciu Manuela segítettek. Vincze Orsolya és Vágási István-Csongor vettek részt az adatok elemzésében. A mintavételekhez szükséges engedélyeket a Román Tudományos Akadémia és a kolozsvári

Alexandru Borza Botanikus Kert vezetősége szolgáltatta. Támogatóink a következők voltak: Román Oktatási és Kutatási Minisztérium (CNCSIS PN II. RU TE 291/2010), Nemzeti Kiválóság Program Erdős Pál posztdoktori ösztöndíja, Magyar Tudományos Akadémia Posztdoktori Kutatói Programja és Bolyai János ösztöndíja, Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal posztdoktori ösztöndíja, a Kolozsvári Magyar Egyetemi Intézet Apáthy István Szakkollégiumának ösztöndíja.

## Irodalomjegyzék

- Abele, D., Brey, T. & Philipp, E. (2009) Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. *Experimental Gerontology*, **44**, 307–315.
- Aledo, J.C., Li, Y., de Magalhães, J.P., Ruíz-Camacho, M. & Pérez-Claros, J.A. (2011) Mitochondrially encoded methionine is inversely related to longevity in mammals. *Aging Cell*, **10**, 198–207.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O. & Sorci, G. (2006) An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, **60**, 1913–1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. & Sorci, G. (2004) Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, **7**, 363–368.
- Ayyadevara, S., Engle, M.R., Singh, S.P., Dandapat, A., Lichti, C.F., Benes, H., Shmookler Reis, R.J., Liebau, E. & Zimniak, P. (2005) Lifespan and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* are increased by expression of glutathione transferases capable of metabolizing the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Aging Cell*, **4**, 257–271.
- Barja, G. (1998) Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **854**, 224–238.
- Barja, G. (2007) Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Research*, **10**, 215–224.
- Barja, G. (2013) Updating the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: An Integrated View, Key Aspects, and Confounding Concepts. *Antioxidants & Redox Signaling*, **19**, 1420–1445.

- Barja, G. & Herrero, A. (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **30**, 235–243.
- Barja, G. & Herrero, A. (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB Journal*, **14**, 312–318.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, **78**, 547–581.
- Bize, P., Cotting, S., Devevey, G., van Rooyen, J., Lalubin, F., Glaizot, O. & Christe, P. (2014) Senescence in cell oxidative status in two bird species with contrasting life expectancy. *Oecologia*, **174**, 1097–1105.
- Blount, J.D., Vitikainen, E.I.K., Stott, I. & Cant, M.A. (2016) Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews*, **91**, 483–497.
- Bókony, V., Lendvai, Á.Z., Liker, A., Angelier, F., Wingfield, J.C. & Chastel, O. (2009) Stress Response and the Value of Reproduction: Are Birds Prudent Parents? *The American Naturalist*, **173**, 589–598.
- Bokov, A., Chaudhuri, A. & Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, **125**, 811–826.
- Buttemer, W.A., Abele, D. & Costantini, D. (2010) From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology*, **24**, 971–983.
- Buttemer, W. a, Battam, H. & Hulbert, a J. (2008) Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biology letters*, **4**, 351–354.
- Cadenas, E. & Davies, K.J. a. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 222–230.
- Christensen, L.L., Selman, C., Blount, J.D., Pilkington, J.G., Watt, K.A., Pemberton, J.M., Reid, J.M. & Nussey, D.H. (2016) Marker-dependent associations among oxidative stress, growth and survival during early life in a wild mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **283**, 20161407.
- Cohen, A., Klasing, K. & Ricklefs, R. (2007) Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **147**, 110–121.

- Cohen, A.A., de Magalhães, J.P. & Gohil, K. (2010) Ecological, biomedical and epidemiological approaches to understanding oxidative balance and ageing: what they can teach each other. *Functional Ecology*, **24**, 997–1006.
- Cohen, A.A., Mauck, R.A., Wheelwright, N.T., Huntington, C.E. & McGraw, K.J. (2009) Complexity in relationships between antioxidants and individual life-history parameters in a seabird and a songbird. *Oikos*, **118**, 1854–1861.
- Cohen, A.A., McGraw, K.J., Wiersma, P., Williams, J.B., Robinson, W.D., Robinson, T.R., Brawn, J.D. & Ricklefs, R.E. (2008) Interspecific Associations between Circulating Antioxidant Levels and Life- History Variation in Birds. *The American Naturalist*, **172**, 178–193.
- Costantini, D. (2008) Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters*, 1238–1251.
- Costantini, D., Casasole, G., Abdelgawad, H., Asard, H. & Eens, M. (2016) Experimental evidence that oxidative stress influences reproductive decisions (ed W Hopkins). *Functional Ecology*, **30**, 1169–1174.
- Costantini, D., Rowe, M., Butler, M.W. & McGraw, K.J. (2010) From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. *Functional Ecology*, **24**, 950–959.
- Csiszar, A., Podlutzky, A., Podlutskaya, N., Sonntag, W.E., Merlin, S.Z., Philipp, E.E.R., Doyle, K., Davila, A., Recchia, F.A., Ballabh, P., Pinto, J.T. & Ungvari, Z. (2012) Testing the Oxidative Stress Hypothesis of Aging in Primate Fibroblasts: Is There a Correlation Between Species Longevity and Cellular ROS Production? *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **67**, 841–852.
- Delhaye, J., Salamin, N., Roulin, A., Criscuolo, F., Bize, P. & Christe, P. (2016) Interspecific correlation between red blood cell mitochondrial ROS production, cardiolipin content and longevity in birds. *AGE*, **38**, 433–443.
- Dowling, D.K. & Simmons, L.W. (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **276**, 1737–1745.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82**, 47–95.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-

- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **11**, 81–128.
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**, 248–253.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000a) biology of ageing. , **408**, 239–247.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. (2000b) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239–247.
- Flatt, T. (2011) Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, **46**, 369–375.
- Flatt, T. & Promislow, D.E.L. (2007) Still pondering an age-old question. *Science*, **318**, 1255–1256.
- Flatt, T. & Schmidt, P.S. (2009) Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1790**, 951–962.
- Galván, I. & Alonso-Alvarez, C. (2008) An Intracellular Antioxidant Determines the Expression of a Melanin-Based Signal in a Bird (ed SF Brosnan). *PLoS ONE*, **3**, e3335.
- Galván, I., Naudí, A., Erritzøe, J., Møller, A.P., Barja, G. & Pamplona, R. (2015) Long lifespans have evolved with long and monounsaturated fatty acids in birds. *Evolution*, **69**, 2776–2784.
- Gavrilov, L.A. & Gavrilova, N.S. (2002) Evolutionary Theories of Aging and Longevity. *The Scientific World JOURNAL*, **2**, 339–356.
- Gems, D. & Doonan, R. (2009a) Antioxidant defense and aging in *C. elegans*. *Cell Cycle*, **8**, 1–7.
- Gems, D. & Doonan, R. (2009b) Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: Is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle*, **8**, 1681–1687.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C. & Yuri, T. (2008) A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, **320**, 1763–1768.
- Hausmann, M.F. & Heidinger, B.J. (2015) Telomere dynamics may link stress exposure and

- ageing across generations. *Biology Letters*, **11**, 20150396.
- Hausmann, M.F. & Treidel, L.A. (2015) *Senescence: Integrating Biology from Cradle to the Grave* (eds LB Martin, CK Ghalambor, and HA Woods). book, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Holmes, D.J., Flückiger, R. & Austad, S.N. (2001) Comparative biology of aging in birds: an update. *Experimental Gerontology*, **36**, 869–883.
- Holmes, D. & Martin, K. (2009) A bird's-eye view of aging: what's in it for ornithologists? *Auk*, **126**, 1–23.
- Hörak, P. & Cohen, A. (2010) How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues. *Functional Ecology*, **24**, 960–970.
- Horak, P., Sild, E., Soomets, U., Sepp, T. & Kilk, K. (2010) Oxidative stress and information content of black and yellow plumage coloration: an experiment with greenfinches. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 2225–2233.
- Hulbert, A.J. (2008) Explaining longevity of different animals: is membrane fatty acid composition the missing link? *AGE*, **30**, 89–97.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W.A. (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*, **87**, 1175–1213.
- Isaksson, C., Sheldon, B.C. & Uller, T. (2011) The Challenges of Integrating Oxidative Stress into Life-history Biology. *BioScience*, **61**, 194–202.
- Jetz, W., Thomas, G.H., Joy, J.B., Hartmann, K. & Mooers, A.O. (2012) The global diversity of birds in space and time. *Nature*, **491**, 444–448.
- Jones, O.R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C.G., Schaible, R., Casper, B.B., Dahlgren, J.P., Ehrlén, J., García, M.B., Menges, E.S., Quintana-Ascencio, P.F., Caswell, H., Baudisch, A. & Vaupel, J.W. (2014) Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*, **505**, 169–173.
- Karatas, F., Karatepe, M. & Baysar, A. (2002) Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, **311**, 76–79.
- Kim, S.-Y., Velando, A., Sorci, G. & Alonso-Alvarez, C. (2010) Genetic correlation between resistance to oxidative stress and reproductive life span in a bird species. *Evolution*, **64**,



852–857.

- Kirkwood, T.B. & Austad, S.N. (2000) Why do we age? *Nature*, **408**, 233–238.
- Kirkwood, T.B.L. & Kowald, A. (2012) The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive. *BioEssays*, **34**, 692–700.
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A., Alekseev, B.Y., Kardymon, O.L., Sadritdinova, A.F., Fedorova, M.S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A.D., Moskalev, A.A. & Snezhkina, A. V. (2014) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, **7**, 44879.
- Lambert, A.J., Buckingham, J.A., Boysen, H.M. & Brand, M.D. (2010) Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia*. *Aging Cell*, **9**, 78–91.
- Leroi, A.M. (2001) Molecular signals versus the Loi de Balancement. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 24–29.
- de Magalhães, J.P., Costa, J. (2009) A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1770–1774.
- de Magalhães, J.P. & Church, G. (2006) Cells discover fire: Employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Experimental Gerontology*, **41**, 1–10.
- de Magalhães, J.P. d., Costa, J. & Church, G.M. (2007) An Analysis of the Relationship Between Metabolism, Developmental Schedules, and Longevity Using Phylogenetic Independent Contrasts. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **62**, 149–160.
- Maher, P. (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, **4**, 288–314.
- McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Thomas, J.H., Patel, D.S., Selman, C., Withers, D.J., Thornton, J.M., Partridge, L. & Gems, D. (2007) Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biology*, **8**, R132.
- Metcalf, N.B. & Alonso-Alvarez, C. (2010) Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, **24**, 984–996.
- Metcalf, N.B. & Monaghan, P. (2013) Does reproduction cause oxidative stress? An open

- question. *Trends in Ecology & Evolution*, **28**, 347–350.
- Møller, A.P. (2006) Sociality, age at first reproduction and senescence: comparative analyses of birds. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 682–689.
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B. & Torres, R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, **12**, 75–92.
- Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G. & Pamplona, R. (2011) Regulation of membrane unsaturation as antioxidant adaptive mechanism in long-lived animal species. *Free Radicals and Antioxidants*, **1**, 3–12.
- Noguera, J.C., Lores, M., Alonso-Álvarez, C. & Velando, A. (2011) Thrifty development: early-life diet restriction reduces oxidative damage during later growth. *Functional Ecology*, **25**, 1144–1153.
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T. & Simm, A. (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, **2**, 411–429.
- Page, M. (1999) The Maximum Likelihood Approach to Reconstructing Ancestral Character States of Discrete Characters on Phylogenies. *Systematic Biology*, **48**, 612–622.
- Pamplona, R. (1996) Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanisms of Ageing and Development*, **86**, 53–66.
- Pamplona, R. (2008) Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1777**, 1249–1262.
- Pamplona, R. (2011a) Mitochondrial DNA Damage and Animal Longevity: Insights from Comparative Studies. *Journal of Aging Research*, **2011**, 1–9.
- Pamplona, R. (2011b) Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-Biological Interactions*, **192**, 14–20.
- Pamplona, R. & Barja, G. (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology*, **12**, 409–435.
- Pamplona, R. & Costantini, D. (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **301**, R843–R863.

- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. & Ruggiero, F.M. (2010) Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **48**, 1286–1295.
- Pérez, V.I., Buffenstein, R., Masamsetti, V., Leonard, S., Salmon, A.B., Mele, J., Andziak, B., Yang, T., Edrey, Y., Friguier, B., Ward, W., Richardson, A. & Chaudhuri, A. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106**, 3059–3064.
- Perez-Campo, R., López-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C. & Barja, G. (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *Journal of Comparative Physiology B*, **168**, 149–158.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. & R Core Team. (2015) *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-120*. <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R Core Team. (2015) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. book, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rebrin, I. & Sohal, R.S. (2008) Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1545–1552.
- Reichard, M. (2016) Evolutionary ecology of aging: time to reconcile field and laboratory research. *Ecology and Evolution*, **6**, 2988–3000.
- Revell, L.J. (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 217–223.
- Rice-Evans, C. & Miller, N.J. (1994) [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt D*, pp. 279–293.
- Ricklefs, R.E. (2008) The evolution of senescence from a comparative perspective. *Functional Ecology*, **22**, 379–392.
- Ricklefs, R.E. (2010) Insights from comparative analyses of aging in birds and mammals. *Aging Cell*, **9**, 273–284.
- Del Rio, D., Stewart, A.J. & Pellegrini, N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **15**, 316–328.

- Robert, K.A. & Bronikowski, A.M. (2010) Evolution of senescence in nature: physiological evolution in populations of garter snake with divergent life histories. *American Naturalist*, **175**, 147–159.
- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Barja, G. & Pamplona, R. (2005) Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development*, **126**, 1106–1114.
- Salmon, A.B., Richardson, A. & Pérez, V.I. (2010) Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology and Medicine*, **48**, 642–655.
- Sanz, A., Pamplona, R. & Barja, G. (2006) Is the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging Intact? *Antioxidants & Redox Signaling*, **8**, 582–599.
- Sastre, J. (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **35**, 1–8.
- Sedensky, M. & Morgan, P.G. (2006) Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Experimental Gerontology*, **41**, 237–245.
- Sell, D.R., Lane, M.A., Johnson, W.A., Masoro, E.J., Mock, O.B., Reiser, K.M., Fogarty, J.F., Cutler, R.G., Ingram, D.K., Roth, G.S. & Monnier, V.M. (1996) Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 485–490.
- Selman, C., Blount, J.D., Nussey, D.H. & Speakman, J.R. (2012) Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in Ecology & Evolution*, **27**, 570–577.
- Shi, Y., Buffenstein, R., Pulliam, D.A. & Van Remmen, H. (2010) Comparative Studies of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Aging. *Integrative and Comparative Biology*, **50**, 869–879.
- Snow, D., Perrins, C.M. & Cramp, S. (1998) *The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM*.
- Sohal, R.S. & Orr, W.C. (2012) The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **52**, 539–555.
- Speakman, J.R. (2005a) Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 1717–1730.

- Speakman, J.R. (2005b) Correlations between physiology and lifespan – two widely ignored problems with comparative studies. *Aging Cell*, **4**, 167–175.
- Speakman, J.R. (2008) The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **363**, 375–398.
- Speakman, J.R. & Garratt, M. (2014) Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, **36**, 93–106.
- Speakman, J.R. & Selman, C. (2011) The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *BioEssays*, **33**, 255–259.
- Stearns, S.C. (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology*, **3**, 259–268.
- Sukumaran, J. & Holder, M.T. (2010) DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics*, **26**, 1569–1571.
- Swanson, E.M. & Dantzer, B. (2014) Insulin-like growth factor-1 is associated with life-history variation across Mammalia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20132458–20132458.
- Szekely, T., Liker, A., Freckleton, R.P., Fichtel, C. & Kappeler, P.M. (2014) Sex-biased survival predicts adult sex ratio variation in wild birds. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **281**, 20140342.
- Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*, **299**, 1346–1351.
- Vágási, C.I., Vincze, O., Pătraș, L., Osváth, G., Marton, A., Bărbos, L., Sol, D. & Pap, P.L. (2016) Large-brained birds suffer less oxidative damage. *Journal of Evolutionary Biology*, **29**, 1968–1976.
- Velando, A., Torres, R. & Alonso-Alvarez, C. (2008) Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in germ line and mate choice. *BioEssays*, **30**, 1212–1219.
- Vleck, C.M., Haussmann, M.F. & Vleck, D. (2007) Avian senescence: underlying mechanisms. *Journal of Ornithology*, **148**, 611–624.
- Voituron, Y., de Fraipont, M., Issartel, J., Guillaume, O. & Clobert, J. (2011) Extreme lifespan of the human fish (*Proteus anguinus*): a challenge for ageing mechanisms. *Biology Letters*, **7**, 105–107.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J.R. & Verhulst, S. (2004) Birds sacrifice oxidative

protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**, S360--S363.

Zera, A.J. & Harshman, L.G. (2001) The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **32**, 95–126.