



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

dr hab. Michał S. Wojciechowski, prof. UMK  
Zakład Zoologii i Ekologii Kręgowców  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Lwowska 1  
87-100 Toruń

Toruń, 2020-05-23

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Stanisława Burego pt. Energy expenditure, oxidative stress and DNA damage in response to seasonality of thermal environment in natricine snakes**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr. Stanisława Burego w Instytucie Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Cichonia oraz dr Edyty Sadowskiej. Trzon rozprawy stanowią trzy prace, które zostały opublikowane w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jedna praca została opublikowana w *The Science of Nature*, druga w *Physiological and Biochemical Zoology*, zaś trzecia w *Journal of Thermal Biology*. Wszystkie te czasopisma są dobrze rozpoznawalne wśród badaczy zajmujących się fizjologią ekologiczną zwierząt. Prace zostały opatrzone wspólnym wstępem oraz krótkim podsumowaniem wszystkich trzech prac. Ponadto, w skład przedstawionej mi do oceny rozprawy wchodzi streszczenia – w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia autorów prac.

Zgodnie z oświadczeniami przedstawionymi w dokumentacji mgr. Bury był wiodącym autorem badań oraz prac, które powstały na ich podstawie. Istotnym z punktu widzenia oceny Doktoranta jest to, że badania stanowiące podstawę rozprawy były finansowane z grantu Preludium Narodowego Centrum Nauki, którego był kierownikiem. Wskazuje to, że Doktorant posiadał nie tylko umiejętność prowadzenia badań naukowych oraz raportowania ich wyników, ale również aplikowania z sukcesem o finansowanie badań. Należy tu wspomnieć, że mgr. Bury uzyskał również drugi grant ze środków NCN w konkursie Etiuda. Szkoda tylko, że informacje te nie zostały zamieszczone ani w pracach (podany jest tylko numer grantu, a nie kto był kierownikiem), ani w rozprawie lub materiałach przesłanych do oceny. W mojej ocenie są to bardzo istotne informacje w ocenie pracy Doktoranta.



Tematyka prac wchodzących w skład rozprawy w głównej mierze dotyczy kosztów metabolizmu tlenowego oraz elastyczności fenotypowej metabolizmu tlenowego i ochrony przed stresem oksydacyjnym. Badania zostały przeprowadzone na ektotermicznym gadzie, zaskrońcu *Natrix natrix*. Biorąc pod uwagę, że jest to przedstawiciel zwierząt pochodzących z tej samej linii ewolucyjnej co endotermiczne ptaki i ssaki, można się spodziewać, że wyniki przedstawionych w rozprawie badań będą miały istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw ewolucji wysokiego tempa metabolizmu w tej linii rozwojowej. Tytuł rozprawy doktorskiej wskazuje, że badane zjawiska odnoszą się do zmian sezonowych, jednakże w przedstawionych pracach nie znajdują odniesienia do sezonowości zmian środowiska ani do sezonowych zmian w fizjologii zaskrońców. Badania zostały przeprowadzone na osobnikach odłowionych z terenu późną wiosną, które były utrzymywane w stałych warunkach środowiska termicznego lub były aklimowane do różnych temperatur, jednak zawsze utrzymywane były w stałych warunkach 12h fotoperiodu. Nie można wykluczyć, że badane zwierzęta wykazywały zmiany w fizjologii związane z działaniem endogennego zegara sezonowego, jednak trudno w świetle przeprowadzonych eksperymentów mówić o sezonowości. Niezależnie od tego uważam, że przedstawione prace dostarczają solidną porcję informacji istotnych z punktu widzenia zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw zmienności i elastyczności tempa metabolizmu.

Poniżej postaram się przedstawić ocenę poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy. Zaczę jednak od dwóch uwag krytycznych dotyczącej wszystkich artykułów. W żadnej z prac Doktorant nie sformułował jasnego pytania, na które chciał odpowiedzieć, ani hipotez które zamierzał przetestować. We wszystkich pracach zostały przedstawione często alternatywne przewidywania dotyczące możliwych wyników, jednak bez odniesienia *a priori* do testowanych mechanizmów. To powodowało, że podczas lektury prac musiałem często wracać do przewidywań, a następnie dociekać pytania, na które chciał odpowiedzieć doktorant. Uwaga ta nie wpływa w żaden sposób na moją ocenę pracy, jednak zwracam uwagę Doktorantowi, że jego prace nie zawsze będą czytane przez specjalistów w wąskiej dziedzinie, którą się zajmuje. Sformułowanie jasnego pytania oraz hipotezy może znacznie ułatwić przekaz i dotarcie do czytelników, a co ważniejsze, może pomóc w zrozumieniu istotnego przekazu płynącego z prac. Druga uwaga dotyczy zaprezentowanych w pracach wykresów. Bez wątplenia są one ładne i przejrzyste, jednak ich użyteczność jest wątpliwa. Na żadnym z zaprezentowanych wykresów nie ma znaczników podziałki osi. W efekcie nie można z wykresów odczytać dokładnych wartości poszczególnych punktów danych. Zaskakuje mnie, że w żadnym z czasopism, w których opublikowano prace ani redaktorzy, ani recenzenci nie zwrócili na to uwagi. Są pewne reguły, których należy przestrzegać, a jedną z nich są te dotyczące



prezentacji wykresów. Mają one umożliwić nie tylko zobrazowanie wzorców, ale przede wszystkim przedstawić wartości liczbowe zmierzonych lub analizowanych zmiennych.

**Bury, S., Bury, A., Sadowska, E. T., Cichoń, M., Bauchinger, U. (2019). More than just the numbers — contrasting response of snake erythrocytes to thermal acclimation. *The Science of Nature*, 106(24); DOI: 10.1007/s00114-019-1617-x**

Celem pierwszej pracy była ocena zmian w parametrach hematologicznych zaskrońców w odpowiedzi na aklimację do wysokiej i niskiej temperatury otoczenia. Aklimacja do różnych temperatur była bezpośrednim sposobem na wywołanie długoterminowej zmiany tempa metabolizmu badanych węży. Po sześciomiesięcznej aklimacji pobrano krew i zanalizowano hematokryt, liczbę erytrocytów, stężenie hemoglobiny oraz porównano wielkość erytrocytów we krwi węży eksponowanych na różne temperatury otoczenia. W efekcie aklimacji zaobserwowano zmniejszenie hematokrytu oraz pozostałych mierzonych parametrów hematologicznych, jak również wielkości erytrocytów. Na tej podstawie Doktorant wnioskuje, iż obserwowane zmiany skutkowały zmniejszeniem lepkości krwi, a zmniejszenie wielkości erytrocytów mogło prowadzić do ich większej efektywności podczas zarówno wiązania tlenu do hemoglobiny, jak i jego oddawania w tkankach docelowych. Wynik ten opisuje jako paradoksalny, gdyż można było spodziewać się, iż wywołane podwyższoną temperaturą otoczenia wyższe tempo metabolizmu winno raczej prowadzić do zwiększenia zawartości erytrocytów, a tym samym hemoglobiny i możliwości transportowania tlenu do tkanek. Najważniejszym wnioskiem płynącym z tej pracy jest wskazanie, że wysokie tempo metabolizmu, a tym samym wysokie zapotrzebowanie na tlen może wymagać zmian prowadzących raczej do zmniejszenia lepkości krwi, niż do zwiększenia zawartości hemoglobiny, a tym samym ilości opakowujących ją erytrocytów. W podsumowaniu Doktorant sugeruje, że zmiany w zawartości erytrocytów, a tym samym stężeniu hemoglobiny, w odpowiedzi na podwyższone tempo metabolizmu mogą odbywać się kosztem zmniejszonej zdolności (wydolności) transportowania tlenu. Wydaje mi się jednak, że ten wniosek został sformułowany na wyrost. Na zdolność wiązania tlenu w istotny sposób wpływa m.in. środowisko chemiczne krwi. Choćby zmiany zakwaszenia mogą w sposób znaczny wpływać na powinowactwo hemoglobiny do tlenu. Autorzy nie badali w pracy zmian w charakterystyce biochemicznej krwi, nie analizowali krzywej dysocjacji hemoglobiny w zależności od temperatury aklimacji. W związku z tym, uważam, że ten wniosek należy traktować z pewną ostrożnością. Z pewnością jednak wyniki zaprezentowanych badań wskazują na nowe pytania, na które warto szukać odpowiedzi w dalszych badaniach zmian w parametrach krwi w odpowiedzi na zmiany w zapotrzebowaniu na tlen.



**Bury, S., Cierniak, A., Jakóbiak, J., Sadowska, E. T., Cichoń, M., & Bauchinger, U. (2020). Cellular Turnover: A Potential Metabolic Rate-Driven Mechanism to Mitigate Accumulation of DNA Damage. *Physiological and Biochemical Zoology*, 93(2), 90-96. DOI: 10.1086/707506**

Celem kolejnej pracy było zbadanie zależności pomiędzy międzyosobniczą zmiennością tempa metabolizmu obserwowaną u zaskrońców a parametrami strasu oksydacyjnego i obrony przed nim. Badano również zawartość frakcji młodych erytrocytów we krwi jako wskaźnik wymiany (obrotu lub odnowy) tkanek. Znów, tak jak i w poprzedniej pracy Autorzy nie formułują wyraźnej hipotezy tłumaczącej możliwą zależność pomiędzy badanymi parametrami. Są za to liczne szczegółowe przewidywania, które są wsparte wynikami wcześniejszych prac. Najważniejsze wyniki tej pracy to stwierdzenie pozytywnej zależności pomiędzy standardowym tempem metabolizmu a stopniem uszkodzeń oksydacyjnych w osoczu krwi, ujemnej zależności pomiędzy tempem metabolizmu a obroną antyoksydacyjną w erytrocytach, i co najważniejsze, stwierdzenie pozytywnej zależności pomiędzy standardowym tempem metabolizmu a proporcją młodocianych erytrocytów. Wskazuje to, jak sugerują Autorzy, że wysokie tempo wymiany (turnover) erytrocytów jest jednym z istotniejszych mechanizmów usuwania uszkodzeń DNA będących skutkiem stresu oksydacyjnego związanego z wysokim standardowym tempem metabolizmu.

**Bury, S., Cichoń, M., Bauchinger, U., Sadowska, E. T. (2018). High oxidative stress despite low energy metabolism and vice versa: Insights through temperature acclimation in an ectotherm. *Journal of Thermal Biology*, 78, 36-41; DOI: 10.1016/j.jtherbio.2018.08.003**

W ostatniej pracy wchodzącej w skład rozprawy Doktorant badał zależność pomiędzy długotrwałą zmianą tempa metabolizmu wywołaną ekspozycją na różne warunki termiczne a wskaźnikami statusu oksydacyjnego. Tu muszę odnieść się do pewnego problemu, jaki napotkałem podczas czytania szczególnie tej pracy. Doktorant ekspozował zaskrońce na wysoką i niską temperaturę otoczenia. Następnie, po sześciu miesiącach zmierzył ich tempo metabolizmu w temperaturze aklimacji. Na tej podstawie wnioskował, że aklimacja do wysokiej temperatury otoczenia spowodowała ponad sześciokrotny wzrost tempa metabolizmu. W moim zrozumieniu takie stwierdzenie jest mylące. Wynika to najprawdopodobniej z mojego przyzwyczajenia do pracy ze zwierzętami endotermicznymi. W tych badaniach efekty aklimacji na procesy fizjologiczne określamy mierząc osobniki w identycznych warunkach, np. w temperaturze neutralnej. Na tej podstawie określamy wywołane aklimacją zmiany podstawowego tempa metabolizmu. Zajęło mi trochę czasu aby zrozumieć, co Doktorant miał na myśli



mówiąc o wpływie aklimacji na tempo metabolizmu zaskrońców. Mianowicie, że węże eksponowane na wysoką temperaturę otoczenia podczas aklimacji utrzymywały wysokie tempo metabolizmu. Ostatecznie jednak doszedłem do wyjaśnienia mojego problemu i dalsza lektura pracy nie sprawiała problemów. Ostatecznie wyniki pracy wskazują, że wywołane eksperymentalnie wysokie tempo metabolizmu korelowało z niskim stopniem uszkodzeń wskutek stresu oksydacyjnego (zarówno w osoczu jak i w jądrowym DNA), ale nie było związane ze zmianami w poziomie obrony przed stresem oksydacyjnym. Doktorant sugeruje, iż podniesione tempo metabolizmu koreluje z efektywnymi mechanizmami naprawy uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym, czego nie obserwujemy w warunkach wywołanego niską temperaturą niskiego tempa metabolizmu. Sugeruje to, że możliwość utrzymania wysokiego tempa metabolizmu wymaga uruchomienia, bądź ewolucji, wysoce sprawnych mechanizmów naprawczych, które niekoniecznie są efektywne w warunkach niskiego tempa przemian życiowych.

Uważam, że przedstawione w rozprawie prace wnoszą dużo istotnych informacji dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw elastyczności procesów fizjologicznych oraz ewolucji wysokiego tempa metabolizmu. Wydaje mi się, że najważniejszym wnioskiem płynącym z tych badań jest wskazanie (choć niewypowiedziane w pracy), że ewolucja procesów mogących powodować negatywne skutki w organizmie (tu: wysokie tempo metabolizmu mogące powodować większe tempo produkcji reaktywnych form tlenu) była skorelowana z ewolucją odpowiednich mechanizmów zabezpieczających przed tymi skutkami (tu np.: wysokie tempo usuwania uszkodzeń poprzez wymianę uszkodzonych komórek oraz usuwanie uszkodzeń).

Podsumowując uważam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 "Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki". Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie biologii oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Niniejszym wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Stanisława Burego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Wojciechowski

dr hab. Michał S. Wojciechowski