

dr hab. Paweł Brzęk

Białystok, 19.5.2020

Katedra Ekologii Ewolucyjnej i Fizjologicznej

Wydział Biologii

Uniwersytet w Białymstoku

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

przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Cichonia i dr Edyty Sadowskiej w Instytucie Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tematem rozprawy doktorskiej mgr Stanisława Burego są zagadnienia z pogranicza ekologii fizjologicznej i ewolucyjnej. Można powiedzieć że głównym problemem badawczym jest tu fizjologiczne i molekularne podłoże zmienności cech historii życia, czyli bardzo ważne – i wciąż niewystarczająco poznane zagadnienie. Praca dotyczy tematów pozornie dość odległych od siebie jak wielkość erytrocytów i stres oksydacyjny, jednak wszystkie wiążą się ze zmiennością tempa metabolizmu u ektotermów (zarówno zmiennością międzyosobniczą, jak i powodowaną zmianami temperatury otoczenia). Zostało to dobrze podkreślone przez doktoranta w ‘*General introduction*’. Z drugiej strony, wymyślenie jednego tytułu który trafnie streszczałby wszystkie problemy poruszane w rozprawie na pewno nie było łatwym zadaniem. Mam kilka uwag do obecnego tytułu: pomija on zagadnienia omawiane w pierwszym artykule (‘*energy expenditure*’ to jednak nie rozmiary erytrocytów); być może za bardzo podkreśla sezonowość (nie wiadomo na ile badania w ogóle dotyczą sezonowości, patrz uwagi niżej); określenie obiektu badań jako ‘*natricine snakes*’ sugeruje raczej porównanie różnych gatunków zaskrońcowatych. Przyznaję jednak że nie wiem czy potrafiłbym zaproponować lepszy tytuł – z zachowaniem jego rozsądnej długości.

Rozprawa składa się z trzech artykułów, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, z dodatkiem przygotowanych przez doktoranta krótkiego wprowadzenia oraz końcowej dyskusji. W streszczeniu rozprawy trudno zrozumieć wnioski wynikające z artykułu numer 3. Autor używa tu chyba zbyt dużych skrótów myślowych i nie zrozumiałem tej części streszczenia dopóki nie przeczytałem samego artykułu. W całej rozprawie – może gdzieś na początku? – bardzo brakuje mi krótkiego opisu badanego gatunku, przede wszystkim

uzasadnienia wybranych temperatur w artykułach 1 i 3 (18 °C i 32 °C). W opisie metod w pierwszym artykule można przeczytać: *'Both temperatures lie within the thermal activity range for grass snake (Eckstein 1993) which is considered the range of temperatures that snakes choose in nature and can perform normally'*. Słowo *'choose'* sugeruje że zaskrońce aktywnie wybierają miejsca o takiej temperaturze, a jest to dziwne w przypadku ektoterma i dwóch temperatur różniących się aż o 14 °C (i rzeczywiście ostatni artykuł powtarza tę informację ale dodaje że zaskrońce preferują temperatury 24-27 °C). Być może chodzi tu o to jak należy rozumieć słowo *'choose'*, ale cały problem jest bardzo ważny dla interpretacji wyników opisanych eksperymentów, a niestety cytowana praca Ecksteina jest w języku niemieckim co ogranicza możliwość samodzielnego poszukania tych materiałów. Najważniejsze jest jednak to że nigdzie nie jest wyjaśnione jak wybór tych dwóch temperatur ma się do 'sezonowości' która została podkreślona już w tytule rozprawy, a która kojarzy się raczej ze zmiennością temperatury otoczenia w ciągu roku niż z zakresem tolerowanych temperatur otoczenia.

Poniżej będę pisał w liczbie mnogiej o 'autorach' poszczególnych prac, ale już tutaj zaznaczam że pomysł badań, a przede wszystkim interpretacja wyników były przede wszystkim dziełem doktoranta.

Przez całą rozprawę przewija się różnica we wpływie temperatury otoczenia na tempo metabolizmu u endotermów i ektotermów – kiedy temperatura otoczenia spada, tempo metabolizmu rośnie w pierwszej grupie i maleje w drugiej. Ponieważ tempo metabolizmu zależy od ilości tlenu dostarczanego do tkanek, można spodziewać się podobnych różnic we wpływie temperatury otoczenia na zdolność krwi do przenoszenia tlenu. Tak jest w przypadku ssaków i ryb, natomiast dostępne (nieliczne) dane sugerują że u zauropsydów sytuacja jest dokładnie odwrotna: wartości parametrów opisujących zdolność krwi do przenoszenia tlenu maleją w zimnie u endotermów i rosną u ektotermów. Ten nieoczekiwany wniosek jest jednak oparty na dosłownie pojedynczych obserwacjach, i celem pierwszego artykułu było dokładne zbadanie wpływu temperatury otoczenia na parametry związane ze zdolnością krwi do transportu tlenu u ektotermicznego zauropsyda - zaskrońca. Wężę aklimowane do 32 °C miały niższy hematokryt niż aklimowane do 18 °C, a także mniej hemoglobiny oraz mniej erytrocytów o mniejszych rozmiarach. Ta ostatnia obserwacja jest najważniejszym, nowym odkryciem dla nauki - według autorów mniejsza ilość hemoglobiny w wyższej temperaturze otoczenia jest rekompensowana przez mniejsze rozmiary erytrocytów co z jednej strony ułatwia dyfuzję tlenu, a z drugiej zmniejsza lepkość krwi co jest szczególnie ważne gdyż wysoka temperatura zwiększa tempo krążenia krwi. Kiedy temperatura otoczenia spada, zmniejsza się także intensywność krążenia krwi co wymaga większej liczby erytrocytów aby dostarczyć tlen do komórek. Z kolei większe rozmiary erytrocytów nie stanowią dużego problemu w niższej temperaturze i mogą być opłacalne choćby z powodu niższych kosztów energetycznych (*'lower self-maintenance'*). Wydaje się więc że zauropsydy paradoksalnie obniżają parametry związane ze zdolnością przenoszenia tlenu przez krew w sytuacji wzrostu zapotrzebowania na tlen – ektotermy (wężę) w

wysokiej, endotermny (ptaki) w niskiej temperaturze otoczenia. Autorzy sugerują że jest to spowodowane posiadaniem jądrzastych erytrocytów, które nie dopasowują się dobrze do wielkości naczyń kapilarnych przy wyższym tempie krążenia krwi. To ‘dopasowanie’ wielkości erytrocytów do tempa krążenia krwi jest ciekawą obserwacją która jest ważna dla poznania możliwych przyczyn powstania erytrocytów bez jąder u ssaków.

Mogę napisać że jest to mój ulubiony artykuł z całej rozprawy. Pokazuje on że nawet bardzo prosty eksperyment, z niewielką próbą i stosunkowo prostymi metodami może przynieść ciekawe i ważne wyniki. Jediną moją uwagą może być bardzo długi czas aklimacji – aż 6 miesięcy. Z jednej strony może to być konieczne u ektotermów z tak szczególną fizjologią żerowania (bardzo rzadkie posiłki), gdyż sama częstotliwość pobierania pokarmu może mieć istotny wpływ na zmiany parametrów fizjologicznych (co zauważono w artykule 3). Z drugiej strony oznacza to że właściwe badania wypadły w zimie, kiedy zaskrońce hibernują. Czy węże te nie mają jakiegoś ‘zegara wewnętrznego’ który mógł wpłynąć na uzyskane wyniki?

Kolejne dwa artykuły dotyczą związku między poziomem metabolizmu i stresem oksydacyjnym (dalej OS). W drugim artykule autorzy zbadali związek między poziomem metabolizmu standardowego SMR u zaskrońców aklimowanych do 26 °C i szeregiem parametrów krwi związanych ze stresem oksydacyjnym. Indeks poziomu właściwości antyoksydacyjnych osocza krwi (OXY) nie zmieniał się wraz z poziomem SMR. Według autorów jest to powód jednoczesnej pozytywnej korelacji między SMR a poziomem uszkodzeń powodowanych OS (indeks dROM), gdyż prawdopodobny wzrost produkcji wolnych rodników nie był równoważony zmianami zdolności do ich neutralizacji. Z kolei poziom uszkodzeń DNA w erytrocytach nie zmieniał się wraz ze wzrostem poziomu SMR pomimo spadku poziomu właściwości antyoksydacyjnych erytrocytów. Według autorów jest to spowodowane większym tempem wymiany erytrocytów (istotna korelacja z SMR), co powoduje usuwanie uszkodzonego DNA.

Interpretacja wyników badań związanych ze stresem oksydacyjnym jest niełatwa gdyż jego poziom zależy od szeregu czynników, a ich jednoczesne zbadanie jest praktycznie niemożliwe dla ekologów ewolucyjnych. Autorzy dobrze wybrnęli z tego zadania. Głównym wnioskiem artykułu jest to że zamiast mechanizmów które mają neutralizować wolne rodniki ważniejsze mogą być mechanizmy naprawcze (*‘repair and removal’*) związane np. z szybszą wymianą ‘uszkodzonych’ komórek. Trochę dziwne jest że autorzy nie zastanowili się nad pytaniem czy szybsza wymiana komórek jest energetycznie tańsza niż mechanizmy antyoksydacyjne. Z drugiej strony, autorzy zauważają słusznie że główną zaletą usuwania uszkodzeń może być jego wyższa skuteczność niż neutralizacja wolnych rodników .

Mam kilka uwag do tego artykułu. Porównanie wyników analiz pokazanych na rysunkach 1a i 1c (SMR nie wpływa na obronę bo $P=0.081$ ale wpływa na uszkodzenia bo $P=0.024$) przywodzi na myśl obecne dyskusje o 'tyraniu wartości P' w interpretacji wyników eksperymentów (choć osobiście bronię tej tyranii). Trzeba jednak przyznać że jeśli poziom uszkodzeń rośnie POMIMO jednoczesnego prawie-wzrostu poziomu obrony to taki wynik tylko jeszcze mocniej podkreśla pozytywny związek między SMR a poziomem uszkodzeń. Autorzy piszą '*No study to date has assessed maintenance metabolism (standard metabolic rate [SMR]) in relationship to damage and defense against damage accumulation*'. Domyślam się chodzi tu także o 'metaboliczne koszty utrzymania' u endotermów (powyżej cytowane są badania na ssakach i ptakach), a prace o OS zostały już opublikowane dla myszy selekcyjowanych na wysoki i niski poziom BMR... Autorzy zaznaczają także na początku opisu metod że do eksperymentu zostały wybrane tylko te samice które w danym roku nie przystąpiły do rozrodu. Czy nie oznacza to że badane zwierzęta to przede wszystkim nielosowa próba samic będących w gorszej kondycji? (samice stanowią prawie 2/3 badanych zwierząt). Aż się prosi o poszerzenie eksperymentu o kolejny czynnik: samice po rozrodzie i bez rozrodu!

Ostatni artykuł dotyczy porównania parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym u zaskrońców aklimowanych do 18 °C and 32 °C (te same osobniki które zostały już opisane w artykule 1). Zwierzęta aklimowane do 32 °C miały 7 krotnie większy poziom SMR, miały one jednak niższy poziom uszkodzeń powodowanych przez OS, pomimo tego samego poziomu właściwości antyoksydacyjnych osocza krwi. Autorzy podają kilka możliwych wyjaśnień tak dziwnego wyniku, z czego jedna to większy poziom napraw uszkodzeń (analogicznie do sytuacji znalezionej w poprzednim artykule). Ciekawą konkluzją jest to że jeśli niższa temperatura powoduje wzrost OS, to może to być jedna z przyczyn negatywnego wpływu niższej temperatury otoczenia na dostosowanie ektotermów (bo jednocześnie powoduje ona niższy poziom metabolizmu i wyższy poziom OS). Węże w 32 °C miały większą konsumpcję pokarmu, co z jednej strony mogło powodować wzrost poziomu OS (jak zauważają autorzy), jednak z drugiej strony mogło zapewnić większe inwestycje w mechanizmy zmniejszające poziom OS (inne niż to co mierzy indeks OXY). Dlatego nie wiem czy można jednoznacznie napisać że '*high SMR may allow snakes to better cope with oxidative stress*' gdyż nie można stwierdzić jednoznacznie czy powodem był '*high SMR*' czy '*high food intake*' (nawet jeśli wynika on z wyższego SMR to jednak nie jest to ten sam czynnik).

Ostatni rozdział rozprawy to '*General discussion*'. Wydaje mi się że celem doktoranta było tutaj nie tylko podsumowanie uzyskanych wyników, ale także próba znalezienia ich implikacji dla nauki, innych niż te omówione już w samych artykułach. Mam jednak wrażenie że wszystkie oczywiste i dające się dobrze uzasadnić wnioski jakie można wyciągnąć z uzyskanych wyników znalazły się już w dyskusjach opublikowanych artykułów. Na pewno takie ogólne podsumowanie nie jest łatwe w przypadku cechy tak plastycznej i zależnej od tak wielu czynników jak stres

oksydacyjny. Na początku uderzył mnie kontrast między podsumowaniem jednej z części dyskusji: *'the oxidative stress may not necessarily be involved in a history trade-offs, at least in ectotherm'*, i ostatnimi słowami artykułu 3: *'Our study suggests oxidative stress is an additional negative effect of low temperatures for ectotherm life histories'*. Chodzi tu zapewne o to że zmiany tempa metabolizmu i temperatury otoczenia mogą mieć inny wpływ na uszkodzenia DNA niż mają na inne związki. Trochę trudniej jest mi zrozumieć stwierdzenie *'high temperature seems to override the positive impact of high metabolic rate on the oxidative damage load and results in lower amounts of damage'* – nie wiem czy nie jest to zbyt duży skrót myślowy. Nie jestem do końca przekonany teorią że endotermia u ssaków powstała jako sposób na obniżenie OS powodowanego niską temperaturę otoczenia z jednoczesnym zastosowaniem białek rozprzegających UCP w celu uniknięcia kosztów zwiększonego OS spowodowanego wyższym tempem metabolizmu niezbędnym dla endotermii (trochę skomplikowane ale mam nadzieję że dobrze zrozumiałem). Zaproponowanie bardziej dokładnego scenariusza zmian stresu oksydacyjnego podczas ewolucji endotermii byłoby zdecydowanie bardziej przekonujące niż obecne proste stwierdzenie. Nie wiem też czy nie należało się tu raczej zastanowić nad znaczeniem uzyskanych wyników dla powstania endotermii u ptaków (bliższych krewnych zaskrońca), nie u ssaków. Ostatni rozdział dotyczy zmian klimatycznych. Doktorant w swojej rozprawie opisał plastyczność fizjologii zaskrońców w odpowiedzi na zmiany temperatury otoczenia, ale nie rozumiem jak to się wiąże z problemem *'global warming'* – było już wiadomo że zaskrońce dają sobie radę w obu temperaturach, teraz wiemy też jakie mechanizmy fizjologiczne są za to odpowiedzialne. Szczególnie w tym momencie brakuje mi jednak informacji o ekologii badanego gatunku w naturze, średnich temperaturach w areale jego występowania w różnych porach roku itp. Mówiąc inaczej – samo zbadanie reakcji zwierząt w dwóch różnych temperaturach nie wiąże się w jasny sposób ani z *'sezonowością'* z tytułu rozprawy, ani z globalnym ociepleniem. Lepsze byłoby może nawet porównanie w jednym eksperymencie reakcji zaskrońców na temperatury tolerowane (18 °C i 32 °C) z parametrami fizjologicznymi w temperaturze preferowanej (ok. 26 °C). Niestety, żaden z eksperymentów nie obejmował wszystkich tych trzech temperaturę jednocześnie. To że ektotermy zwiększają konsumpcję pokarmu w wyższej temperaturze otoczenia jest tak oczywistym wynikiem że nie umieszczalbym tego w ogóle w podsumowaniu. Znowu najbardziej podoba mi się dyskusja dotycząca znaczenia wielkości erytrocytów. Chcę tylko dodać że wyniki pierwszego artykułu mogłyby być punktem wyjścia do dyskusji jak opisana zmienność parametrów związanych z transportem tlenu ma się do założeń *'metabolic theory of ecology'*.

Pomimo kilku krytycznych uwag o ostatnim rozdziale ogólna ocena rozprawy jest na pewno pozytywna. O jej jakości zresztą najlepiej świadczy fakt że została ona już podobnie oceniona przez recenzentów trzech opublikowanych artykułów. Oświadczenia współautorów wskazują że doktorant miał największy wkład w przygotowanie każdego z nich, a także sam zdobył środki finansowe na przeprowadzenie badań. Uzyskane wyniki mogą być dobrze cytowane, w szczególności te dotyczące wpływu temperatury otoczenia na zmiany wielkości erytrocytów oraz

potencjalnie dużej roli usuwania skutków OS (nawet poprzez szybszą wymianę komórek) zamiast inwestycji w zwalczanie wolnych rodników. Warto zauważyć że większość cytowanej literatury to pozycje z ostatniej dekady, co pokazuje że rozprawa dotyczy aktualnych problemów badawczych (a jednocześnie okazało się że pewien ważny problem nie był badany od 1975 roku). Trzeba wreszcie wspomnieć że trzy prace jakie wchodzi w zakres rozprawy nie są jedynymi publikacjami doktoranta.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UJ o dopuszczenie Pana mgr Stanisława Burego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę że wszystkie prace wchodzące z zakres rozprawy zostały już opublikowane, wnioskuję także o wyróżnienie recenzowanej pracy.


dr hab. Paweł Brzęk