

Prof. dr hab. Marek Konarzewski  
Wydział Biologii  
Uniwersytet w Białymstoku  
15-950 Białystok  
Ul. Ciołkowskiego 1J

Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Małgorzaty Lipowskiej

pt. „**Stress response characteristics in bank voles from a multidirectional selection experiment**”

Zgodnie z listem przewodnim Zastępcy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. dr hab. Magdaleny Chadzińskiej, recenzję przedłożonej mi rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Lipowskiej sporządziłem na podstawie zapisów Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Już na wstępie z przyjemnością stwierdzam, że przedłożona rozprawa w całości wypełnia wymogi ustawowe: na jej treść składają się trzy pierwszo-autorskie publikacje Doktorantki poświęcone ważnemu dla nauki problemowi badawczemu. Tym nie mniej szereg szczegółowych wątków dysertacji wzbudziło moje wątpliwości i pytania które sprecyzuję w dalszej części recenzji.

#### Ocena naukowego znaczenia tematyki rozprawy

Za naukowy cel rozprawy doktorskiej mgr Małgorzata Lipowska obrała wyjaśnienie mechanizmów adaptacji do stresu środowiskowego, dokonujących się poprzez zmiany aktywności osi przysadkowo-podwzgórzowo-nadnerczowej (HPA). Cel ten sam w sobie nie jest nowatorski- mechanizmom funkcjonowania osi HPA poświęcono wiele klasycznych badań fizjologicznych, a ich wyniki weszły do podręcznikowego kanonu fizjologii zwierząt. Warto jednak zauważyć, że zakres dobrze ugruntowanej wiedzy o funkcjonowaniu osi HPA wciąż nie wyczerpuje fundamentalnego zagadnienia-- funkcjonowania osi HPA w sytuacjach wielowymiarowego, permanentnego stresu, na jaki narażone są zwierzęta w warunkach codziennej aktywności. W szczególności wciąż bardzo mało wiemy o mechanizmach ewolucji adaptacyjnej odpowiedzi na stres, które wpływały na uformowanie się zakresu, siły i czasu trwania reakcji na bodziec stresowy zawiadywany przez oś HPA. Z racji doniosłości naukowej

oraz niedostatecznego rozpoznania badawczego, obranie za cel rozprawy ilościowych aspektów aktywności osi HPA, w kontekście ich ewolucyjnego uwarunkowania uznaję za jak najbardziej uzasadniony i istotny z poznawczego punktu widzenia.

## 2. Szczegółowa analiza osiągniętych rezultatów i poprawności wnioskowania

Przywołany wyżej naukowy cel rozprawy był przez Doktorantkę realizowany za pomocą szeregu eksperymentów przeprowadzonych z użyciem jedynego w swoim rodzaju modelu zwierzęcego ewolucyjnej radiacji adaptacyjnej, składającego się z replikowanych linii nornicy rudej, wielokierunkowo selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu tlenowego wymuszonego pływaniami (linie A), efektywnego trawienia pokarmu roślinnego (linie H), efektywnych zachowań drapieżnych (linie P) oraz nieselekcionowanych linii kontrolnych (linie C). Model ten stanowi unikalny w skali światowej poligon doświadczalny, pozwalający na odtworzenie w warunkach laboratoryjnych mechanizmów ewolucji cech biologicznych trudnych, bądź wręcz niemożliwych do wychwycenia w warunkach naturalnych. Jednakże jak każdy model badawczy ma on swoje ograniczenia, które sprawiły, że moim zdaniem nie do końca przystawał on do ambitnych celów sformułowanych w rozprawie. Efektem tego jest stosunkowo niewielka liczba 'twardych' konkluzji, wieńczących publikacje składające się na recenzowaną dysertację. Szczegółowo odniosę się do nich niżej, dyskutując tezy poszczególnych artykułów. Tu natomiast zwrócę uwagę na cztery ogólniejsze aspekty skutkujące osłabieniem wnioskowania przedstawionego w recenzowanej rozprawie.

1. Silnym założeniem, które legło u podstaw eksperymentów składających się na dysertację było istnienie związku między kierunkami selekcji A, H i P oraz czynnikami stresowymi, które aktywują oś HPA. Założenie to w żadnej z części rozprawy nie zostało w przekonujący sposób sprecyzowane i udokumentowane. Kluczowym czynnikiem jest tu oczekiwany kierunek zmian ewolucyjnych: w przypadku selekcji A i H spodziewałbym się zmniejszenia pobudliwości osi HPA względem linii kontrolnych. Takie też założenie poczyniła Autorka dysertacji. Jednakże w przypadku linii P, podobnie jak Doktorantka, nie potrafiłbym jednoznacznie wskazać oczekiwanego kierunku zmian. Ta niejednoznaczność stała się jednym z kilku czynników osłabiających wnioskowanie. Doktorantka najwyraźniej zdawała sobie z nich sprawę, gdyż na przykład w publikacji Lipowska i in. 2020 w niezwykle ostrożny (moim zdaniem zbyt ostrożny) sposób powstrzymała się od formułowania hipotez szczegółowych. Warto

zauważyć, że najprostsze rozwiązanie, polegające na pominięciu w konkretnych porównaniach linii, co do których nie sformułowano specyficznych hipotez (na przykład linii P) powodowało znaczącą redukcję liczby stopni swobody, a tym samym ograniczyło moc testów statystycznych (publikacje Lipowska i in. 2019, 2022). Stąd też zapewne w części porównań podjęto decyzję o zachowaniu normic linii P, pomimo związanych z tym niepewności wnioskowania (artykuł Lipowska i in. 2020).

2. Cechy obrane jako miary aktywności osi HPA są w najlepszym razie tylko pośrednio skorelowane z cechami bezpośrednio podlegającymi sztucznej selekcji. Wyniki badań relacjonowanych w rozprawie wyraźnie wskazują, że korelacje te były słabe, bądź bardzo słabe, co bezpośrednio skutkowało znaczącą liczbą wyników negatywnych (tzn. braku istotności statystycznej). Biorąc pod uwagę informacje dostępne w literaturze przedmiotu, ale nie uwzględnione w rozprawie (o czym niżej), zastanawiam się nad zasadnością przesłanek leżących u podstaw wyboru użytego modelu zwierzęcego, który okazał się częściowo nieprzystający do obranych celów badań. W tym zakresie wydaje mi się, że na przykład, nikłą odpowiedź linii A na stosowane stresory dałoby się przewidzieć na podstawie wyników uzyskanych przez innych autorów.
3. Pilotowe wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę ujawniły niską osobniczą powtarzalność cech charakteryzujących funkcjonowanie osi HPA. Znajomość tych wyników przed przeprowadzeniem zasadniczych eksperymentów powinna być przyczynkiem do skorygowania planów części z nich, co umożliwiłoby uzyskanie bardziej jednoznacznych rezultatów.
4. Szkoda, że Doktorantka poprzestała na stosunkowo zgrubnych pomiarach całkowitego poziomu glukokortykoidów w osoczu oraz ich metabolitów w odchodach i nie zdołała przeprowadzić dogłębniejszych badań molekularnych, dotyczących np., zróżnicowania ekspresji receptorów wybranych hormonów osi HPA. Być może wyniki takich analiz uściśliłyby i umocniły wnioskowanie przedstawione w dysertacji.

Na zasadniczą część rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Lipowskiej składają się trzy artykuły opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych. Odniosę się do nich zgodnie z kolejnością zamieszczenia w drukowanej wersji dysertacji, poczynając od artykułu Lipowska i in. (2019) „Stress coping and evolution of aerobic exercise performance: corticosterone levels in voles from selection experiments” ogłoszonej w *Journal of*

*Experimental Biology*. Dokonano w nim porównania poziomu kortykosteronu oraz chwilowego tempa metabolizmu tlenowego ( $V_{O_2, swim}$ ) u zwierząt z linii A i linii kontrolnej C poddanych testowi pływania. Nie wykryto znamienych statystycznie różnic między liniami A i C, a jedynie trendy w dynamice zmian tempa metabolizmu związane z bazowym poziomem kortykosteronu oraz jego wartością mierzoną po teście pływania. W streszczeniu artykułu Autorzy skonkludowali: 'Thus, the experiment did not provide evidence that evolution of increased aerobic performance is facilitated by the modification of glucocorticoid levels. The results, however, do not exclude the possibility that other aspects of the HPA axis function evolved in response to the selection'. Trudno się w kontekście uzyskanych wyników z tą konkluzją nie zgodzić. Jednakże trudno jest też uznać ją za rozstrzygającą. W tym miejscu wróć do wątpliwości sformułowanej wyżej: nie jestem pewien, czy wybrany model zwierzęcy pozwala na jednoznaczne wykazanie (bądź zanegowanie) związku między stresem (i powodowanymi nim zmianami funkcji osi HPA) oraz zastosowaną procedurą pomiaru  $V_{O_2, swim}$ . W istocie, w żadnej pracy wchodzącej w skład rozprawy (jak również w innych, pokrewnych publikacjach) nie znalazłem wyników badań oceny odczuwania procedury pływania jako stresora przez poddane jej zwierzęta. Można więc dopuścić, że test  $V_{O_2, swim}$  nie był przez nie percepowany jako stres powodujący znaczący wyrzut glukokortykoidów. Za to zapewne była nim towarzysząca pływaniu procedura pobierania krwi, która mogła skutecznie zatrzeć, bądź zmodyfikować potencjalnie stresogenny wpływ pływania na funkcjonowanie osi HPA.

Literatura poświęcona percepcji stresu jest bogata, co niestety nie znalazło odbicia w recenzowanej rozprawie. Przywołam tu prace zespołu profesora Bogdana Sadowskiego opierające się na modelu zwierzęcym pod wieloma względami zbliżonym do tego, zastosowanego przy selekcji linii A. Na model prof. Sadowskiego składają się dwie linie myszy laboratoryjnych selekcjonowanych na niski i wysoki poziom analgezji postresowej (*Swim-Stress Induced Analgesia, SSIA*) wywoływanej pływaniem. Istnienie SSIA indukowanego pływaniem jest doskonale udokumentowane i powinno być wzięte pod uwagę przy projektowaniu eksperymentów mających na celu badanie potencjalnie stresogennego efektu pływania. Brak zauważenia wyników prac zespołu prof. Sadowskiego w recenzowanej rozprawie jest więc dla mnie niezrozumiały. Są wśród nich publikacje relacjonujące wpływ selekcji na poziom kortykosteronu (Juszczak i in. 2008, *Brain, Behavior and Immunity*) oraz liczne prace relacjonujące prostą metodologię bezpośredniego pomiaru SSIA z użyciem tzw.

testu rozgrzanej płytki. Być może zastosowanie takiego testu rozwiązałyby część wątpliwości interpretacyjnych pozostających po lekturze pracy Lipowska i in. (2019).

Następną pozycją składającą się na recenzowaną dysertację jest artykuł Lipowska i in. 2022 'Evolution of an increased performance under acute challenge does not exacerbate vulnerability to chronic stress' ogłoszony w *Scientific Reports*. Sformułowano w niej precyzyjną hipotezę wskazującą na kierunek spodziewanej różnicy między zwierzętami z linii A i C poddanymi chronicznemu stresowi o niskiej intensywności (CMS). Hipoteza ta nie znalazła potwierdzenia w uzyskanych wynikach. W odróżnieniu do eksperymentów przedstawionych w publikacji Lipowska i in. 2019, tym razem nie mogło być to związane z trudnymi do skontrolowania ubocznymi, stresogennymi efektami procedury pobierania krwi, gdyż wykonano pomiary pochodnych glukokortykoidów w odchodach. Ponadto, przed zasadniczą częścią eksperymentów, zwierzęta były habituowane do obecności i dotyku eksperymentatora. Zatem negatywny wynik nie był efektem zatarcia ewentualnych różnic przez niedostateczne uwzględnienie czynników ubocznych. Tym bardziej brak zróżnicowania reakcji na CMS między badanymi liniami pozostaje trudny do interpretacji, szczególnie w kontekście wyników badań przeprowadzonych w innym eksperymencie selekcyjnym (Tuoma i in. 2008, *Psychoneuroendocrinology*, praca jest cytowana w dysertacji), którego autorzy wykazali szybką odpowiedź selekcyjną (włączając w to znaczące zróżnicowanie poziomu testosteronu) u myszy laboratoryjnych poddanych 15-minutowemu unieruchomieniu.

Za najciekawszy wynik relacjonowanej publikacji uważam wykazanie obniżenia poziomu glukokortykoidów (czyli zapewne poziomu postrzeganego stresu) będącego następstwem zastosowania CMS. Choć zjawisko to wystąpiło w obu analizowanych liniach nornic, a zatem było niezależne od efektu selekcji, to jego zademonstrowanie należy uznać za dobrze udokumentowane. Zgadzam się z końcową konkluzją Autorów publikacji— obniżenie poziomu stresu wywołwane CMS może świadczyć o przystosowaniu zwierząt do ciągłego tolerowania czynników stresowych, zaś ich eliminacja ze środowiska, jak ma to miejsce w warunkach hodowli laboratoryjnych, paradoksalnie podnosi, a nie obniża poziom stresu. Wniosek ten może mieć daleko idące konsekwencje dla naszego rozumienia pojęcia dobrostanu zwierząt, które zakłada całkowitą eliminację środowiskowego stresu.

Na trzecią część recenzowanej rozprawy składa się artykuł Lipowska i in. 2020, 'Does selection for behavioral and physiological performance traits alter glucocorticoid responsiveness in bank voles?' opublikowany w *J. Experimental Biology*. Jak wspominałem

wyżej (punkt 1. uwag ogólnych) omawiana publikacja nie przedstawia szczegółowych hipotez dotyczących spodziewanych efektów części selekcji, co nie ułatwia interpretacji wyników. Autorzy dali temu wyraz pisząc w ostatnim zdaniu wstępu: 'Therefore, with respect to such specific hypotheses, our study has an exploratory rather than confirmatory nature.' Nie są w niej również przedstawione wyniki jednoznacznie wskazujące na efekty selekcji bezpośrednio związane z aktywnością osi HPA w zakresie bazalnego i post-stresowego poziomu kortykosteronu. Znaczącym czynnikiem wpływającym na brak statystycznie istotnych różnic była duża, sięgająca rzędu wielkości zmienność osobnicza poziomu testosteronu notowana na wszystkich etapach przeprowadzonych eksperymentów, do czego odniosłem się wyżej, w punkcie 3 uwag ogólnych. Tym niemniej omawiana publikacja raportuje kilka ciekawych wyników związanych np., z różnicami występującymi między płciami.

#### Forma prezentacji rozprawy

Pod względem redakcyjnym i estetycznym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń. Najważniejsze rozdziały składające się na dysertację są wydrukami trzech opublikowanych, anglojęzycznych artykułów naukowych. Poprzedzające je polsko-angielskie streszczenia wiernie relacjonują najważniejsze wyniki i wnioski. Znalazłem w nich kilka drobnych językowych potknięć, w tym jedno, będące oczywistym, wartym odnotowania *signum temporis*: str. 6, 'sygnalizacja glukokortykowidowa', zamiast 'glukokortykoidowa'. Fragment relacjonujący wyniki badań pilotowych jest w kontekście całej pracy istotną dokumentacją niskiej powtarzalności osobniczych cech związanych z osią HPA, która, z przyczyn dla mnie nie do końca zrozumiałych, nie odwiodła Doktorantki od przeprowadzenia części wielkoskalowych eksperymentów i jak sądzę, była jednym z powodów braku wyraźnie zaznaczających się różnic między selekcjonowanymi liniami nornic.

#### Wnioski końcowe

Przy wszystkich sformułowanych wyżej wątpliwościach wartość naukową dysertacji oceniam wysoko, gdyż podjęta w niej tematyka plasuje się w centrum ważnego kierunku badań światowej biologii, a szczegółowe wyniki stanowią rozpoznawalny wkład w jego dalszy rozwój. Rozprawa mgr Małgorzaty Lipowskiej jest oryginalnym dziełem spełniającym warunki wymagane do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z przekonaniem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Lipowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Białystok, 28.04.2022

Prof. dr hab. Marek Konarzewski