

STRESZCZENIE

Życie zwierząt obfituje w wyzwania i trudności, które wywołują stres i stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia, życia, lub sukcesu reprodukcyjnego zwierzęcia. Dlatego też ważnym elementem dostosowania do środowiska jest zdolność do adekwatnej reakcji na napotkane trudności, pozwalającej zmniejszyć zagrożenie lub go uniknąć. Jednym z głównych mediatorów odpowiedzi na stres u kręgowców jest oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i wydzielane przez nią hormony efektorowe, glukokortykoidy. Hormony te modulują liczne aspekty zachowania i fizjologii zwierzęcia. Glukokortykoidy spełniają różne role zależnie od tego, czy zwierzę doświadcza wymagających reakcji trudności, które stymulują wzrost poziomu hormonu, czy też utrzymuje poziom hormonu w niskim stanie podstawowym w przypadku braku zagrożeń. Ponadto, w zależności od stopnia wzrostu poziomu hormonów w reakcji na bodziec, mogą one promować aktywną lub pasywną strategię reakcji. W zależności od sytuacji, jeden lub drugi typ reakcji może zwiększyć szanse zwierzęcia na uniknięcie zagrożenia. Jeżeli jednak reakcja zwierzęcia będzie nieadekwatna do typu zagrożenia, może ono narazić się na jeszcze większe niebezpieczeństwo. Mediowana przez glukokortykoidy odpowiedź może więc pomóc zwierzęciu uniknąć zagrożenia jeśli siła odpowiedzi jest adekwatna do rodzaju zagrożenia, ale nieadekwatna odpowiedź może być szkodliwa. Jest więc możliwe, że ewolucja zwiększonej zdolności do radzenia sobie z konkretnym typem wyzwania lub trudności może obejmować optymalizację siły odpowiedzi glukokortykoidowej na to wyzwanie. Taka zmiana może mieć jednak globalny wpływ na aktywność osi HPA, skutkując zmianami w sile odpowiedzi na wszelkiego rodzaju stresory, a także wpłynąć na aspekty zachowania i fizjologii zwierzęcia wrażliwe na modulację przez hormony glukokortykoidowe.

Zbadaliśmy, czy zmiany w aktywności osi HPA uczestniczą w ewolucji zwiększonej zdolności do sprostania konkretnemu wyzwaniu, wykorzystując laboratoryjny model radiacji adaptacyjnej. Model obejmuje linie nornicy rudej (*Myodes glareolus*) selekcionowane w trzech kierunkach: wysokiego tempa metabolizmu tlenowego osiąganego w czasie pływania (linie A), zdolności do utrzymania masy ciała na niskiej jakości pokarmie roślinnym (linie H) i intensywności zachowania w kierunku upolowania świerszcza (linie P); a także nieselekcionowane linie kontrolne (C). Wyzwania stawiane zwierzętom w trakcie testów selekcyjnych mają, w zależności od typu selekcji, różną naturę i czas trwania: zwierzęta z linii A spędzają 18 minut pływając lub unosząc się na powierzchni wody, zwierzęta z linii H przez 4 dni mają dostęp tylko do paszy niskiej jakości, a zwierzęta z linii P po kilkugodzinnej głodówce stykają się na 10 minut z wcześniej nieznaną potencjalną ofiarą. W wyniku ponad 20 pokoleń selekcji zwierzęta z linii selekcionowanych osiągają znacząco lepsze wyniki w testach selekcyjnych niż te z linii kontrolnych; selekcja wpłynęła też na niektóre aspekty ich zachowania i fizjologii. Cechy, w których zaszły zmiany mogą być modulowane przez hormony glukokortykoidowe, toteż zaobserwowane efekty mogą sugerować zaistnienie zmian w aktywności osi HPA. W naszych badaniach sprawdziliśmy, czy selekcja wpłynęła na modulowaną przez oś sygnalizację za pośrednictwem hormonów glukokortykoidowych.

W badaniach skupiliśmy się na kortykosteronie, głównym hormonie glukokortykoidowym nornic. Zmierzyliśmy podstawowy poziom hormonu, a także zmiany jego poziomu wywołane przez wyzwania lub stresory. U zwierząt poddanych testowi zbliżonemu do testu selekcyjnego linii A stwierdziliśmy, że zdolność do osiągnięcia wysokiego tempa metabolizmu w czasie pływania jest negatywnie skorelowana ze stopniem wywołanego przez test wzrostu poziomu kortykosteronu we krwi. Jednak chociaż zwierzęta z linii A osiągały daleko wyższe tempo metabolizmu niż te z linii C, zwierzęta z tych dwóch typów linii nie różniły się one ani podstawowym, ani wywołanym testem poziomem hormonu. Linie te również nie różniły się wrażliwością na chroniczny stres. Co ciekawe, u nornic chronicznie eksponowanych na

Kh Lipon

łagodne stresory nie zaobserwowaliśmy symptomów dystresu, który w takich warunkach objawiają laboratoryjne myszy i szczury. Jedynym skutkiem ekspozycji nornic na chroniczny stres był spadek poziomu metabolitów kortykosteronu wydalanego w odchodach.

Ekspozycja na ostry stres wywołany unieruchomieniem spowodowała wyraźny wzrost poziomu kortykosteronu we krwi, lecz skala tej reakcji nie różniła się między nornicami z wszystkich czterech typów linii. Natomiast maksymalny, wywołany farmakologicznie poziom kortykosteronu był obniżony w liniach A, niemal zrównując się z siłą reakcji na unieruchomienie. Obserwacja ta może wskazywać, że nornice z linii A odczuwają stres stosunkowo silniej niż te z innych linii. Tempo powrotu do podstawowego poziomu kortykosteronu po ostrym, wywołanym unieruchomieniu stresie było obniżone u samic z linii H. Jest mało prawdopodobne, że zmiana tego typu wpływa na wyniki testu selekcyjnego, jeżeli natomiast zwierzę byłoby narażone na częsty kontakt z ostrym stresem, obniżone tempo usuwania kortykosteronu z krwi mogłoby zwiększyć ryzyko związane z przedłużonym zaburzeniem homeostazy organizmu przez podwyższony poziom hormonu. Selekcja w liniach P spowodowała zmianę krzywej odpowiedzi na maksymalną stymulację farmakologiczną, ale nasze badania nie pozwoliły na określenie, czy zaobserwowana zmiana odpowiada utrzymaniu maksymalnego poziomu kortykosteronu przez czas dłuższy niż pozostałe linie, czy też nornice z linii P osiągają maksymalny poziom kortykosteronu później niż nornice z innych linii. Ta obserwacja może sugerować zwiększenie wrażliwości osi HPA na stymulację przez hormon adrenokortykotropowy, ale sprawdzenie tej hipotezy wymagałoby bardziej dogłębnych badań.

W oparciu o zebrane wyniki można dojść do konkluzji, że zmiany w aktywności osi HPA nie odgrywają znaczącej roli w ewolucji zwiększonej zdolności do sprostania konkretnym wyzwaniom. Jednak należy pamiętać, że w naszych badaniach nie uwzględniliśmy czynników zdolnych modulować siłę sygnalizacji glukokortykoidowej, takich jak poziom wiążących hormony globulin we krwi lub ekspresja receptorów w komórkach tkanek docelowych. Nie jest wykluczone, że selekcja wpłynęła na te czynniki, zmieniając siłę sygnalizacji glukokortykoidowej bez konieczności zmiany poziomu samych hormonów. Ta możliwość wyklucza rozszerzenie naszych konkluzji na cały system sygnalizacji za pośrednictwem glukokortykoidów. Niemniej jednak selekcja wpłynęła na zaskakująco niewiele spośród cech układu HPA ujętych w naszych badaniach. Szczególnie warta podkreślenia jest obserwacja, że choć siła odpowiedzi glukokortykoidowej wpływa na wyniki osiągnięte w jednym z testów selekcyjnych, ewolucja zdolności do osiągania wyższych wyników w tym teście nie wymagała zmian w sile odpowiedzi na test. Toteż wyniki naszych badań nie potwierdzają hipotezy, że ewolucja złożonych, behawioralnych i fizjologicznych adaptacji, skutkujących zwiększeniem zdolności do radzenia sobie z konkretnym typem wyzwania, może zostać osiągnięta poprzez zmiany w aktywności osi HPA.

Khe Lipon

SUMMARY

Challenging situations and the stress they evoke are an integral element of an animal's life, posing a threat to its health, survival or successful reproduction. The ability to adequately respond to and overcome the challenges is therefore a crucial element of Darwinian fitness. In vertebrates, one of the major mediators of stress response is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and its main effector hormones, glucocorticoids. The hormones have a wide spectrum of functions, modulating the animals' physiology and behavior both at the absence of stressors, when the plasma level of the hormones is relatively low, and during a stressful or metabolically demanding challenge, when the hormones level increases markedly. Moreover, depending on the scope of the glucocorticoid level increase, the hormones may promote either proactive or reactive coping with a challenge. Depending on the type of challenge, one or the other coping strategy can be more beneficial. Conversely, mounting an inadequate response might worsen the threat posed by the challenge. Therefore, the strength of glucocorticoid response to the challenge can support successful coping if the coping strategy it promotes matches the type of challenge the animal is facing, but can be detrimental if the response is mismatched. It can be hypothesized that evolution of an improved performance in a particular type of challenge involves optimization of the glucocorticoid response to the challenge. However, such an adaptation can result in a global change in the HPA axis activity, affecting response to other challenges and the aspects of behavior and physiology subject to modulation by the glucocorticoid hormones.

We tested the association between evolution of improved performance in a particular challenge and changes in the HPA axis activity using an artificial selection model of adaptive radiation. The model involves lines of bank voles (*Myodes glareolus*) undergoing selection in three directions: high maximum rate of aerobic metabolism achieved during swimming (A lines), ability to maintain body mass on low-quality, herbivorous diet (H lines), and intensity of predatory behavior towards a cricket (P lines); and unselected, control (C) lines. The selection is applied based on animals' performance in a challenge of distinct nature and duration: an 18-min swimming trial in the aerobic (A) lines, a 4-day trial during which only low-quality food is available in the herbivorous (H) lines, and a 10-min exposure to novel prey following several hours of fasting in the predatory (P) lines. More than 20 generations of selection have significantly improved the animals' performance in respective selection trials, and the selection has also changed several aspects of the animals' behavior and physiology. Because the affected traits are subject to modulation by glucocorticoids, the observed changes may represent differences in the HPA axis activity. Here, we tested if the glucocorticoid signaling of the axis changed in response to selection.

We measured the level of corticosterone, main glucocorticoid hormone of bank voles, at baseline and during response to a challenge or stress. We found that the metabolic rate achieved during a swimming trial similar to the A-line selection test is negatively correlated with the strength of corticosterone response to the trial. However, the glucocorticoid levels at baseline and after the trial did not differ between the voles from the A and C lines. Selection in the A lines did not affect the animals' sensitivity to chronic stress, either. Interestingly, voles from both the C and A lines responded to chronic mild stress less prominently than laboratory rats and mice, and the only effect of the treatment was a decrease in the fecal corticosterone metabolites level.

The scope of glucocorticoid response to an acute, restraint-induced stress did not differ among the four line types. However, in the A lines the selection has decreased the maximum scope of glucocorticoid response. As a result, in these lines the scope of response to restraint was nearly as high as the maximum response. This finding may indicate that selection in the A

Be *Lipost*

lines has increased the relative strength of response to stress. In the H lines, the rate of recovery from the acute stress-induced glucocorticoid peak was reduced, but only in females. This change is unlikely to be straightforwardly associated with the animals' performance in the selection test, but may increase the health risks associated with prolonged exposure to elevated glucocorticoid level in acutely stressful conditions. In the P lines, the selection has affected the glucocorticoid response curve to maximum pharmacological stimulation, but we were unable to distinguish whether the change involved a more prolonged maintenance of glucocorticoid peak or if the peak was achieved later than in animals from other line types. Potentially, this indicates an increase in the HPA axis sensitivity to stimulation with adrenocorticotrophic hormone, but further studies would be needed to test this possibility.

Based on our results, it could be concluded that the HPA axis does not play a meaningful role in evolution of improved coping with challenges. However, selection could have affected the expression of proteins binding the glucocorticoid hormones in plasma and in target cells, which were not included in our studies. Therefore, while we acknowledge that the selection could have affected these modulators of the glucocorticoid signal, our conclusions are limited only to this most basic, central element of the HPA axis signaling. Nevertheless, it is surprising that out of several glucocorticoid traits measured in our studies, only a few were affected by selection. In particular, although the scope of glucocorticoid response was straightforwardly associated with performance in the A-line selection trial, the selection has not affected this trait. In conclusion, our findings do not support the hypothesis that evolution of complex behavioral and physiological adaptations, resulting in improved performance in particular challenges, can be mediated by changes in the HPA axis activity.

K. Z. Lipson