

Prof. dr hab. Jerzy Bańbura
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej pana Kyle'a Coughlana pt. Oxidative stress biology of nest-box breeding birds

Imię i nazwisko kandydata: Kyle Coughlan

Tytuł rozprawy doktorskiej: Oxidative stress biology of nest-box breeding birds

Promotor: dr hab. Ulf Bauchinger

Promotor pomocniczy: dr Edyta Teresa Sadowska

1. Wartość naukowa rozprawy
 - a. Oryginalność badań

Oceniam wysoko oryginalność badań przeprowadzonych w trakcie realizacji projektu doktorskiego Kyle'ego Coughlana. Pomysł polega na zamiarze testowania ogólnej idei, że stres oksydacyjny jest czynnikiem zaangażowanym w kształtowanie strategii życiowych jako rodzaj kosztu intensywnej gospodarki energetycznej organizmów. Koszt ten zasadza się na różnego rodzaju uszkodzeniach komórkowych i molekularnych wynikających z działania oksydacyjnego reaktywnych form tlenu i wolnych rodników, będących nieuniknionym produktem procesów metabolicznych. Jest oczywiste, że w obliczu oksydacyjnych uszkodzeń funkcji życiowych wyewoluowały mechanizmy biochemiczne, które zapobiegają uszkodzeniom lub je naprawiają. Zarówno stres oksydacyjny, jak i mechanizmy przeciwstawiające się mu były na różne sposoby badane w wielu systemach doświadczalnych, w tym na ptakach jako modelu. Wyniki dotychczasowych badań są jednak wysoce niejednoznaczne, a często wzajemnie sprzeczne, co wynika z zastosowania zbyt uproszczonych układów doświadczalnych.

Stąd bardzo cenną nowością w tym doktoracie jest zbadanie w dobrze przemyślanym układzie tych przeciwstawnych procesów poprzez stosunkowo szeroką analizę odpowiednich ich wskaźników uszkodzeń i stresu oksydacyjnego oraz obrony przed wpływem czynników oksydacyjnych u konkretnych osobników sikor, w momentach kontrastujących ze sobą pod względem nasilenia wydatków energetycznych (stany spoczynku i stany aktywności w sezonach roku narzucających różny reżim – okres wychowywania piskląt v. okres zimowania). Uzyskane wyniki są sprzeczne z przewidywaniami szeroko przyjętej hipotezy, że okresy/fazy wysokiej aktywności metabolicznej (zwiększonego zużycia energii) powinny odznaczać się zwiększonym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych. Stwierdzono natomiast wyższy poziom kwasu moczowego we wszystkich fazach/okresach zwiększonej aktywności metabolicznej. Kwas moczowy jest silnym antyoksydantem i w omawianych badaniach wyjaśnia wyniki lepiej niż enzymy antyoksydacyjne czy nieenzymatyczna antyoksydacyjna wydolność osocza. Ostatecznie głównym naukowym osiągnięciem dysertacji jest sfalsyfikowanie szeroko przyjętej hipotezy, a przynajmniej jej nadmiernie uproszczonej wersji.

- b. Wartość naukowa rozdziałów

Rozprawa doktorska Kyle'ego Coughlana ma przejrzystą strukturę, w której centralną rolę pełnią raporty z czterech badań (Study I – IV), zawarte w rozdziale 3 pt. Testing the „oxidative life history theory”. Te raporty mają postać odrębnych artykułów, z których jeden został opublikowany w nieco zmienionej wersji w *Integrative and Comparative Biology* w

roku 2024. Rozdział zawierający te raporty jest poprzedzony ogólnym wstępem zawierającym bardzo kompetentny przegląd stanu wiedzy o stresie oksydacyjnym i obronie przeciwko niemu (Rozdział 1) oraz ogólnym opisem materiału i metod, w tym szczegółowym opisem procedur terenowych i laboratoryjnych (Rozdział 2). Ostatni rozdział rozprawy stanowi bardzo ciekawa dyskusja własnych wyników na tle szerokiej literatury.

Metodyka tej pracy nie zawierała eksperymentów manipulacyjnych, jednak poprzez precyzyjne wykorzystanie spodziewanego kontrastu między sezonem rozrodczym i zimowaniem oraz między dobowym rozkładem aktywności i spoczynku uzyskano dane do stosunkowo mocnego wnioskowania stresie oksydacyjnym i przeciwdziałaniu mu. Dobrym elementem planu badań było wykonanie porównań wewnątrzdobowych stanów aktywności i spoczynku na tych samych osobnikach (powtórzone pomiary). Badania przeprowadzono na zasiedlających skrzynki lęgowe dzikich populacjach sikory bogatki *Parus major* i sikory modrej *Cyanistes caeruleus*.

Badanie I wykonano w późnym okresie sezonu lęgowego, na sikorach bogatkach przystępujących do drugiego lęgu, przyjmując, że będzie ono miało charakter pilotażowy. Badanie to objęło 12 samic, które udało się pozyskać do pobrania prób w dwóch fazach aktywności dobowej.

Badanie II, przeprowadzone w następnym roku od początku sezonu lęgowego objęło oba gatunki sikor i było przeprowadzone w układzie podobnym do badania I. W późnym okresie tego samego sezonu lęgowego kontynuowano badanie w takim samym układzie dla ptaków przystępujących do drugiego lęgu.

Badanie III przeprowadzono w sezonie zimowym na obu gatunkach sikor. Ptaki w fazie spoczynku chwymano w budkach lęgowych, podczas noclegu. Ptaki w fazie aktywnej chwymano w sieci ornitologiczne w trakcie żerowania w dzień. Obie te próby były traktowane jako niezależne, bez powtórzonych pomiarów.

Badanie IV to w istocie synteza wyników badań I-III, umożliwiająca analizę danych w fazach aktywności dobowej i międzysezonowej, częściowo z uwzględnieniem czynnika gatunkowego.

W mojej opinii wartość naukowa tych badań jest bardzo wysoka. Wynika to z nowatorskiego podejścia do dobrze zaplanowanych porównań, dającego rezultaty zbliżone do wyników możliwych do uzyskania z zastosowaniem eksperymentów manipulacyjnych, a z zachowaniem pełnych realiów ekologicznych życia dzikich populacji ptaków.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Ważną składową wysokiej wartości recenzowanej dysertacji jest jej przejrzysta struktura logiczna. Istotną rolę pełni tutaj bardzo dobry wstęp (rozdział 1), który wychodząc od przedstawienia bardzo ogólnych podstaw wiedzy, poprzez omówienie szczegółowych przewidywań, interpretacji i opublikowanych wyników empirycznych, prowadzi czytelnika do celu rozprawy. Główna hipoteza pracy, wynikająca wprost z szeroko przyjętej w badaniach eko-fizjologicznych hipotezy, została przedstawiona w klarowny sposób, wraz z jej testowalnymi przewidywaniami. W skrócie, przedstawiono jasno hipotezę, że zwiększona aktywność metaboliczna powoduje zwiększenie produkcji substancji oksydacyjnych, które powodując uszkodzenia oksydacyjne, generują koszty dla organizmów i stanowią element kompromisów fizjologicznych.

Przewidując na podstawie opublikowanych już wzajemnie sprzecznych wyników różnych badań, że taka prosta hipoteza nie jest prawdziwa, Kyle Coughlan przedstawił również jasno hipotezę alternatywną, którą chyba lepiej byłoby określić jako hipotezę uzupełniającą. Ta hipoteza stwierdza, że u ptaków (zwierząt) wyewoluowały środki równoważące

zwiększanie się poziomu substancji wolno-rodnikowych w okresach wysokiej aktywności metabolicznej, co powinno minimalizować uszkodzenia oksydacyjne.

Projekt przeprowadzonych na potrzeby dysertacji badań i zestaw wskaźników stresu oksydacyjnego, uszkodzeń i aktywności przeciwoksydacyjnej zostały dobrze przemyślane i stanowią podstawę do uzyskania nowatorskich wyników, jakie ta rozprawa prezentuje. Użyte narzędzia statystyczne analizy danych są poprawne, ale mam pewne uwagi krytyczne dotyczące ich prezentacji – przedstawię je w dalszej części recenzji. Na wysokie uznanie zasługuje graficzna strona pracy, w każdym aspekcie prezentacji. Ułatwia to lekturę wszystkich części pracy, a szczególnie wyników badań I-IV.

Nadzwyczaj ciekawa jest dyskusja i interpretacja wyników. Podobnie jak wstęp część dyskusyjna wskazuje na znakomite opanowanie szerokiej i trudnej literatury. Wnioski są klarowne i w pełni uzasadnione.

3. Poprawność redakcyjna

Układ dysertacji jest jasny i zrozumiały, co pozwala czytelnikowi na łatwą orientację w tekście. Rozprawa jest bogato ilustrowana dobrze przemyślanymi schematami i grafikami wyników. Oceniam je bardzo wysoko. Rozprawa jest napisana w języku angielskim czyli w międzynarodowym języku współczesnej nauki. Jej język jest stosunkowo prosty i komunikatywny. Podejście do ostatecznej edycji wydaje mi się jednak nieco niedbałe. Świadczą o tym dość banalne błędy językowe. Nie będę wymieniał wszystkich, na które zwróciłem uwagę, ale wspomnę o paru przykładowych. Na str. 28, pod koniec drugiego akapitu napisano „to effect” zamiast „to affect”, a na początku następnego akapitu „were” zamiast „was”. Na str. 35, przy okazji prezentacji alternatywnej hipotezy rozprawy, autor napisał „oxidative damaged”, gdy powinien „oxidative damages” oraz „counter measured” zamiast „counter measures”.

4. Uwagi krytyczne

(1) Wspomniane wcześniej uwagi krytyczne do statystyki zacznę od stwierdzenia, że opis metod analizy danych jest zbyt skrótowy i uproszczony. Opis analizy statystycznej występuje w podobnej formie w każdym podrozdziale rozdziału 3, przedstawiającym badania I-IV.

We wszystkich czterech opisach powtarza się informacja, że analizy były wykonane z użyciem RStudio. Ta informacja wydaje się niepełna, gdyż RStudio dostarcza stosunkowo wygodnego graficznego interfejsu dla środowiska/języka R, które wykonuje obliczenia statystyczne. Można uznać, że to nie jest bardzo ważne i stanowi jedynie pewien skrót myślowy. Natomiast ważnym elementem charakteryzującym opis analizy danych jest brak informacji o samych modelach i modelowaniu, poza przywołaniem nazw paru wyspecjalizowanych pakietów R.

Główną metodą modelowania statystycznego w badaniu I, II i IV jest użycie modeli liniowych mieszanych. Nie wspomniano jednak, co stanowiło efekt losowy w analizowanych modelach – jest to ważne dla czytelnika, nawet jeśli dość oczywiste. Nie jest oczywista kwestia powtórzonych pomiarów, które były wykonywane na tych samych samicach, ale w różnym porządku w przypadku gniazd o numerach parzystych i nieparzystych. Powinno być jasno przedstawione, w jaki sposób to zrobiono. Powinny też być przedstawione wszystkie komponenty modeli.

Podobnie wspomniano, jaki pakiet R był użyty do wyliczenia stopni swobody i prawdopodobieństwa popełnienia błędu statystycznego pierwszego rodzaju, ale nie napisano,

jakimi metodami aproksymacji się posłużono. Trochę powiązany jest problem prezentacji lub braku informacji o stopniach swobody przy statystykach F modeli. Statystyki F przedstawiane w tekście są zaopatrzone w informację o stopniach swobody, zaś w przypadku modeli w całości prezentowanych w tabelach (np. 3.1.2, 3.1.3 i inne przy następnych badaniach) brak jest takiej informacji. Podobne uwagi krytyczne można zgłosić w stosunku do ogólnych modeli liniowych (ANOVA) w opisie badania III (sezon zimowy).

(2) Znając realia badań nad dzikimi ptakami, nie mam żadnych zastrzeżeń dotyczących wielkości prób. Z tego samego powodu, mam przypuszczenie, że biorąc pod uwagę chwytywanie samic na gniazdach w czasie nocnego spoczynku, badania wygenerowały pewne straty w lęgach. To nie jest miły aspekt badań terenowych, ale wydaje się nieunikniony. Wydaje mi się, że jakieś odniesienie się do tej kwestii w pracy doktorskiej powinno się znaleźć.

(3) W odniesieniu do badania III warto zwrócić uwagę, że zarówno sikora bogatka, jak i modra są gatunkami częściowo wędrownymi. W warunkach polskich ten problem jest słabo poznany, ale pewne jest, że bardzo dużo sikor przybywa do Polski z rejonów północno-wschodnich Europy. W opisie obu gatunków sikor w dysertacji kwestia wędrowności/osiadłości nie została uwzględniona. Założenie, że sikory badane w sezonie rozrodczym i w czasie zimowania reprezentują te same populacje w zasadzie nie było czynione w tych badaniach. Niemniej, jeśli populacja zimująca była mieszkanką ptaków lokalnych i przybywających z innych regionów, to można się spodziewać większej zmienności różnych ich właściwości, w tym fizjologicznych (stanu odżywienia).

5. Ocena końcowa

Uważam dysertację doktorską Kyle'a Coughlana za jedną z najciekawszych, jakie miałem okazję recenzować. Mam tu na myśli szczególnie wysoki ładunek oryginalnej myśli, klarowny układ badawczy i przekonujące wyniki. Pozytywnej oceny nie zmienia kilka uwag krytycznych.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Kyle'a Coughlana spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Kyle'a Coughlana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 7 maja 2024 r.

Prof. dr hab. Jerzy Bańbura