

Prof. dr hab. Marek Konarzewski
Instytut Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
15-950 Białystok
ul. Ciołkowskiego 1a

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Agaty Rudolf

**pt. "Testing the 'rate of living' theory: ageing of bank voles selected
for high aerobic capacity**

1. Ocena naukowego znaczenia tematyka rozprawy i doboru celów pracy

Zrozumienie uwarunkowań procesów starzenia jest jednym z największych wyzwań współczesnej biologii. W już ponad stuletniej historii badań nad starzeniem poczesne miejsce przysługuje hipotezie tempa życia (The Rate of Living Hypothesis) sformułowanej przez Raymonda Pearla w 1928 r. Wedle niej długość życia ograniczona jest nieznanym czynnikiem, którego stopniowe wyczerpywanie sprowadza starość, a w konsekwencji śmierć. Oryginalne sformułowanie hipotezy Pearla ma dziś znaczenie historyczne, gdyż późniejsze badania doprowadziły do zastąpienia jej przez hipotezę stresu oksydacyjnego i jej dalsze rozwinięcia. Stąd też odwołanie się do hipotezy The Rate of Living (którą dalej będę określał skrótem ROL) w tytule recenzowanej rozprawy pani mgr Agaty Rudolf wzbudziło moje zdziwienie. Było ono tym większe, że przywoływanie ROL nie ograniczyło się jedynie do tytułu, ale konsekwentnie wpłynęło na konstrukcję rozprawy i moim zdaniem negatywnie odbiło się na zawartej w niej argumentacji.

Wedle dzisiejszego stanu wiedzy, tempo starzenia jest wypadkową dwóch procesów: akumulacji uszkodzeń (w dużej mierze powstających za sprawą wolnych rodników generowanych w trakcie oddychania komórkowego) oraz aktywności molekularnych mechanizmów naprawczych. Tych drugich mechanizmów, o jak się wydaje, absolutnie kluczowym znaczeniu dla tempa starzenia, ROL zupełnie nie uwzględnia. Nie uwzględnia ich również recenzowana rozprawa, pozostając tym samym w zgodzie z ROL, ale do pewnego stopnia ignorując dzisiejszy stan wiedzy. Usytuowanie rozprawy w kontekście ROL jest więc dla mnie niezrozumiałe. Jest ono tym bardziej niezrozumiałe, że prezentowane wyniki można

było bez większych przeszkód dyskutować i interpretować w kontekście całości nowoczesnych poglądów na temat mechanizmów starzenia. Z pewnością pozwoliłoby to doktorantce na rzeczowe rozwinięcie wielu wątków rozprawy, które rażą skrótowością i powierzchownością, do czego jeszcze powrócę.

2. Szczegółowa analiza osiągniętych rezultatów i poprawności wnioskowania

W pierwszym rozdziale rozprawy doktorantka zamieściła wyniki porównań maksymalnego tempa metabolizmu wymuszanego bieganiem oraz maksymalnej prędkości biegu w trzech grupach nornic o różnym wieku. Jej celem było przetestowanie szczegółowego przewidywania, zgodnie z którym, cytuję „... the age-related performance decline is more profound in the selected than the control lines”. Mam tu dwojaki rodzaj wątpliwości: po pierwsze, nie jest jasne, na jakiej podstawie doktorantka przewiduje wyraźniejszy spadek wydolności ruchowo-metabolicznej u myszy selekcionowanych. We wstępie oraz dyskusji przypuszczenie to jest podbudowane cytowaniami prac wskazującymi na degenerację aparatu ruchowego, jako objawu senilności. To prawda, zwyrodnienie mięśni i ścięgien jest powszechnie uznawane za przejaw starzenia, ale nie rozumiem dlaczego miałyby ono implikować szybsze tempo ‘zużywania’ narządu ruchu u zwierząt charakteryzujących się wyższym tempem metabolizmu maksymalnego. Zgoda, tak sformułowane przewidywanie jest zgodne z historyczną wersją ROL, o której pisałem odnosząc się do celu rozprawy. Jednakże zupełnie nie uwzględnia ono możliwości szybszej i bardziej efektywnej naprawy uszkodzeń, którą mogą się charakteryzować myszy o wyższym tempie metabolizmu. Warto w tym kontekście podkreślić, że dokładnie na takiej przesłance opiera się cała gama dobrze udokumentowanych rekomendacji biomedycznych zalecających aktywność ruchową jako sposób na opóźnianie procesu starzenia. Gdyby zatem literalnie zaakceptować konsekwencje przewidywania testowanego w rozdziale I rozprawy, to powinniśmy się powstrzymywać od aktywności ruchowej, w obawie przed przedwczesnym ‘zużyciem’ naszych ścięgien i mięśni. Warto przy tym zauważyć, że w grupie III obejmującej zwierzęta zaawansowane wiekiem, myszy selekcionowane charakteryzowały się wciąż daleko wyższym tempem metabolizmu i charakterystykami aktywności ruchowej, niż zwierzęta kontrolne. A zatem posiadały one mechanizmy naprawcze, które umożliwiły im ich utrzymanie, co najprawdopodobniej jest efektem selekcji. Ten niebywale istotny wątek został w rozprawie całkowicie pominięty.

Moje wątpliwości budzi również brak ścisłej korespondencji między cytowanym wyżej sformułowaniem szczegółowej hipotezy i wnioskowaniem statystycznym użytym do jej testowania. Jeśli przewidywany kierunek zmian jest jednoznacznie określony, tzn. powinien być szybszy w liniach selekcyjowanych, to konsekwentnie doktorantka powinna zastosować testy jednostronne, czego nie uczyniła.

Nie rozumiem również powodów, dla których doktorantka nie podjęła próby bardziej szczegółowych analiz zróżnicowania maksymalnego tempa metabolizmu w oparciu o informacje dotyczące składu ciała nornic, prezentowane w rozdziale II. Aż się prosi, by przeanalizować wpływ selekcji na metabolizm korygując go, np., nie tylko o całkowitą masę ciała, ale także o masę beztłuszczową. Otluszczenie różni się między liniami (rozdział II), a lipidy są metabolicznie nieaktywne. Zatem zróżnicowanie otluszczenia może w istotny sposób zniekształcać wpływ starzenia na tempo metabolizmu i wydolność ruchową, czego doktorantka w rozprawie nie uwzględniła. Niestety, powyższa uwaga jest ilustracją braku korespondencji i synergii między wynikami prezentowanymi w kolejnych rozdziałach dysertacji.

Trudno mi się także zgodzić z pominięciem w dyskusji części analiz prezentowanych w sekcji 'Results'. Doktorantka wykryła istotną interakcję między masą ciała i efektem grupy wiekowej, w następstwie czego zdecydowała się dalszą analizę prowadzić w oparciu o dwa modele statystyczne: bez uwzględnienia tej interakcji (model I) oraz z wyłączeniem pierwszej grupy wiekowej (model II). Analiza obu modeli pokazała brak wpływu efektu grupy wiekowej na maksymalne tempo metabolizmu wymuszane bieganiem (VO₂run). Jednakże w pierwszym z nich interakcja efektu linii z wiekiem była istotna statystycznie (str. 18), co zostało zupełnie pominięte w dyskusji. Rzecz jasna efekt ten nie jest tożsamy z efektem selekcji. Jednakże dogłębniejsze przyjrzenie się zróżnicowaniu zachodzącemu między liniami mogłoby przynieść ciekawe informacje.

Dyskusja, mieszcząca się ledwie na 2 stronach robi wrażenie powierzchownej, bez ciekawego pomysłu na skojarzenie uzyskanych rezultatów z doniesieniami z literatury przedmiotu. Jest to tym bardziej rozczarowujące, że w tekście wielokrotnie cytowane są publikacje grupy Kocha i Brittona, które mogłyby stanowić dogodny kontrast do interesującego skonstrastowania negatywnych konsekwencji niskiej wydolności ruchowo-metabolicznej, szczególnie mocno akcentowanej w artykułach autorstwa tej grupy z rezultatami zamieszczonymi w dysertacji.

Rozdział drugi rozprawy zawiera rezultaty analizy zróżnicowania składu ciała, w tym otłuszczenia i masy aktywnych metabolicznie narządów wewnętrznych. Funkcjonalny związek tych parametrów z ROL był dla mnie niejasny i takowym po lekturze rozdziału pozostał. Nadal nie rozumiem, dlaczego brak interakcji między efektem selekcji i starzeniem w odniesieniu do składu ciała i masy narządów miałby być niezgodny z ROL. Wydaje mi się, że doktorantka niepotrzebnie próbowała tych niezgodności szukać i dokumentować, zamiast potraktować uzyskane rezultaty jako tło do innych rozważań, w tym szczególnie jako źródło danych do korygowania np., tempa metabolizmu (przedstawionego w rozdziale I) o masę tłuszczu. Nie wykluczało to przeprowadzenia ciekawej dyskusji o spodziewanej kierunkowości zmian masy narządów i otłuszczenia, nawet jeśli nie wiązała się ona bezpośrednio z ROL. Dobrym przykładem może tu być artykuł Speakmana i Mitchell (2011, *Molecular Aspects of Medicine*) omawiający m. in. zróżnicowanie masy narządów wewnętrznych i otłuszczenia w kontekście starzenia i efektu ograniczenia kalorycznego. Szkoda, że takiej dyskusji w dysertacji zabrakło.

W kolejnym rozdziale rozprawy autorka przeprowadziła porównanie zagęszczenia mitochondriów i jąder komórkowych w mięśniach myszy. Nie mogę się tym miejscu zgodzić z terminologią zastosowaną w tekście dysertacji, w której mowa jest o zawartości (content), a nie zagęszczenia (density) mitochondriów i jąder. Z opisu metod wynika, że pod terminem 'content' kryje się liczba np., jąder komórkowych w przeliczeniu na jednostkę powierzchni preparatu histologicznego. Stąd też, jak sądzę, termin 'zagęszczenie' (density) jest znacznie bardziej stosowny, i nie jest to li tylko różnica semantyczna. Najważniejszy zaś wynik prezentowany w omawianym rozdziale, wskazujący na brak efektów selekcji i starzenia na zagęszczenie jąder i mitochondriów jest o tyle zaskakujący, co trudny do zinterpretowania. Nie wydaje się on być następstwem uchybień metodologicznych, co potwierdzają wyniki dodatkowej analizy powtarzalności oznaczeń przeprowadzone przez doktorantkę. Szkoda natomiast, że w analizach nie uwzględniła ona pomiarów wielkości mitochondriów i jąder komórkowych, które mogłyby stać się dodatkowym, cennym źródłem informacji. Na przykład, wielkość jąder komórkowych ściśle koreluje z wielkością komórek, co z kolei ma istotny wpływ na metaboliczne koszty utrzymania potencjałów błonowych (w więc i tempa metabolizmu: Jimenez et al. 2013. *Nat. Commun.* **4**: 2150). Zatem wielkość organelli, a nie ich zagęszczenie, może być istotnym parametrem różnicującym badane grupy zwierząt.

Równie trudne do zinterpretowania są prezentowane w rozdziale IV w większości negatywne wyniki analiz aktywności kluczowych enzymów cyklu Krebsa izolowanych z mięśni porównanych grup nornic. Przy braku jakichkolwiek danych na temat ewentualnego zróżnicowania mechanizmów niwelujących stres oksydacyjny, w szczególności aktywności białek rozprężających (UPC), prezentowane rezultaty są po prostu jednostronne. Warto w tym kontekście zauważyć, że istotnym, brakującym elementem rozprawy (ale chyba także całego programu badawczego) jest wykazanie, iż poza maksymalnym tempem metabolizmu selekcja doprowadziła do zwiększenia spontanicznej aktywności ruchowej, a co za idzie, systematycznego zwiększenia tempa metabolizmu tkanki mięśniowej. Warto także przypomnieć, że metabolizm mięśni zmienia się w bardzo szerokim zakresie, a w stanie spoczynku tylko w nieznacznym stopniu wpływa na BMR. U człowieka na przykład, tempo metabolizmu mięśni pozostających w bezruchu jest o rząd wielkości niższe, niż aktywnych metabolicznie narządów wewnętrznych, takich jak wątroba i nerki. Jeśli więc selekcja nie spowodowała zróżnicowania ruchliwości (i permanentnego podniesienia związanych z tym wydatków energetycznych), to poszukiwanie jej efektów w odniesieniu do ROL (w tym aktywności enzymów mitochondrialnych) wydaje mi się niełatwe do uzasadnienia.

Piąty, ostatni rozdział rozprawy przynosi analizę śmiertelności nornic, której rezultaty pozostają w zgodzie z ogólnym brakiem zróżnicowania badanych w dysertacji parametrów. Brak różnic statystycznych zawsze nastęrcza poważne kłopoty interpretacyjne. Z pewnością nie uprawnia on do zakwestionowania ROL, a co najwyżej stwierdzenia, że uzyskane wyniki są niezgodne z przewidywaniami ROL. Ponadto lektura rozprawy nie przekonała mnie, że nornice są wyjątkowo odpowiednim modelem do badań nad starzeniem, w tym testowania ROL. Owszem, zróżnicowanie maksymalnego tempa metabolizmu, będące efektem zastosowanego reżimu selekcyjnego, jest bezdyskusyjne. Jednakże jego potencjalny wpływ na tempo starzenia- już nie. Na przykład, selekcja doprowadziła do zróżnicowania tempa metabolizmu podstawowego (BMR, Sadowska i in. 2015. Proc. Roy. Soc. Lond., B). Jednakże jej wielkość, mimo statystycznej istotności jest mniejsza niż 10%, co biorąc pod uwagę wielorakość czynników wpływających na BMR niekoniecznie musi się wiązać ze starzeniem. Nie znalazłem również informacji na temat efektów selekcji na podwyższenie metabolizmu związanego z dziennymi wydatkami energetycznymi (DEE), czy też spontanicznej aktywności ruchowej, o czym pisałem wyżej. Niestety, te i inne istotne czynniki mogące wpłynąć na uzyskane wyniki nie doczekały się

dyskusji ze strony doktorantki, która w rozdziale 'General Conclusions' ograniczyła się do ponownego, powierzchownego zreferowania najważniejszych rezultatów i dosyć trywialnych stwierdzeń odnoszących się do ich zgodności, bądź niezgodności z danymi literaturowymi.

3. Forma prezentacji rozprawy

Pod względem redakcyjnym i estetycznym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń, z wyjątkiem niedostatecznej czytelności niektórych rycin o zbyt małych wymiarach (np., Fig. 2) i drobnych błędów edytorskich (np., niezrozumiałego w angielskim skrótu 'Tab.' zamiast 'Table'). Rozdziały składające się na dysertację są opatrzone lapidarnymi wstępami i dyskusjami, przez co ich teksty są niebywale zwarte, ale jednocześnie dalekie od szczegółowości pozwalającej na uznanie ich za ukończone maszynopisy anglojęzycznych artykułów naukowych. Równie lapidarne jest ogólne podsumowanie zamykające tekst, które, jak wspominałem wcześniej, w zbyt wielkim stopniu posłużyło do ponownego przywołania najważniejszych wyników.

Rozprawa nie zawiera informacji o ewentualnych współautorach przygotowywanych publikacji, choć nakład pracy, który musiał być niezbędny do zebrania danych prezentowanych w rozprawie ewidentnie wskazuje, że są one plonem zespołowego wysiłku.

4. Wnioski końcowe

Ocena rozprawy doktorskiej w ostatecznym rozrachunku musi mieć charakter jakościowy. Uważam, że liczne mankamenty, jakimi obciążona jest rozprawa mgr Agaty Rudolf nie przeważają nad naukową wartością rezultatów składających się na jej dysertację, niewątpliwie spełniającej warunki wymagane do uzyskania stopnia doktora. Jednakże ich opublikowanie w liczących się periodykach naukowych będzie od autorki wymagało jeszcze dużo pracy, w czym, mam nadzieję, moje uwagi będą pomocne. Konkludując: wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty Rudolf do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Białystok, 01.10.2015

Prof. dr hab. Marek Konarzewski