

Prof. dr hab. Jan R.E. Taylor
Instytut Biologii Uniwersytetu w Białymstoku
ul. Ciołkowskiego 1J
15-245 Białystok

Ocena pracy doktorskiej mgr Joanny Sudyki
pt. „Age-related trade-offs and telomere dynamics in passerines”

W przyrodzie wzrost dostosowania zawsze wiąże się z kosztami. Dotyczy to także, a może przede wszystkim, wydawania potomstwa. W literaturze mamy wiele przykładów wskazujących na to, że zwiększenie inwestowania w aktualne potomstwo zmniejsza przyszłą reprodukcję, albo poprzez obniżenie przeżywalności rodziców do następnego sezonu rozmnażania, albo poprzez zmniejszenie liczby lub jakości przyszłego potomstwa. Takie ujemne sprzężenie jest podstawowym pojęciem teorii historii życiowych. Tradycyjnie, koszty te tłumaczone są kompromisem (ang. *trade-off*) w alokowaniu ograniczonych zasobów pomiędzy reprodukcją a własne utrzymanie rodziców. Fizjologiczne czy molekularne podłoże tych kompromisów jest jednak dalekie od zrozumienia. W ostatnich latach toczy się burzliwa dyskusja nad znaczeniem stresu oksydacyjnego i oksydacyjnych uszkodzeń w tkankach, która spowodowała, że jeszcze mniej rozumiemy niż na początku. Mniej zaawansowane, ale według mnie bardziej obiecujące, są badania nad skracaniem się telomerów. Mgr Joanna Sudyka w swej rozprawie doktorskiej testuje hipotezy dotyczące roli skracania się telomerów, jak również i stresu oksydacyjnego u ptaków. Doktorantka podejmuje więc bardzo ważne naukowo zagadnienie, poruszając się po mało rozpoznanym terenie. W rozprawie znajdujemy analizę danych z literatury, uzupełnionych o własne wyniki, eksperyment przeprowadzony w terenie oraz eksperyment laboratoryjny.

Przedstawiona rozprawa składa się z trzech prac, z których dwie zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach:

1. Sudyka J., Arct A., Drobnik S., Gustafsson, L., Cichoń M. 2016. Longitudinal studies confirm faster telomere erosion in short-lived bird species. *J. Ornithol.* 157: 373–375.
2. Sudyka J., Arct A., Drobnik S., Dubiec A., Gustafsson, L., Cichoń M. 2014. Experimentally increased reproductive effort alters telomere length in the blue tit (*Cyanistes caeruleus*). *J. Evol. Biol.* 27: 2258–2264.
3. Sudyka J., Casasole G., Rutkowska J., Cichoń M. Elevated reproduction in sub-optimal conditions does not affect telomere dynamics and oxidative stress.

Mgr Joanna Sudyka jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac i autorem korespondencyjnym obu prac opublikowanych. Według oświadczeń współautorów, ich łączny wkład w poszczególne prace nie przekracza 35%. Omówię trzy prace w kolejności.

Pierwsza z nich jest dobrym wstępem do dalszych rozważań i eksperymentów opisanych w dwóch kolejnych pracach. P. mgr Joanna Sudyka, wraz ze współpracownikami, zestawiała dane z literatury o tempie skracania się telomerów wraz z wiekiem, łącznie u 10 gatunków ptaków charakteryzujących się różną maksymalną długością życia i wykazała, że im większe tempo skracania telomerów, tym długość życia jest krótsza. Ta ujemna korelacja jest statystycznie wysoce istotna. Uwzględnienie tu własnych danych o sikorze modrej było bardzo cenne, gdyż tego typu informacje, o gatunkach krótko żyjących, są bardzo nieliczne.

Autorce udało się dowieść istnienia bardzo ważnej z naukowego punktu widzenia zależności. Moje jedyne zastrzeżenie odnośnie tej pracy dotyczy samego sposobu przeprowadzenia analizy. Podstawowym założeniem testów statystycznych, w tym i zastosowanej korelacji, jest niezależność

próbki. Gatunki nie dostarczają niezależnych danych, bo są ze sobą bliżej lub dalej filogenetycznie spokrewnione. Większe lub mniejsze podobieństwo danej cechy pomiędzy gatunkami może wynikać z ich większego lub mniejszego pokrewieństwa. Nie uwzględnienie tego faktu prowadzi do zawyżenia liczby stopni swobody testu. W porównaniach międzygatunkowych standardem jest obecnie używanie niezależnych kontrastów filogenetycznych lub innych podobnych metod. Szkoda, że Autorka ich nie zastosowała, choć przy tak silnej korelacji wyliczonej metodą „niefilogenetyczną”, zależność ta z pewnością ostałaby się i przy uwzględnieniu filogenezy. Także równanie regresji przedstawione na Ryc. 1 powinno być wyznaczone z uwzględnieniem filogenezy gatunków.

Kolejna praca przedstawia eksperyment wykonany w warunkach naturalnych. Autorka wraz ze współpracownikami manipulowała wysiłkiem reprodukcyjnym sikory modrej poprzez dokładanie do gniazd trzech piskląt, przy czym gniazda niemanipulowane stanowiły grupę kontrolną. Jednocześnie chwytało się ptaki dorosłe w trakcie karmienia piskląt, aby pobrać próbkę krwi do oznaczeń długości telomerów. Część ptaków udało się schwytać w roku następnym i pobrać kolejną próbkę krwi, co umożliwiło wyznaczenie stopnia skrócenia telomerów u poszczególnych osobników. Autorzy wykazali w tej pracy, że sikory wychowujące powiększone lęgi charakteryzowały się istotnie większym skróceniem telomerów niż sikory z grupy kontrolnej. Prowadzi to do doniosłego wniosku, że zmiana długości telomerów może się wiązać z wysiłkiem reprodukcyjnym.

Spośród licznych walorów pracy, chciałbym zwrócić szczególną uwagę na sam sposób przeprowadzenia eksperymentu i jego nowatorskość. Doktorantka bardzo słusznie zrezygnowała z obserwacji zależności między wielkością lęgu a zmianami długości telomerów na rzecz manipulacji wysiłkiem reprodukcyjnym. Ptaki mogą dostosowywać wysiłek reprodukcyjny do swej kondycji lub jakości. Można sobie wyobrazić, że osobniki w lepszej kondycji (lub mniej podatne na skracanie telomerów) mogłyby wychować więcej potomstwa niż te o „gorszej” jakości, co dałoby ujemną zależność między skróceniem telomerów a liczbą potomstwa. Takie wyniki uzyskano np. w „obserwacyjnych” badaniach nad rybitwą zwyczajną (Bauch et al. 2013): osobniki, które osiągnęły największy sukces miały najmniejszy ubytek długości telomerów. Sposób przeprowadzenia eksperymentu przez Doktorantkę był perfekcyjny w każdym szczególe. Gniazda, do których dokładano pisklęta, i gniazda, z których je wybierano, posiadały taką samą liczbę piskląt wyklutych w tym samym czasie. Rodzice byli odławiani dla pobierania próbek krwi zawsze w 14-tym dniu po kluciu piskląt. Wszystko to z pewnością zmniejszyło zmienność badanych parametrów na tyle, na ile jest to możliwe w badaniach terenowych.

Należy podkreślić, że omawiana praca jest pierwszą, w której udało się w eksperymencie, w warunkach terenowych, wykazać, że zmiany długości telomerów są związane z wysiłkiem reprodukcyjnym. W jedynej, wcześniejszej pracy, dotyczącej pingwinów, w której zastosowano manipulację wysiłkiem rodzicielskim w warunkach terenowych (Beaulieu et al. 2011), takiej zależności nie wykazano. Trzeba tu też zaznaczyć, że praca mgr Joanny Sudyki jest nowatorska i wyznacza kierunki dalszych badań. Poprzedza ją jedynie sześć prac dotyczących dynamiki długości telomerów w okresie reprodukcji u zwierząt i znamienne są ich daty: 2007, 2011, 3 × 2012 i 2014. Widać, że praca Doktorantki jest w „cutting edge” ważnej dziedziny. Praca, mimo że opublikowana z końcem 2014 roku, była już (wg Web of Science, 15.07.2016) cytowana 5 razy.

Intrygująca jest stwierdzona w tej pracy różnica w dynamice długości telomerów między dwoma płciami: zmiana była ujemna u samców, a dodatnia u samic, gdy w testowanym modelu zmienność długości kontrolowano o inne czynniki. Niestety, Doktorantka nie wspomina w pracy, czy aktywność rodzicielska samic i samców sikory modrej różni się, oczywiście poza samym składaniem jaj przez samicę, a jeśli tak, to czym. Potencjalnie, taka różnica mogłaby mieć wpływ na dynamikę długości telomerów. Doktorantka sugeruje, że obserwowane różnice mogą wynikać z

większej u samic niż u samców aktywności telomerazy, spowodowanej przez estrogeny. Nasuwają się tu analogie z moimi własnymi eksperymentami manipulowania nakładami rodzicielskimi u nornic rudych (Ołdakowski, Koteja, Sadowska, Taylor; J. Exp. Biol.). Uszkodzenia oksydacyjne tkanek u rozmnażających się samic nornic były takie same, a w niektórych narządach mniejsze, niż u samic nie przystępujących do rozrodu, co także najwyraźniej wynika z działania estrogenów. Ochronne działanie hormonów płciowych może być więc zjawiskiem dotyczącym nie tylko ptaków i wymaga dalszych badań.

Krew do oznaczeń zmian długości telomerów była pobierana z dorosłych sikor w odstępie rocznym. Zmiany długości telomerów w tym czasie obejmują więc nie tylko niewiele ponad miesięczny okres lęgowy, ale i wszelkie inne koszty życia przez blisko 11 pozostałych miesięcy. W niedawno opublikowanych badaniach nad mewą trójpalczastą (Schulter et al. 2014, Biol. Lett. 10: 20130889) wykazano, że skracanie telomerów w przeciągu roku zależy nie tylko od wysiłku reprodukcyjnego (proporcjonalnie), ale także, w co najmniej równym stopniu (odwrotnie proporcjonalnie), od czasu spędzonego na obfitym w pokarm zimowisku. Chciałbym więc prosić Doktorantkę, by w czasie obrony skomentowała, jak czas między pobieraniem prób krwi u sikor mógł wpłynąć na wyniki i czy ewentualne różnice między płciami w zachowaniu poza sezonem rozrodczym nie mogły wpłynąć na stwierdzone różnice w skracaniu się telomerów między samcami i samicami, obserwowane w obu grupach eksperymentalnych.

Trzecia z kolei praca poświęcona jest testowaniu hipotezy, że fizjologicznym mechanizmem leżącym u podstaw kosztów reprodukcji jest zarówno skracanie się telomerów, jak i stres oksydacyjny. Akumulowanie się uszkodzeń oksydacyjnych, podobnie jak skracanie telomerów, może prowadzić do starzenia się, a efekt ten powinien być wzmacniany przez wysokie wydatki energetyczne związane z reprodukcją. Uwzględnienie stresu oksydacyjnego jest podwójnie uzasadnione; po pierwsze, badania nad znaczeniem stresu oksydacyjnego w reprodukcji dały dotąd bardzo niejednoznaczne wyniki; po drugie, reaktywne formy tlenu, poza uszkodzeniami tkanek i DNA, mogą same uszkadzać telomery i prowadzić do ich skrócenia. W pracy tej Doktorantka manipulowała w laboratorium wielkością lęgu zeberki i dodatkowo, dla zwiększenia obciążenia, zastosowała niską temperaturę w pomieszczeniu, gdzie ptaki były przetrzymywane.

Tak jak w poprzedniej pracy, tak i tu eksperyment został perfekcyjnie przeprowadzony. Doktorantka wykazała, że choć długość telomerów zmniejsza się z czasem, to powiększenie lęgu nie miało wpływu na ten proces. Badane parametry stresu oksydacyjnego nie potwierdziły jego obecności, przy czym w trakcie reprodukcji wzrosła u zeberki obrona antyoksydacyjna. Bardzo ciekawym i cennym wynikiem jest stwierdzenie, że skrócenie telomerów może nastąpić już po około dwóch miesiącach. W większości prac stwierdzano takie zmiany w okresie roku.

Autorka podała szereg wyjaśnień braku wpływu dodatkowego obciążenia na długość telomerów i stres oksydacyjny. Przekonującym argumentem jest to, że zeberki są oportunistami i zmuszane do dodatkowego wysiłku, poświęcają kondycję piskląt, chroniąc swoją własną, co potwierdził eksperyment.

Doktorantka, szukając wytłumaczenia swoich wyników, przywołuje przeglądową pracę Speakmana i Garratta (2014) i podaje za tymi autorami, że produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) nie musi być proporcjonalna do tempa metabolizmu, a wręcz wysokie tempo metabolizmu może wiązać się z obniżoną produkcją ROS. Jest to nietrafny argument. Według mojej wiedzy, sytuacji takiej nie stwierdzono nigdy u zwierząt w czasie reprodukcji. Wyniki cytowane przez Speakmana i Garratta pochodzą z badań nad myszami, u których mechanizmem odpowiedzialnym jest rozprężenie oksydacyjnej fosforylacji na skutek działania białek UCP2 i UCP3, katalizujących przeciek elektronów i powodujące spadek emisji ROS z mitochondriów. Tymczasem w czasie laktacji u

myszy ilość UCP3 zmniejsza się, a UCP2 pozostaje bez zmian. Nie może więc to być wytłumaczeniem braku stresu oksydacyjnego nawet u ssaków, a tym bardziej u ptaków.

W badaniu stresu oksydacyjnego Doktorantka zastosowała dwa parametry. Test OXY określa całkowitą zdolność antyoksydacyjną, a więc obronną osocza krwi. Drugi test, dROM, określa nie tyle uszkodzenia oksydacyjne, jak twierdzi Autorka, a raczej właściwości oksydacyjne osocza. Co prawda w teście tym wykorzystuje się wodoronadtlenki (hydroperoxides), powstałe w osoczu na skutek działania ROS na bardzo wczesnym etapie kaskady oksydacyjnej, to istotą testu jest oznaczenie oksydacyjnych właściwości wodoronadtlenków i powstałych z nich rodników. Wyniki tego testu są przedstawiane jako ekwiwalent stężenia nadtlenu wodoru, który też jest reaktywną formą tlenu. Uważam więc, że nie w pełni właściwe jest stwierdzenie Autorki iż „we were not able to detect the cost of reproduction in terms of oxidative damage”. Szkoda natomiast, że uszkodzenia oksydacyjne nie były badane, bo to one w ostatecznym rozrachunku decydują o konsekwencjach dla organizmu i kosztach reprodukcji. Także we krwi można określić np. uszkodzenia białek, oznaczając grupy karbonylowe lub ubytek grup tiolowych. Nie zmienia to jednak faktu, że przedstawione wyniki (brak zmian w oksydacyjnych właściwościach osocza przy wzroście obrony) przekonują mnie, że reprodukcja u tego gatunku nie wiąże się ze stresem oksydacyjnym. Jest to więc kolejny argument za tym, że to nie stres oksydacyjny leży u podstaw kosztów reprodukcji.

Chciałbym jednak, aby Doktorantka w trakcie obrony pracy ustosunkowała się do pytania, czy brak oznak stresu oksydacyjnego nie mógł wynikać z zastosowanej w eksperymencie diety, znacznie wzbogaconej w antyoksydanty. Zwłaszcza witamina C oraz karotenoidy, które były dostarczane zeberkom, mogą potencjalnie odgrywać znaczącą rolę w neutralizowaniu reaktywnych form tlenu.

Podsumowując, jestem pełen uznania dla dokonań mgr Joanny Sudyki. Trzy prace wchodzące w skład rozprawy są istotnym i pionierskim wkładem w zrozumienie znaczenia dynamiki telomerów i wskazują, że właśnie skracanie się telomerów może być mechanizmem tłumaczącym koszty reprodukcji. Bardzo ciekawe jest przy tym zestawienie dwóch gatunków: sikory (koszty dodatkowego obciążenia ponoszone przez rodziców) i zeberki (oportunistyczne gniazdowanie i koszty przeniesione na pisklęta). Takie zróżnicowanie wskazuje na potrzebę badań gatunków o różnych historiach życia. Prace te wytyczają więc kierunek dalszych badań, koniecznych dla potwierdzenia roli telomerów w kompromisie między wysiłkiem reprodukcyjnym a przeżywaniem i długością życia. Natomiast badania Autorki nad stresem oksydacyjnym są kolejnym argumentem, kładącym powątpiewać w jego istotną rolę w reprodukcji. Chciałbym tu podkreślić dużą sprawność warsztatową mgr Joanny Sudyki, bardzo dobre opanowanie metod statystycznych oraz literatury tej bardzo szybko rozwijającej się dziedziny.

Oceniam pracę mgr Joanny Sudyki jako spełniającą wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym wymienione w Ustawie z 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz Ustawie z dnia 18.03.2011 o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym. Z pełnym przekonaniem proszę Radę Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy.

Białystok, dnia 19 lipca 2016 r.



prof. dr hab. Jan R.E. Taylor