

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

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Jan Stanisława Boratyńskiego

pt. „Elastyczność fenotypowa mechanizmów produkcji i utraty ciepła, jej zmienność sezonowa oraz związek z heterotermią u małych gryzoni”

1. Ocena naukowego znaczenia tematyki rozprawy

Postępujące globalne zmiany klimatyczne sprawiają, że biologia ewolucyjna, w tym kluczowe dla niej pojęcie adaptacji staje się coraz istotniejszym elementem rosnącej liczby programów badawczych. W nurt ten wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska pana mgr Jan Stanisława Boratyńskiego, stawiająca sobie za cel poznanie mechanizmów dostosowania małych ssaków do zmian środowiskowych za pośrednictwem modulowania tempa wydatkowania energii i związanych z tym cech biologicznych. Mechanizmy te zyskują na biologicznym znaczeniu, gdyż zmiany klimatyczne będą manifestować się nie tylko przesuwaniem się średnich temperatur, ale przede wszystkim ich rosnącą amplitudą sprawiającą, że zwierzęta będą coraz częściej eksponowane na rozszerzający się zakres czynników środowiskowych. Zatem określenie ich zdolności adaptacyjnych będzie kluczowe dla zrozumienia i przewidywania następstw perturbacji klimatycznych, na przykład w odniesieniu wielu gatunków chronionych bądź istotnych z ekonomicznego punktu widzenia.

Przedstawione w rozprawie rezultaty badań i sformułowane na ich podstawie konkluzje wskazują na istnienie sezonowego zróżnicowania plastyczności mechanizmów produkcji ciepła małych ssaków. Mogą więc mieć one znaczenie adaptacyjne. Ponadto zakresy norm reakcji cech związanych z termogenezą okazały się być powtarzalne na poziomie osobniczym co sugeruje, że są one determinowane genetycznie i szerzej—że mogą podlegać doborowi naturalnemu. Uznając zasadność i doniosłość tych konkluzji muszę jednak zaznaczyć, że w trakcie lektury dysertacji natknąłem się na szereg wątpliwości natury technicznej i interpretacyjnej, które specyfikuję poniżej.

2. Szczegółowa analiza osiągniętych rezultatów i poprawności wnioskowania

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej J. Boratyńskiego stanowią trzy artykuły opublikowane w cenionych, międzynarodowych czasopismach naukowych. Odniosę się do nich zgodnie z kolejnością zamieszczenia w drukowanej wersji dysertacji, poczynając od artykułu Boratyński, J. S., Jefimow, M., & Wojciechowski, M. S. (2016). (Phenotypic flexibility of energetics in acclimated Siberian hamsters has a narrower scope in winter than in summer. Journal of

Comparative Physiology B, 186, 387-402). Praca ta dokumentuje zmienność sezonową plastyczności fenotypowej chemiczników dżungarskich aklimowanych do warunków zimowych i letnich. Choć najważniejsze wnioski zawarte w tym artykule są w mojej ocenie dobrze podparte uzyskanymi rezultatami, to kilka aspektów relacjonowanego w nim eksperymentu budzi moje wątpliwości, które pozwolę sobie ująć w następujących punktach:

1. Cały eksperyment (aklimacja do warunków zimowych, a potem letnich) w sumie trwał prawie 10 miesięcy. Zasadnym jest więc pytanie o wpływ wieku na uzyskane wyniki. Warto na przykład zauważyć, że w czasie pomiarów letnich zwierzęta były średnio o 10 g (czyli co najmniej 20%) cięższe niż zimą (Suplement, Tabela 1a). Czy zwiększenie labilności BMR i fNST (Ryc. 5) nie jest więc po prostu przejawem osłabiającej się z wiekiem zdolności do kontrolowania tempa metabolizmu? Co więcej, przy zastosowanym schemacie eksperymentu efekt aklimacji był spleciony z efektem starzenia i wzrostu masy ciała w sposób nie dający się oddzielić metodami statystycznymi. Można ten problem zilustrować odwołując się na przykład do Ryc. 3a. Widać na niej, że zakresy zmienności masy ciała dla osobników badanych zimą i latem zachodzą na siebie jedynie w niewielkim stopniu. Dlatego też wartość eksplanacyjna informacji o braku interakcji między masą (a przy tym wiekiem) i tempem metabolizmu jest wątpliwa, gdyż opiera się na założeniu identyczności nachyleń linii trendów we wspólnym zakresie zmienności, który w tym przypadku jest bardzo wąski. Co prawda Autorzy dyskutują problem ewentualnego wpływu wieku konkludując, że był on nieistotny, jednakże ze względu na przedstawione wyżej wątpliwości ich argumentację trudno uznać za opartą na przekonujących rezultatach.
2. Temperatura 28°C wykracza poza zakres temperatur zimowych. Doceniam pomysł doktoranta polegający na wystawieniu zwierząt na działanie czynników usytuowanych poza normę reakcji, ale wydaje mi się, że zastosowana temperatura leży tak daleko od granic zakresu naturalnych temperatur zimowych, że rodzi pytanie o biologiczną interpretację uzyskanych wyników, które mogą być bliższe patologicznej, niż fizjologicznej reakcji na działanie stresu termicznego. Czy odstające obserwacje na Ryc. 4a nie są aby pomiarami wykonanymi na zwierzętach eksponowanych do 28°C? Wiąże się z tym niejasna w moim mniemaniu interpretacja zakres zmienności indeksu heterotermii (Fig. 4) który okazał się znacznie większy zimą, niż latem. Jak się to ma do wniosku o większej zmienności fenotypowej w sezonie letnim? Odpowiedź na to pytanie byłaby być może łatwiejsza, gdyby doktorant przeprowadził analizę zależności między BMR/fMMR a temperaturą ciała. Tej się jednak w omawianej publikacji nie doszukałem.
3. Przewodność nie różniła się między zwierzętami aklimowanymi do warunków zimowych i letnich, choć było to jednym z przewidywanych efektów eksperymentu. Czy nie wskazuje to na nieefektywność aklimacji, a przez to słabość fizjologicznej odpowiedzi do jej warunków? Rozstrzygające w tym względzie byłoby zmierzenie wartości izolacyjnej integumentu (futerka) letniego i zimowego, ale takich pomiarów nie przeprowadzono.

4. W opisie metod brakuje informacji na temat tempa przepływu powietrza przez komory metaboliczne, co uniemożliwia wyrobienie sobie poglądu na temat precyzji pomiaru tempa wymiany gazowej zwierząt. Jest to istotny problem techniczny, szeroko omawiany w starszej literaturze przedmiotu (na przykład w dobrze zapewne znanym doktorantowi podręczniku Johna Lightona z 2008 r.) i szczególnie ważny w odniesieniu do pomiaru tempa produkcji CO₂ oraz pomiarów maksymalnego tempa metabolizmu tlenowego. Oczekiwałam odniesienia się doktoranta do tej kwestii.
5. Znacząca część dyskusji dotyczy zmian masy ciała, w tym jego kompozycji. Szkoda, że nie przeprowadzono szczegółowych badań składu masy (na przykład wielkości organów wewnętrznych, proporcji białka i tłuszczu), nie mówiąc już o analizie na poziomie molekularnym (aktywności kluczowych enzymów łańcucha oddechowego, ilości białek rozprzegających UCP1 odpowiedzialnych za generowany fNST, itp.). Tę uwagę chciałbym rozszerzyć na obie pozostałe publikacje. Siła wnioskowania opartego wyłącznie na badaniu cech na poziomie organizmalnym jest ograniczona. Proponowałbym, w przyszłych badaniach podjąć trud włączenia markerów molekularnych analizowanych mechanizmów, które pozwolą na bezpośredni wgląd w analizowane procesy na poziomie proksymalnym. Zwiększy to wiarygodność uzyskanych wyników, a tym samym ułatwi ich ogłaszanie w periodykach naukowych coraz mniej chętnie akceptujących prace oparte jedynie na pomiarze tempa metabolizmu i zgrubnych cechach fenotypowych.
6. Doktorant wpisał się niestety w modny trend polegający na odnoszeniu uzyskanych wyników badań do równań allometrycznych wyliczanych najczęściej dla dużych międzygatunkowych zestawów danych (w jego przypadku było to równanie podane przez Lovegrova 2000). Nie bardzo rozumiem, czemu ten zabieg miał służyć, gdyż, podobnie jak u wielu innych stosujących go badaczy nie przyniósł on istotnej informacji, poza trywialnym stwierdzeniem, że chomiczniki plasują się poniżej linii trendu.

Publikacja 2. Boratyński, J. S., Jefimow, M., & Wojciechowski, M. S. (2017). Individual differences in the phenotypic flexibility of basal metabolic rate in Siberian hamsters are consistent on short-and long-term timescales. *Physiological and Biochemical Zoology*, 90, 139-152.

Druga w kolejności publikacja składająca się na dysertację J. Boratyńskiego prezentuje analizę krótko- i długookresowej powtarzalności osobniczej podstawowego tempa metabolizmu i jego plastyczności fenotypowej. W odniesieniu do tej publikacji pozwolę sobie sformułować następujące uwagi:

1. Szacowanie powtarzalności w warunkach laboratoryjnych pozwala na dosyć ograniczone wnioskowanie ze względu na sztucznie zaniżoną zmienność środowiskową. Należy pamiętać, że odziedziczalność badanej cechy (której przybliżeniem bywa powtarzalność) jest silnie zależna od czynników środowiskowych.

Stąd też bezpośrednio odnoszenie laboratoryjnych oszacowań powtarzalności do warunków naturalnych obarczone jest dużą niepewnością. Tym nie mniej, przy braku możliwości oceny powtarzalności w warunkach naturalnych z pewnością warto ją analizować w populacjach hodowlanych, jak też uczynił doktorant.

2. Tym razem autorzy podają wielkość przepływu powietrza przez komorę metaboliczną, która wynosiła $400 \text{ cm}^3/\text{min}$ przy jej objętości równej $0,85 \text{ L}$. Budzi to moje zastrzeżenie co do dokładności pomiaru, gdyż mogło mieć na nie wpływ niewystarczające mieszanie gazów, do czego odnosiłem się omawiając artykuł nr. 1.
3. Do oszacowania statystycznej istotności powtarzalności badanych cech doktorant zdecydował się użyć współczynnika korelacji wewnątrzklasowej τ wyliczanej zgodnie z rekomendacjami sformułowanymi w klasycznej pracy Lessells i Boag (1987). Problem w tym, że rekomendacje te są łatwe do zastosowania w odniesieniu do stosunkowo prostych modeli statystycznych, w których łatwo jest zidentyfikować komponenty wariancji odnoszące się do zmienności wewnątrz- i międzyosobniczej. Znacznie trudniejsze jest dokonanie tego w modelach mieszanych, gdzie te oszacowania muszą uwzględniać komponenty wariancji związane np., interakcją zachodzącą między wpływem czasu i zmianą warunków pomiaru. Niestety, w omawianej publikacji brak jest szczegółowych informacji o tym, jakie komponenty zastosowanego modelu statystycznego zostały użyte do oszacowania składowych wariancji użytych do wyliczenia τ . W związku z tym trudno mi się w jednoznaczny sposób odnieść do poprawności tych rachunków. Bardziej zasadne i przejrzystsze wydaje mi się oszacowanie istotności powtarzalności badanych cech bezpośrednio w modelu statystycznym, poprzez analizę istotności komponentu związanego z wariancją cech wynikających ze zmienności osobniczej (kodowanej przez doktoranta jako zmienna ID). Co prawda nie daje to możliwości oceny wartości τ , ale ze względu na brak prostej interpretacji tego parametru nie jest to znaczącym uszczerbkiem.
4. Zmienność BMR była szacowana poprzez wyliczenie jego różnicy między poszczególnymi temperaturami pomiaru (ΔBMR), które następnie użyte zostały jako dane wyjściowe do dalszych analiz. Takie podejście obarczone jest istotną nieścisłością wynikającą z obciążenia każdego pomiaru BMR błędem pomiarowym, który następnie nie jest uwzględniany w dalszych wyliczeniach. O ile w przypadku użycia pojedynczych pomiarów jako danych wyjściowych problem ten jest zwykle zaniedbywalny, to przy stosowaniu danych złożonych (takich jak ΔBMR) może on być istotny, gdyż zgodnie z zasadą propagacji błędów wariancja błędu oszacowania różnicy pomiarów równa jest sumie wariancji poszczególnych składowych oraz ich kowariancji. Propagacja błędów w trudnym do oszacowania stopniu mogła wpłynąć na zastosowane przez doktoranta wnioski statystyczne. Dlatego też we własnej praktyce staram się unikać używania wyjściowych danych będących efektem przekształceń matematycznych wielu zmiennych o nieustalonej strukturze błędów pomiarowych.

Publikacja 3: **Boratyński, J. S.**, Jefimow, M., & Wojciechowski, M. S. (2017). Melatonin attenuates phenotypic flexibility of energy metabolism in a photoresponsive mammal. *Journal of Experimental Biology*, doi: 10.1242/jeb.159517.

Najnowsza publikacja wchodząca w skład ocenianej dysertacji przedstawia wyniki ciekawego eksperymentu, którego celem było przetestowanie wpływu melatoniny na funkcjonowanie osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej i zakres plastyczności fenotypowej BMR. Praca ta przynosi więc rezultaty wyjaśniające proksymalny mechanizm hormonalny, o potencjalnym znaczeniu adaptacyjnym. Chciałbym jednak zauważyć, że różnice między grupą kontrolną i eksperymentalną w zmianach BMR spowodowanych melatoniną sięgały tylko ok. 3,5%. Informacja ta jest w pracy nieco ukryta w dyskusji, gdzie Autorzy przywołują tempo zmian BMR z temperaturą (odpowiednio w grupie kontrolnej 0,6% i eksperymentalnej-- 0,8% na 1°C, czyli różnica między grupami wynosiła ok. 0,2% na 1°C), przy różnicy temperatur równej 18°C (zatem $\sim 0,2\% \times 18 = 3,6\%$). Nikłość tej różnicy znajduje odzwierciedlenie w marginalnej istotności statystycznej interakcji efekt melatoniny x temperatura aklimacji, $P=0,04$, (Tabela 3). Wydaje mi się zatem, że znaczenie MEL, przynajmniej w odniesieniu do plastyczności BMR jest mniejsze, niż twierdzą Autorzy.

Forma prezentacji rozprawy

Pod względem redakcyjnym i estetycznym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń. Najważniejsze rozdziały składające się na dysertację są *de facto* wydrukami trzech opublikowanych już anglojęzycznych artykułów naukowych, w których nazwisko doktoranta otwiera listę autorską. Jego udział w pisaniu tekstów publikacji jest sięga 60%, zatem był znaczący. Poprzedzające je polskojęzyczne omówienie rezultatów jest siłą rzeczy wtórne względem treści zawartych w publikacjach i być może mogło by się ograniczyć do ich streszczenia.

Wnioski końcowe

Wartość naukową dysertacji oceniam wysoko, gdyż podjęta w niej tematyka plasuje się w centrum niezwykle ważnego kierunku badań światowej biologii, który dopiero od niedawna uprawiany jest również w Polsce. Rozprawa mgr Jana Boratyńskiego jest oryginalnym dziełem spełniającym warunki wymagane do uzyskania stopnia doktora. W tym miejscu chciałbym jeszcze raz zaznaczyć, że sformułowane tu uwagi nie podważają zasadności podejścia badawczego przyjętego przez doktoranta, a raczej wskazują na jego niepełność w kontekście tego, co wydaje mi się w fizjologii najważniejsze— wskazywania tam, gdzie jest to możliwe, proksymalnych zależności przyczynowo- skutkowych. Prezentowane badania, choć cenne, uznaję zatem za wstępny etap na drodze do funkcjonalnego poznania podłoża procesu darwinowskiej adaptacji cech fizjologicznych do nasilających się globalnych zmian klimatycznych.

Z przekonaniem wnoszę o dopuszczenie mgr Jana S. Boratyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Konarzewski

Białystok, 19.09.2017

Prof. dr hab. Marek Konarzewski