

AUTOREFERAT

dr Aneta Książek

Instytut Biologii
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Uniwersytet w Białymstoku

Białystok 2017

IMIĘ i NAZWISKO: Aneta Książek

ADRES: Instytut Biologii, ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

tel. +48 85 738 84 08, fax +48 85 738 84 14

e-mail: anetak@uwb.edu.pl

ROZWÓJ NAUKOWY:

- 1998** **magister biologii**
Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Biologii
Tytuł pracy magisterskiej: Związek między maksymalnym i podstawowym
tempem metabolizmu oraz masą narządów wewnętrznych u myszy
laboratoryjnej *Mus musculus*
promotor: prof. dr hab. Marek Konarzewski
- 2005** **doktor nauk biologicznych**
Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Instytut Biologii
Tytuł pracy doktorskiej: Energetyczne koszty odpowiedzi immunologicznej u
myszy laboratoryjnej
promotor: prof. dr hab. Marek Konarzewski

PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ:

- 1998 - 1999** Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w
Białymstoku, asystent-stażysta
- 1999 - 2006** Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w
Białymstoku, asystent
- 2006 -** Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w
Białymstoku, adiunkt

I. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ DO UBIEGANIA SIĘ O STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA HABILITOWANEGO

Jako osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zmianami w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311), wskazuję cykl pięciu oryginalnych publikacji o wspólnym tytule:

A) tytuł osiągnięcia naukowego:

Współzależność tempa metabolizmu, immunokompetencji i przeżywalności zimowej drobnych ssaków

B) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego¹ i będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego:

- 1. Książek A., Czerniecki J., Konarzewski M. 2009. Phenotypic flexibility of traits related to energy acquisition in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). Journal of Experimental Biology 212: 808-814.**
IF: 3,320; MNiSW: 35; udział 60%
- 2. Książek A., Konarzewski M. 2012. Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. Physiological and Biochemical Zoology 85:51-61.**
IF: 2,104; MNiSW: 35; udział 70%
- 3. Książek A., Zub K., Szafrąńska P. A., Wieczorek M., Konarzewski M. 2014. Immunocompetence and high metabolic rates enhance overwinter survival in the root vole, *Microtus oeconomus*. Biology Letters 10, 20140684.**
IF: 3,089; MNiSW: 30; udział 50%
- 4. Książek A., Konarzewski M. 2016. Heat dissipation does not suppress an immune response in laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). Journal of Experimental Biology 219: 1542-1551.**
IF: 3,320; MNiSW: 35; udział 70%
- 5. Książek A., Zub K., Szafrąńska P. A., Wieczorek M., Konarzewski M. 2017. The nexus of hair corticosterone level, immunocompetence, metabolic rates and overwinter survival in the root vole, *Microtus oeconomus*. General and Comparative Endocrinology 250: 46-53.**
IF: 2,585; MNiSW: 25; udział 50%

¹ W całym dokumencie numeracja zgodna z numeracją w Załączniku nr 4.

Łączna liczba punktów przypadająca za prace stanowiące osiągnięcie naukowe w przewodzie habilitacyjnym wg listy MNiSW² wynosi **160 pkt.**; sumaryczny *Impact Factor*³: **14,418**.

C) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Wydatki energetyczne przeznaczane na podtrzymanie istotnych funkcji życiowych kwantyfikowane są poprzez pomiary tempa metabolizmu (przegląd w Lighton 2008). W moich badaniach skupiłam się na tempie metabolizmu podstawowego (BMR, *basal metabolic rate*), które według definicji zaproponowanej przez Schmidt-Nielsen (1997) określa minimalne tempo produkcji energii niezbędnej do utrzymania podstawowych funkcji życiowych osobnika znajdującego się w stanie czuwania, który nie trawi pokarmu, nie jest aktywny fizycznie i przebywa w warunkach środowiska mieszczących się w zakresie jego strefy termoneutralnej. Na poziomie międzygatunkowym BMR koreluje z innymi miarami tempa metabolizmu (w tym całkowitymi wydatkami energetycznymi i chwilowym, maksymalnym tempem metabolizmu np. White i Kearney 2012), a także z parametrami modulującymi najważniejsze procesy fizjologiczne np. poziomem hormonów (np. Li i in. 2010).

W artykułach wskazanych jako osiągnięcie w przewodzie habilitacyjnym testowałam **zależności między BMR a krótkotrwałymi wydatkami maksymalnymi (PMR, *peak metabolic rate*), plastycznością fenotypową narządów wewnętrznych, immunokompetencją, poziomem stresu i przeżywalnością zimową na poziomie gatunku**. Są co najmniej trzy zasadnicze powody takiego podejścia. Porównania wewnątrzgatunkowe dają większe szanse na wnioskowanie o kierunku ewolucji badanych cech, ponieważ zachodzi ona na poziomie zmienności w obrębie gatunku (populacji), a nie na poziomie międzygatunkowym. Po drugie, opierając się na porównaniach wewnątrzgatunkowych unika się potencjalnych błędów we wnioskowaniu wynikających z wpływu filogenezy na analizowane cechy, a te zwykle towarzyszą porównaniom międzygatunkowym (Garland i in. 1999). Po trzecie, nowoczesne rozwiązania techniczne stosowane w pomiarach BMR znacznie ograniczyły zakres błędów pomiarowych (Konarzewski i in. 2005) i umożliwiły wykazanie osobniczej powtarzalności BMR (przegląd w Nespolo i Franco 2007). To mocny argument za tym, by wykorzystać wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie BMR do testowania związków między nim a międzyosobniczym zróżnicowaniem np. zasadniczych składowych budżetów energetycznych, metabolicznych kosztów utrzymania narządów wewnętrznych determinujących wydatki energetyczne, metabolicznych kosztów immunokompetencji, a w ostatecznym rozrachunku także związku wszystkich tych cech z przeżywalnością.

Dogodną okolicznością umożliwiającą podjęcie takiej tematyki badawczej stało się moje zaangażowanie w prowadzenie eksperymentu selekcyjnego, którego efektem jest

² Zgodnie z Komunikatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12.12.2016 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych.

³ Współczynnik wpływu IF podany dla roku 2016.

uzyskanie dwóch unikatowych linii myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*) charakteryzujących się niskim (linia L-BMR) lub wysokim (H-BMR) tempem metabolizmu podstawowego (Książek i in. 2004). Punktem wyjścia do rozpoczęcia badań z wykorzystaniem tego modelu zwierzęcego była ocena wstępnych efektów sztucznej presji selekcyjnej. Wyniki te stanowiły część mojej rozprawy doktorskiej (praca nr 3 i 4, rozdział II.A w Załączniku nr 4). W tym miejscu odwołam się tylko do tych rezultatów, które były najważniejsze z punktu widzenia zasadności podjęcia badań opisanych w tym rozdziale. Wykonane analizy pokazały, że zastosowana procedura selekcyjna doprowadziła to ujawnienia się 30% międzyliniowej różnicy w BMR (na chwilę obecną różnica ta sięga około 50%). Co ważne, międzyliniowe różnice w BMR okazały się być genetycznie skorelowane z różnicami w masie organów wewnętrznych (jelita cienkiego, wątroby, nerek i serca) bezpośrednio zaangażowanych w przyswajanie pokarmu i przetwarzanie energii, jak również z około 10% różnicą w ilości konsumowanego pokarmu. Wykonane analizy potwierdziły też, że BMR jest cechą powtarzalną i odziedziczoną (przegląd w Konarzewski i Książek 2013). Nie ma zatem lepszego sposobu na testowanie związków między wewnątrzgatunkową zmiennością w BMR oraz cechami wpływającymi na dostosowanie i kształtującymi historię życiową organizmów niż wykorzystanie modelu zwierząt o genetycznie uwarunkowanej międzyliniowej różnicy w podstawowych wydatkach energetycznych ponoszonych na utrzymanie czynności życiowych.

Spośród pięciu prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe w przewodzie habilitacyjnym, trzy prezentują wyniki badań, które przeprowadziłam w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem opisanego powyżej modelu. W pracy nr [1] wykazałam, że wysoki BMR i duża masa narządów aktywnych metabolicznie przekładają się na większą wydolność zapasową oraz plastyczność fenotypową tych narządów w odpowiedzi na nagłe pojawienie się stresu zimna (5°C). W pracy nr [2] pokazałam, że stres środowiskowy w postaci 30% ograniczenia ilości konsumowanego pokarmu powoduje immunosupresję, przy czym nawet w tych okolicznościach osobniki z wysokim BMR budują silniejszą odpowiedź humoralną niż te, które charakteryzują się niskim tempem metabolizmu. W pracy nr [4] pokazałam, że oddawanie ciepła u osobników z wysokim BMR i utrzymujących wyższą temperaturę ciała nie jest czynnikiem ograniczającym wielkość wydatków energetycznych przeznaczanych na rozwój odpowiedzi humoralnej, ponieważ nawet w warunkach stresu cieplnego (34°C) nie dochodziło do jej supresji. Podsumowując, powyższe prace pokazują, jak zmienność BMR wiąże się ze zdolnością do kompensacji zarówno nagłego, jak i długotrwałego stresu metabolicznego.

Ponieważ badania laboratoryjne prowadzone są w kontrolowanych i przewidywalnych warunkach, na ich podstawie można jedynie przypuszczać, jak współzależność cech fizjologicznych wpływa na przeżywalność - obok reprodukcji najważniejszego parametru darwinowskiego dostosowania (Stearns 2002). Odpowiedzi na pytania o rzeczywistą istotność biologiczną zmienności tempa metabolizmu i cech z nim związanych można poszukiwać tylko w badaniach terenowych obejmujących monitorowanie zwierząt w ich naturalnym środowisku. By sprostać temu wyzwaniu skompletowałam obszerną bazę danych obejmującą nie tylko dane z pomiarów tempa metabolizmu, ale przede wszystkim informacje o

śmiertelności osobniczej norników północnych (*Microtus oeconomus*). Prace terenowe przeprowadziłam na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego, przy wykorzystaniu zaplecza technicznego, jakie oferuje Stacja Terenowa Instytutu Biologii UwB zlokalizowana we wsi Gugny. Informacje skompletowane w ciągu 3 kolejnych sezonów odłowów posłużyły mi do przygotowania pracy nr [3], w której analizowałam międzyosobnicze zróżnicowanie BMR i PMR (ponieważ indywidualne zróżnicowanie bilansowania budżetu energetycznego oraz maksymalnych wydatków energetycznych wskazywane są jako przyczyny dziesiątkowania populacji drobnych ssaków podczas zimy np. Aars i Ims 2002, Ergon i in. 2004, Zub i in. 2014), jak również immunokompetencji i poziomu zapasozyczenia (ponieważ zapasozyczenie w znaczący sposób wpływa na przeżywalność, a rozwinięcie odpowiedzi immunologicznej przeciw pasożytom jest kosztowne energetycznie np. Lee i Klasing 2004, Lee 2006, Burthe i in. 2008, Kloch i in. 2012). W następnej kolejności badałam, czy zależności między BMR, PMR, immunokompetencją i zapasozyczeniem mają łączny wpływ na zimową przeżywalność norników. Uzyskane wyniki wykorzystałam w pracy nr [5] i testowałam wpływ kortykosteronu na wyżej wymienione cechy. Oprócz kortyzolu, kortykosteron to główny hormon uwalniany przez gryzonia w odpowiedzi na stres środowiskowy, któremu dodatkowo przypisuje się silne działanie immunomodulacyjne (Davis i in. 2008, Demas i in. 2010).

Wyniki opublikowane w pracy nr [1] zebrałam w eksperymencie przeprowadzonym z wykorzystaniem środków finansowych przyznanych mi przez KBN (pkt. 3, rozdział II.I w Załączniku nr 4). Badania opisane w pracy nr [2] i [4] wykonałam dzięki wykorzystaniu środków finansowych z dotacji statutowej przyznanej przez MNiSW. Dane opublikowane w pracy [3] i [5] zebrałam podczas realizacji grantu badawczego, który finansowany był ze środków przyznanych mi przez MNiSW (pkt. 4, rozdział II.I w Załączniku nr 4).

Szczegółowe omówienie hipotez testowanych w poszczególnych pracach i uzyskane wyniki

Książek A., Czerniecki J., Konarzewski M. 2009. Phenotypic flexibility of traits related to energy acquisition in mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *Journal of Experimental Biology* 212: 808-814 [1]

Plastycznością fenotypową nazywa się zdolność organizmu do odwracalnego modulowania cech (fenotypu) w odpowiedzi na działanie czynników środowiskowych (Roff 2002, Piersma i Drent 2003, Pigliucci 2005). Ponieważ plastyczność fenotypowa cech wpływa na dostosowanie osobnika, czynniki od których zależy wielkość tej plastycznej reakcji są obecnie jednym z intensywnie dyskutowanych zagadnień w biologii ewolucyjnej (Piersma i van Gils 2010, Moczek i in. 2011, Laland i in. 2014, Noble i in. 2014). Jako szczególnie istotną dla dostosowania wskazuje się plastyczność fenotypową przewodu pokarmowego, a w szczególności procesy związane z pozyskiwaniem pokarmu i produkcją energii (Karasov i Martinez del Rio 2007, Naya i in. 2008, Karasov i in. 2011, Vidal i in. 2014), które ostatecznie pozwalają sprostać nagłym i nieprzewidywalnym obciążeniom metabolicznym. Przypuszcza się, że fenotypowa reakcja na nagły stres środowiskowy wiąże się ze wzrostem konsumpcji

pokarmu i podniesieniem tempa produkcji energii zależnym od tzw. wydolności zapasowej (*immediate spare capacity*) układu pokarmowego, by w następnym etapie uzyskana energia mogła posłużyć do podniesienia tempa procesów fizjologicznych (Karasov i McWilliams 2005). Model, który zaproponował Karasov i McWilliams (2005) sugeruje, że głównym czynnikiem determinującym wielkość tej zapasowej wydolności przewodu pokarmowego (i tym samym plastyczności fenotypowej) jest masa organów wewnętrznych bezpośrednio zaangażowanych w procesy pozyskiwania i przetwarzania energii.

Ze względu na uwarunkowane genetycznie międzyliniowe różnice w konsumpcji pokarmu i masie narządów aktywnych metabolicznie opisane powyżej linie myszy są dogodnym obiektem do testowania tego modelu. **Celem pracy była więc odpowiedź na pytanie, czy plastyczność fenotypowa narządów wewnętrznych w reakcji na nagłą zmianę warunków środowiska jest determinowana przez osobniczy poziom BMR.** By wywołać nagły stres środowiskowy, myszy z obu linii selekcyjnych przeniosłam bez uprzedniej aklimacji z temperatury otoczenia 23°C do 5°C, gdzie przebywały odpowiednio 2, 4 lub 6 dni. Spodziewałam się, że z powodu posiadania mniejszych narządów (a zatem też mniejszej ich wydolności zapasowej), u myszy z linii L-BMR obserwować będę mniejszy wzrost tempa asymilacji energii (relatywnie do małych organów) w odpowiedzi na stres zimna w porównaniu do myszy z linii o wysokim BMR. Spodziewałam się też, że obciążenie metaboliczne (którego miarą jest konsumpcja pokarmu lub tempo asymilacji energii w przeliczeniu na masę poszczególnych organów) wymuszone nagłym wzrostem zapotrzebowania na energię będzie mniejsze u myszy z linii H-BMR z powodu większej masy ich narządów wewnętrznych. Zebrane dane pozwoliły mi na analizę międzyliniowych różnic w konsumpcji i strawności pokarmu, tempie asymilacji energii, masie organów aktywnych metabolicznie (jelicie cienkim, wątrobie, nerkach i sercu) i aktywności syntazy cytrynianowej - jednego z kluczowych enzymów cyklu Krebsa (Schaarschmidt i Jürss 2003, Tripathi i Verma 2004).

W odpowiedzi na ekspozycję do temperatury 5°C myszy z obu linii selekcyjnych zwiększyły 2-krotnie konsumpcję pokarmu w ciągu pierwszych 48 godzin, przy czym w ciągu całego eksperymentu utrzymywały się międzyliniowe różnice w konsumpcji - myszy z linii H-BMR jadły więcej niż osobniki z niskim BMR. Co ciekawe, w obu liniach selekcyjnych wzrost konsumpcji w zimnie korespondował z obniżeniem strawności pokarmu średnio o 25%. Spadek strawności był jednak większy u myszy z linii o niskim BMR. Wynik ten świadczy o niższej wydolności zapasowej narządów wewnętrznych myszy z linii L-BMR do odpowiedzi na stres metaboliczny. Poza tym, przy porównywalnej w obu liniach podwojonej konsumpcji pokarmu w 5°C, myszy charakteryzujące się niskim BMR miały wyraźnie mniejsze jelita cienkie, wątroby, nerki i serca w porównaniu do myszy z linii H-BMR. Oznacza to, że obciążenie metaboliczne organów wewnętrznych wynikające ze zwiększonego zapotrzebowania na energię powodowanego stresem zimna różniło się między liniami selekcyjnymi. Nawet jeśli myszy z linii L-BMR 'przyspieszały' pracę swoich organów w temperaturze 5°C, ich obciążenie metaboliczne było znacznie większe niż te obserwowane u myszy z linii o wysokim BMR. Myszy z linii L-BMR były bliskie osiągnięcia ujemnego bilansu

energetycznego. Myszy z wysokim tempem metabolizmu, większą masą organów i większą wydolnością zapasową tych organów były w stanie w tych samych warunkach konsumować i przetwarzać znacznie więcej pokarmu niż osobniki z niskim BMR.

Tempo asymilacji energii w pierwszych 2 dniach ekspozycji do 5°C wzrosło u myszy z obu linii selekcyjnych, przy czym to myszy z wysokim BMR lepiej radziły sobie z pozyskiwaniem energii z pokarmu. Wynik ten koresponduje z szybszym tempem przyswajania energii przez myszy z linii H-BMR obserwowanym w temperaturze 23°C. To sugeruje, że aktywność tkanek budujących wydolność zapasową poszczególnych organów w warunkach standardowych (23°C) jest proporcjonalna do całkowitej masy tych organów.

Wzrost konsumpcji pokarmu w 5°C korespondował ze wzrostem masy jelita cienkiego, nerek i serca. Masa narządów rosła w obu liniach selekcyjnych, ale wielkość tych zmian u myszy z linii L-BMR i H-BMR była podobna i proporcjonalna do międzyliniowych różnic obserwowanych w temperaturze 23°C. Dodatkowo, myszy z wysokim BMR charakteryzowały się też podwyższoną aktywnością syntazy cytrynianowej w wątrobie i nerkach obserwowaną w 5°C. Zatem plastyczność fenotypowa zarówno rozmiarów narządów wewnętrznych, jak i aktywności syntazy, była ściśle proporcjonalna do wielkości narządów sprzed działania stresu metabolicznego, co potwierdza założenia modelu zaproponowanego przez Karasova i McWilliamsa (2005). Moje wyniki sugerują, że zmienność BMR pozytywnie koreluje z indywidualnymi różnicami w wielkości wydolności zapasowej organów aktywnych metabolicznie, która to wydolność zwiększa aktywność funkcjonalną organów w odpowiedzi na nieoczekiwany stres metaboliczny.

Książek A., Konarzewski M. 2012. Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiological and Biochemical Zoology* 85:51-61 [2]

O ile w poprzedniej pracy testowałam kompromisy między zmiennością BMR, plastycznością fenotypową narządów wewnętrznych i adaptacją do warunków nagłego stresu środowiskowego, w tej pracy badałam kompromisy ujawniające się podczas działania stresu długoterminowego. Skupiłam się na energii - zasobie o jaki konkurują wszystkie funkcje fizjologiczne, w tym także odpowiedź immunologiczna. Do testowania kompromisu zastosowałam protokół polegający na ograniczeniu zwierzętom ilości dostępnego pokarmu (*dietary restriction*; DR). Aplikacja protokołu DR u linii myszy różniących się wielkością wydatków energetycznych potrzebnych na utrzymanie organizmu, które to wydatki dodatkowo skorelowane są z międzyliniowymi różnicami w masie organów aktywnych metabolicznie i konsumpcji pokarmu, umożliwiła demonstrowanie warunków ujawniania się kompromisu między immunokompetencją a innymi funkcjami organizmu. **Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy immunosupresja wywołana przez DR będzie wynikiem kompromisu energetycznego między kosztami rozwoju reakcji obronnej i kosztami utrzymania narządów wewnętrznych.** W tym celu myszy z obu linii selekcyjnych poddałam 4-

tygodniowemu reżimowi DR z ograniczonym o 30% dziennym spożyciem pokarmu. Po tym czasie indukowałam rozwój odpowiedzi humoralnej poprzez immunizację myszy antygenem KLH. Do analizy międzyliniowych różnic wywołanych przez DR zebrałam dane o poziomie specyficznych przeciwciał anti-KLH IgM, całkowitej liczbie leukocytów (WBC) i stosunku liczby neutrofilów do limfocytów (N/L), masie organów aktywnych metabolicznie i limfatycznych (węzłów chłonnych, śledziony i grasicy). Spodziewałam się zależnej od linii selekcyjnej alokacji energii z odpowiedzi immunologicznej na pokrycie kosztów utrzymania metabolicznie kosztownych organów wewnętrznych. Oczekiwałam, że immunosupresja będzie większa u myszy z wysokim BMR, ponieważ ze względu na posiadanie dużych narządów i duże wymagania energetyczne z tym związane kompromis między nimi a kosztami rozwoju reakcji obronnej łatwiej się ujawni.

Reżim pokarmowy spowodował supresję odpowiedzi humoralnej, ale spadek produkcji przeciwciał był taki sam u myszy z obu linii selekcyjnych. Redukcji poziomu przeciwciał nie towarzyszyła zmiana wartości wskaźnika WBC i N/L. Niezależnie od efektu DR, myszy z wysokim BMR charakteryzowały się wyższą odpowiedzią na antygen KLH i większą liczbą leukocytów we krwi. Inaczej niż w przypadku immunosupresji, reżim pokarmowy spowodował zależną od linii selekcyjnej redukcję masy organów limfatycznych. Spadek masy śledziony i węzłów chłonnych był większy u myszy z linii H-BMR, a masa grasicy bardziej zmalała u myszy z niskim BMR.

Zastosowany reżim spowodował też redukcję masy wątroby, nerek i serca. Co ciekawe, masa jelita cienkiego okazała się być istotnie większa u myszy z grupy DR. Taka reakcja sugeruje wzrost efektywności trawienia pokarmu w sytuacji, gdy dostarczany jest on w ograniczonej ilości. Wynik ten koresponduje z obserwowanym tylko w grupie poddanych reżimowi DR i immunizowanych myszy wzrostem masy wątroby - narządem produkującym białka odpornościowe, w tym także przeciwciała. Brak interakcji między reżimem DR i linią selekcyjną sugeruje, że odpowiedź metaboliczna jelita cienkiego, wątroby i pozostałych narządów na DR była podobna w obu liniach selekcyjnych i korespondowała z brakiem międzyliniowych różnic w redukcji odpowiedzi humoralnej wywołanej DR.

Wbrew oczekiwaniom, odpowiedź immunologiczna w grupie zwierząt poddanych reżimowi pokarmowemu była wyższa u osobników charakteryzujących się wysokim BMR. Uzyskany wynik sugeruje, że nawet jeśli odpowiedź humoralna przeciw antygenowi KLH była kosztowna, co pokazała immunosupresja w grupie DR, to wielkość tych kosztów mogła nie być na tyle duża, by ujawnił się kompromis między nią a wysokimi metabolicznymi kosztami funkcjonowania dużych organów wewnętrznych. To pokazuje, przynajmniej częściowo, że odpowiedź immunologiczna w warunkach ograniczonej o 30% konsumpcji pokarmu nie jest priorytetem, a jej supresja ma znaczenie adaptacyjne.

Książek A., Konarzewski M. 2016. Heat dissipation does not suppress an immune response in laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *Journal of Experimental Biology* 219: 1542-1551 [4]

W tej pracy zaproponowałam wykorzystanie zróżnicowania BMR do testowania zdolności do oddawania ciepła, potencjalnego czynnika determinującego wielkość wydatków energetycznych organizmów. Intensywnie testowana ostatnimi czasy hipoteza *heat dissipation limitation hypothesis* (HDL) sugeruje, że budżety energetyczne zwierząt ograniczane są raczej przez zdolność do oddawania produkowanego ciepła (przegląd w Speakman i Król 2010), a nie przez ograniczenia związane z pobieraniem, przetwarzaniem i alokowaniem energii. Jak dotąd, ograniczający efekt zdolności do utraty ciepła testowano tylko podczas laktacji, czyli w okresie kiedy tempo wydatków energetycznych matek jest największe. Zgodnie z tym, co zakłada hipoteza HDL, podczas laktacji konsumpcja pokarmu rośnie aż do momentu, gdy zostanie ograniczona przez trudności w oddawaniu ciepła będącego ubocznym produktem metabolizmu (Speakman i Król 2010). W badaniach skupiano się głównie na manipulowaniu fizycznymi ograniczeniami matek do oddawania ciepła wytworzonego podczas reprodukcji (poprzez ekspozycję do niskiej lub wysokiej temperatury otoczenia lub poprzez golenie) i oceniano ograniczający efekt rozpraszania ciepła jedynie ze względu na parametry określające wysiłek rodzicielski (np. ilość wyprodukowanego mleka czy tempo wzrostu potomstwa). Wyniki tych eksperymentów okazały się być niespójne i tylko częściowo popierały one założenia hipotezy HDL (Król i Speakman 2003ab, Król i in. 2007, Wu i in. 2009, Zhao i in. 2010, Yang i in. 2013).

W moim podejściu do testowania HDL założyłam, że jeśli zdolność do oddawania ciepła rzeczywiście ogranicza wydatki energetyczne, to powinna ona odgrywać taką samą rolę także podczas realizacji innych funkcji fizjologicznych niż reprodukcja. Po drugie, ograniczający efekt trudności w oddawaniu ciepła powinien pojawiać się także przy niższym niż podczas laktacji tempie pobierania pokarmu ale pod warunkiem, że zastosowany stresor metaboliczny spowoduje wzrost ilości produkowanego ciepła, któremu towarzyszyć będzie wzrost temperatury ciała. **Celem tej pracy było testowanie założenia, że ograniczanie wydatków energetycznych wynikające z trudności w pozbywaniu się ciepła może być też manifestowane podniesieniem temperatury ciała, któremu towarzyszy supresja funkcji generujących ciepło metaboliczne.** By to sprawdzić, myszy z linii o niskim lub wysokim BMR immunizowałam antygenem KLH i natychmiast przeniosłam je z temperatury 23°C do 34°C. Ekspozycja do ciepła trwała 5 dni, to jest przez okres, w którym wzrastają wydatki energetyczne związane z rozwojem odpowiedzi humoralnej. Selekcja w kierunku zróżnicowania BMR spowodowała też ujawnienie się międzyliniowych różnic ważnych z punktu widzenia założeń testowanych w tej pracy. W związku z tym, że myszy z wysokim BMR charakteryzują się większą o 20-30% masą narządów aktywnych metabolicznie, produkują one także większą ilość metabolicznego ciepła (Książek i in. 2004), przez co utrzymują wyższą temperaturę ciała w warunkach standardowych (23°C) i w strefie termoneutralnej przy 30°C (Gębczyński 2005, Książek i Konarzewski 2016). Dla kontrastu, obie linie selekcyjne nie różnią się masą ciała i mają taką samą przewodność cieplną (Gębczyński 2005). Wybór stresorów w postaci antygeny KLH i temperatury 34°C nie był przypadkowy. Odpowiedź przeciw KLH generuje 20-30% wzrost tempa metabolizmu, a co za tym idzie także wzrost ilości

produkowanego u myszy ciepła (Demas i in. 1997). Temperatura 34°C leży poza strefą termoneutralną dla gryzoni, a to oznacza, że w takich warunkach oddawanie ciepła do otoczenia jest utrudnione (Król i in. 2003, 2007, Speakman i Król 2010).

Spodziewałam się, że z powodu wyższego tempa przetwarzania energii objawiającego się wyższą temperaturą ciała w 23°C, myszy z linii o wysokim BMR będą bardziej ograniczone oddawaniem ciepła w 34°C niż osobniki z linii L-BMR. Zakładałam, że jeśli oddawanie ciepła ogranicza wydatki energetyczne, to wydatki myszy z linii L-BMR zrównają się w tempem przetwarzania energii u myszy z wysokim BMR i obie linie doświadczą podobnego przegrzania. Oczekiwałam też zależnej od linii selekcyjnej supresji odpowiedzi immunologicznej, jak również redukcji masy organów generujących ciepło, w celu uniknięcia niebezpiecznego przegrzania organizmu. Spodziewałam się, że immunosupresja będzie większa u myszy z wysokim BMR z powodu już i tak podwyższonego tempa produkcji ciepła, które mogłoby jeszcze wzrosnąć w wyniku uwalniania ciepła towarzyszącego produkcji przeciwciał. Dla weryfikacji moich oczekiwań poszukiwałam międzyliniowych różnic w masie ciała, odpowiedzi humoralnej wyrażonej w postaci przeciwciał anty-KLH IgM i liczbie leukocytów (wskaźnik WBC i N/L), masie organów generujących ciepło (wątrobie, jelicie cienkim, nerkach i sercu) oraz organów limfatycznych (grasicy, śledzionie i węzłach chłonnych).

Jak oczekiwałam, immunizacja antygenem KLH spowodowała podniesienie temperatury ciała, jednak obserwowany wzrost był taki sam u myszy z obu linii selekcyjnych. Niezależnie od efektu immunizacji, międzyliniowe różnice w temperaturze ciała zachowane były też w 34°C, przy czym sama ekspozycja do wysokiej temperatury otoczenia nie miała wpływu na zmiany temperatury ciała w obu liniach selekcyjnych. Stres metaboliczny w postaci temperatury 34°C nie powodował immunosupresji, ale sposób reakcji na antygen KLH był inny. Ekspozowane do 34°C myszy z linii H-BMR utrzymywały wysoką liczbę leukocytów we krwi, ale temperatura ich ciała była identyczna, jak w 23°C. Dla kontrastu, myszy z linii L-BMR powiększały masę węzłów chłonnych, co korespondowało z przejściowym podwyższeniem ich temperatury ciała. Ekspozycja do ciepła nie powodowała redukcji masy narządów limfatycznych (śledziony i grasicy), doszło jednak do redukcji liczby leukocytów we krwi obwodowej, spadku masy wątroby, jelita cienkiego i nerek - organów generujących metaboliczne ciepło. Powyższym zmianom towarzyszyła redukcja masy ciała. W ten sposób myszy zmniejszały tempo przetwarzania energii w temperaturze 34°C. Analizy nie potwierdziły istnienia interakcji między linią selekcyjną a temperaturą otoczenia, zatem wielkość obserwowanych redukcji była taka sama w obu liniach selekcyjnych. Stres metaboliczny w postaci jednoczesnej immunizacji antygenem KLH i ekspozycji do temperatury 34°C nie ograniczał w znaczący sposób zdolności do oddawania ciepła nawet u myszy z wysokim BMR i wyższą temperaturą ciała. Wyniki tej pracy pokazują, że przynajmniej w odniesieniu do modelu zwierzęcego wykorzystanego w tym eksperymencie, oddawanie ciepła nie jest istotnym czynnikiem ograniczającym wielkość wydatków energetycznych.

Książek A., Zub K., Szafrąńska P. A., Wieczorek M., Konarzewski M. 2014. Immunocompetence and high metabolic rates enhance overwinter survival in the root vole, *Microtus oeconomus*. *Biology Letters* 10, 20140684 [3]

Przeżywalność jest jednym z ważniejszych czynników kształtujących historie życiowe organizmów w warunkach naturalnych. Na to, jak zwierzę radzi sobie w środowisku by przeżyć składa się wiele funkcji, w tym także skuteczność układu obronnego w zwalczaniu infekcji (Råberg i in. 2009). Immunokompetencja, rozumiana jako zdolność do rozpoznawania i eliminowania patogenów, konkuruje o zasoby z innymi kosztownymi metabolicznymi funkcjami (Lochmiller i Deerenberg 2000, Råberg i in. 2002, Hegemann i in. 2012). **Celem badań podjętych w tej pracy była analiza międzyosobniczego zróżnicowania RMR i PMR, immunokompetencji oraz śmiertelności w naturalnej populacji nornika północnego - roślinożernego gryzonia dobrze poznanego pod kątem skutków oddziaływania presji ze strony patogenów (Telfer i in. 2008, Kloch i in. 2012), jak również indywidualnych wydatków energetycznych (Burton i in. 2011, Zub i in. 2014) wpływających na dynamikę liczebności tego gatunku. Co ciekawe, jak dotąd nie ma wielu badań, które jednocześnie testowałyby związek między różnymi miarami wydatków energetycznych (RMR i PMR) i funkcjami fizjologicznymi (np. immunokompetencją) oraz zimową przeżywalnością w populacjach naturalnych, a te które podejmowały taką tematykę, zwykle testowały każdą z wymienionych cech oddzielnie.**

W badaniach skupiłam się na ocenie wybranych parametrów odporności niespecyficznej, ponieważ (i) rozwija się ona jako pierwsza w odpowiedzi na obecność patogenów, (ii) daje sygnał innym komponentom układu odpornościowego do działania i co najważniejsze (iii) jej aktywność przyczynia się do wzrostu wydatków energetycznych i indukowania gorączki (Lee i Klasing 2004, Lee 2006). Jako miarę immunokompetencji przyjąłm stosunek liczby neutrofilów do liczby limfocytów przypadających na 100 leukocytów (N/L), całkowitą liczbę białych ciałek krwi (WBC) i poziom naturalnych przeciwciał (NAbs). Ocena wydatków energetycznych polegała na pomiarze spoczynkowego tempa metabolizmu (RMR). Mimo, że RMR obejmuje wydatki energetyczne związane z trawieniem pokarmu (przed pomiarem zwierzęta zwykle nie są głodzone), to jest to miara bardzo bliska BMR. W związku z tym, że norniki żyją na turzycowiskach okresowo zalewanych przez wodę, wydatki energetyczne ponoszone na sprawne pływanie często w zimnej wodzie mają wpływ na ich przeżywalność. Z tego powodu w badanej populacji szacowałam też maksymalne chwilowe tempo metabolizmu (PMR) wymuszone pływaniem. Norniki odławiane były z powierzchni o wielkości 1 ha otoczonej wysokim, wkopanym głęboko w ziemię płotem chroniącym przed drapieżnikami i uniemożliwiający nornikom migrację. Zbieranie danych rozpoczynałam jesienią (w listopadzie). Po zebraniu wszystkich pomiarów i prób biologicznych znakowane norniki wypuszczane były w miejscu schwytania i ponownie odławiane w styczniu, a potem jeszcze raz w marcu, w celu monitorowania ich indywidualnej przeżywalności. Dane dotyczące RMR, PMR i immunokompetencji kompletowałam w ciągu 3 kolejnych lat, od roku 2008 do roku 2010. W związku z tym, że w 2008 ponad połowa badanej populacji borykała się z obecnością pasożyta krwi *Babesia* spp. (Kloch i in. 2012), indywidualne zróżnicowanie

immunokompetencji korelowałam też z poziomem zapasozyczenia wywołanym obecnością tego pierwotniaka.

Norniki z niską wartością wskaźnika N/L charakteryzowały się jednocześnie bardzo wysokim poziomem zapasozyczenia powodowanym przez *Babesia* spp. Osobniki z tej grupy cechowała wysoka śmiertelności, zwłaszcza w drugiej części zimy (między styczniem a marcem). Ten okres zimy najlepiej przeżywały zwierzęta, u których obserwowałam podwyższoną wartość wskaźnika N/L, wywołaną wzrostem liczby neutrofilii we krwi. Neutrofile to komórki odporności niespecyficznej, które poprzez fagocytozę mogą eliminować pierwotniaki (Court i in. 2001, Davis i in. 2008). Podwyższoną liczbą tych komórek we krwi można zatem tłumaczyć mniejsze zapasozyczenie wywołane przez *Babesia* spp. u norników przeżywających drugą część zimy.

Spodziewałam się, że zimą wydatki energetyczne ponoszone na immunokompetencję będą konkurować z innymi kosztownymi energetycznie funkcjami fizjologicznymi o tej porze roku. Zaobserwowałam, że w pierwszej części zimy (między listopadem a styczniem) występowała ujemna korelacja między całkowitą liczbą leukocytów we krwi (WBC) i spoczynkowym tempem metabolizmu (RMR). Oznacza to, że zimujące norniki muszą doświadczać kompromisów między lokowaniem energii w immunokompetencję lub inne funkcje, takie jak np. termoregulacja, wydatki na utrzymanie której odzwierciedla właśnie RMR.

W pierwszej części zimy w badanej populacji występowała też ujemna korelacja między wskaźnikiem N/L i korygowanymi o masę ciała wydatkami energetycznymi związanymi z pływaniem (cPMR). Jak już wspomniałam wcześniej, podwyższona wartość wskaźnika N/L ułatwiała nornikom kontrolę poziomu zapasozyczenia i zwiększała szansę na przeżycie, ale tylko w drugiej części zimy. Tymczasem podwyższony cPMR pozytywnie korelował z przeżywalnością wczesną zimą (Zub i in. 2014). Wyniki moich badań sugerują, że wczesną zimą faworyzowane są osobniki, które dobrze pływają między turzycami, ale słabiej radzą sobie ze zwalczaniem infekcji powodowanej przez *Babesia* spp. Natomiast w drugiej części zimy, kiedy woda zamraża i nie trzeba inwestować w pływanie w zimnej o tej porze roku wodzie, to większa skuteczność w kontrolowaniu infekcji staje się czynnikiem zwiększającym szanse na przeżycie u osobników z wysokim wskaźnikiem N/L.

Książek A., Zub K., Szafrńska P. A., Wiczorek M., Konarzewski M. 2017. The nexuses hair corticosterone level, immunocompetence, metabolic rates and overwinter survival in the root vole, *Microtus oeconomus*. *General and Comparative Endocrinology* 250: 46-53 [5]

Kortykosteron to jeden z najważniejszych hormonów osi podwzgórze-przysadka-nadnercza regulującej fizjologiczne i psychologiczne reakcje większości zwierząt kręgowych na stres. Dotychczasowe badania wykazały, że podwyższony poziom kortykosteronu w odpowiedzi na długoterminowy stres ma działanie immunosupresyjne (Martin i in. 2005, Demas i in. 2010, Bourgeon i in. 2010, Yadav i Haldar 2014), reguluje zależne od masy ciała wydatki

energetyczne (Buehler i in. 2012, Dlugosz i in. 2012, Versteegh i in. 2012, Downs i in. 2013) i w ostateczności wpływa też na przeżywalność (Cote i in. 2006, Breuner i in. 2008, MacDougall-Shackleton i in. 2009, Marasco i in. 2015). Niniejsza praca jest jedną z pierwszych, która próbuje jednocześnie wiązać wszystkie powyższe parametry osobniczego dostosowania z przeżywalnością zwierząt w populacjach naturalnych. W pracy nr [3] pokazałam między innymi, że kiedy w roku 2008 przeżywalność norników w badanej populacji spadała 2-rotnie z powodu infekcji powodowanej przez *Babesia* spp. (Kloch i in. 2012), intensywność zapasożycenia była odwrotnie skorelowana z wartością wskaźnika N/L i te osobniki, które lepiej radziły sobie z infekcją, także z większym prawdopodobieństwem przeżywały drugą część zimy. **W tej pracy chciałam powiązać immunokompetencję (w postaci wskaźnika N/L), zapasożycenie wywołane przez *Babesia* spp., tempo metabolizmu (wyrażone jako RMR i PMR) oraz zimową przeżywalność norników z indywidualnym zróżnicowaniem poziomu kortykosteronu**, najważniejszego hormonu regulującego reakcję stresową u gryzoni (Woolsey i in. 2015, Yu i in. 2015, Jarcho i in. 2016). Chcę podkreślić, że moja praca jest jedną z pierwszych badających poziom kortykosteronu w próbach sierści pobieranych od dzikich zwierząt, które przez cały okres badań pozostawały w swoim naturalnym środowisku życia. Próby sierści kompletowałam od tych samych osobników, którym wymierzyłam tempo metabolizmu i pobrałam krew w latach 2008-2010. Oznaczanie kortykosteronu w sierści staje się coraz bardziej popularną alternatywą dla oceny tego hormonu we krwi, ślinie, moczu czy odchodach (Koren i in. 2002, Accrosi i in. 2008, Bennet i Hayssen 2010, Galuppi i in. 2013). Próby sierści są łatwiejsze do pobrania, niekłopotliwe w transporcie, a przede wszystkim poziom hormonu nie zmienia się pod wpływem chwilowego stresu związanego z odłowem (Yang i in. 1998, Koren i in. 2002). Poziom kortykosteronu w sierści kumuluje się przez długi okres czasu (tygodnie lub miesiące) wraz z indywidualnymi doświadczeniami osobnika, jest zatem odpowiednią miarą długoterminowego stresu u zwierząt w naturalnych populacjach.

W okresie między listopadem a styczniem poziom kortykosteronu był pozytywnie skorelowany z masą ciała, głównym czynnikiem decydującym o przeżywalności w tej części zimy w badanej populacji norników (Zub i in. 2014). Jednocześnie, w tym samym przedziale czasu, poziom kortykosteronu korelował ujemnie z przeżywalnością. Wysoką śmiertelność obserwowałam u tych norników, które charakteryzowały wysokim poziomem tego hormonu akumulowanym w sierści.

Analizy pokazały, że kortykosteron był istotnym predyktorem zmienności w RMR, jednak efekt ten zniknął po skorygowaniu RMR o wpływ masy ciała. Biorąc pod uwagę wspomnianą powyżej pozytywną korelację między masą ciała i kortykosteronem, jak również pozytywną korelację między masą ciała i RMR wykazaną w innych badaniach na większej liczbie osobników z tej samej populacji (Zub i in. 2014) mogę wnioskować, że pośredni charakter zależności między poziomem kortykosteronu a RMR wynika z bardzo silnego związku masy ciała zarówno z poziomem hormonu stresu, jak i z poziomem RMR. Nie zaobserwowałam istotnej zależności między poziomem kortykosteronu a PMR indukowanym pływaniem.

Ponieważ uważa się, że długoterminowy stres ma działanie immunosupresyjne, chciałam sprawdzić, czy kortykosteron deponowany w sierści może być predyktorem indywidualnych różnic w immunokompetencji. By dowiedzieć się czegoś więcej o immunomodulacyjnej roli kortykosteronu, analizowałam jego związek ze wskaźnikiem N/L oraz zapasożyceniem powodowanym przez *Babesia* spp. w odniesieniu do roku 2008, w którym poziom zapasożycenia w badanej populacji był największy. Jeśli kortykosteron rzeczywiście działa immunosupresyjnie, spodziewałam się ujemnej korelacji między jego poziomem i wartością wskaźnika N/L, skutkiem istnienia której powinna być inna, tym razem pozytywna zależność między kortykosteronem a intensywnością zapasożycenia. Przeciwnie do moich oczekiwań, w 2008 roku nie było zależności między poziomem kortykosteronu a wskaźnikiem N/L, który to wskaźnik ujemnie korelował z poziomem kortykosteronu tylko wtedy, gdy analizy wykonałam dla wszystkich norników odłowionych w ciągu trzech lat badań (rycina nr 2 w omawianej pracy). Oprócz tego, w 2008 roku występowała negatywna, a nie jak oczekiwałam pozytywna, zależność między kortykosteronem a poziomem zapasożycenia wywołanym przez *Babesia* spp. Moje wyniki sugerują, że brak zależności między kortykosteronem a wskaźnikiem N/L wynikał z małego międzyosobniczego zróżnicowania wartości N/L w 2008 roku, ponieważ osobniki zarówno z niskim, jaki i wysokim poziomem kortykosteronu charakteryzowały się porównywalnie wysokim wskaźnikiem N/L, dużo wyższym niż w pozostałych latach (rycina nr 2). Wynik ten nie potwierdza immunosupresyjnego działania kortykosteronu. Z drugiej jednak strony, brak bezpośredniej zależności między kortykosteronem a wskaźnikiem N/L w 2008 roku nie musi być skutkiem braku funkcjonalnego związku między poziomem hormonu a immunokompetencją, ale może wynikać z diametralnie różnej skali czasowej, w której kumulują się informacje o poziomie kortykosteronu i liczbie neutrofilii we krwi - są to tygodnie lub nawet miesiące w przypadku kortykosteronu akumulowanego w sierści oraz krótkoterminowe fluktuacje obrazu krwi zachodzące w ciągu dni lub nawet godzin.

II. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

(odnośniki w tekście odpowiadają poszczególnym pozycjom z Załącznika nr 4)

A) przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Od momentu, kiedy rozpoczęłam pracę w Instytucie Biologii UwB, moje zainteresowania naukowe skupiały się na testowaniu fizjologicznych i ewolucyjnych konsekwencji międzyosobniczego zróżnicowania BMR.

Badania prowadzone w celu przygotowania rozprawy doktorskiej miały dwojaki charakter. Po pierwsze, dotyczyły one oceny efektów stosowania sztucznej presji selekcyjnej w kierunku zróżnicowania BMR (praca nr 3 i 4, rozdział II.A w Załączniku nr 4). O kilku najważniejszych wynikach wspomniałam we wprowadzeniu do rozdziału I (strona nr 5). Równocześnie z badaniami nad oceną efektów selekcji, rozpoczęłam też badania nad szacowaniem energetycznych kosztów rozwoju odpowiedzi immunologicznej (praca nr 1 i 2,

rozdział II.A w Załączniku nr 4). W ten sposób włączyłam się w często podejmowane próby testowania kompromisu energetycznego (*trade-off*), mechanizmu kształtującego historie życiowe organizmów (Stearns 2002).

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowałam łącznie 4 prace, wszystkie indeksowane są w bazie *Journal Citation Reports*. Na rozprawę doktorską złożyły się trzy artykuły (pkt. 2-4, rozdział II.A w Załączniku nr 4), w dwóch byłam pierwszym autorem. W tym okresie mojej pracy naukowej rozpoczęłam współpracę z kolegami z Uniwersytetu Jagiellońskiego (pkt. 1 i 2, rozdział III.Q.1), odbyłam też kilka staży służących zapoznaniu się z technikami badań immunologicznych (pkt. 1-4, rozdział III.L). Badania nad szacowaniem kosztów rozwoju odpowiedzi immunologicznej u myszy różniących się BMR realizowałam ze środków finansowych przyznanych mi przez KBN (pkt. 1, rozdział II.I).

B) po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Głównym kierunkiem mojej pracy naukowej pozostaje badanie fizjologicznych, ekologicznych i ewolucyjnych skutków międzyosobniczej zmienności w BMR. Wraz z prowadzeniem badań własnych (opisanych w rozdziale I), angażowałam się też w projekty realizowane przez kolegów z grupy badawczej działającej w moim macierzystym instytucie i skupionej wokół zagadnień dotyczących energetyki procesów życiowych. Badania, w których uczestniczyłam pokazały, że osobniki charakteryzujące się wysokim BMR mają jednocześnie zredukowaną średnią liczbę podwójnych wiązań w fosfolipidach błon komórek wątroby (pkt. 5, rozdział II.A). Zależność ta okazała się być odwrotna do tej obserwowanej w porównaniach międzygatunkowych. Jest ona też niezgodna z teorią '*membrane pacemaker*' wiążącą ewolucję wysokiego BMR i endotermii ze wzrostem liczby podwójnych wiązań w błonach komórkowych (Hulbert 2007). W innej pracy wykazaliśmy, że wpływ ograniczenia ilości konsumowanego pokarmu na tempo metabolizmu zależy od jego początkowego poziomu. Co prawda, po zakończeniu 6-tygodniowego reżimu pokarmowego polegającego na dostarczaniu zwierzętom 70% ich dziennego zapotrzebowania na pokarm nadal utrzymywały się międzyliniowe różnice w BMR, jednak myszy z obu linii selekcyjnych obniżyły tego wartość, a spadek BMR był większy u myszy z linii H-BMR. To ważna obserwacja, ponieważ tłumaczy wcześniejsze trudności, jakie badacze napotykali przy testowaniu wpływu reżimu pokarmowego, zabiegu powszechnie stosowanego w badaniach nad starzeniem, na tempo metabolizmu (pkt. 6, rozdział II.A). Następne badania pokazały, że w odpowiedzi na taki sam reżim pokarmowy, ale utrzymywany przez okres 1 miesiąca, międzyliniowa różnica w spontanicznej aktywności ruchowej utrzymywała się na tym samym poziomie. Wbrew oczekiwaniom, spadek masy ciała towarzyszący reżimowi był taki sam w obu selekcionowanych liniach. Myszy z linii H-BMR mogły zatem utrzymywać uwarunkowaną genetycznie wyższą od myszy z linii L-BMR spontaniczną aktywność ruchową nawet w warunkach ograniczonej konsumpcji pokarmu dzięki redukcji BMR (który wciąż pozostawał jednak wyższy niż w linii L-BMR). Wynik ten może wskazywać na większą plastyczność budżetu energetycznego myszy z linii o wysokim BMR, co zdaje się potwierdzać też fakt, że były one

zdolne utrzymać wyższe tempo metabolizmu w porównaniu do myszy z linii L-BMR nawet po zakończeniu reżimu pokarmowego trwającego 6-tygodni (pkt. 12, rozdział II.A).

Selekcjonowane linie myszy wykorzystaliśmy też do testowania hipotezy wiążącej ewolucję endotermii z selekcją na efektywniejszą opiekę nad potomstwem (Koteja 2000, Nespolo i in. 2011). Przypuszcza się, że większe inwestycje w opiekę nad potomstwem pociągają za sobą wzrost kosztów reprodukcji, a jednym z nich może być podniesienie poziomu stresu oksydacyjnego (Speakman i Garratt 2014). Samice z linii o wysokim BMR rzeczywiście inwestują większe nakłady energii w opiekę nad młodymi podczas laktacji (Sadowska i in. 2013), ale mają jednocześnie niższy poziom uszkodzeń lipidów i DNA, pomimo braku międzyliniowych różnic w poziomie obrony antyoksydacyjnej. Laktacja nie podnosiła zatem poziomu uszkodzeń powodowanych przez stres oksydacyjny u myszy z linii H-BMR co oznacza, że utrzymywanie wyższego BMR nie musi pociągać za sobą kosztów wywołanych zwiększonym stresem oksydacyjnym podczas rozrodu (pkt. 9, rozdział II.A). Opisane tutaj wyniki badań posłużyły do przygotowania pracy poświęconej przeglądowi efektów eksperymentów selekcyjnych prowadzonych w celu zmanipulowania międzyosobniczego różnicowania BMR i innych cech z nim skorelowanych, jak również dyskusji czynników determinujących takie zróżnicowanie na różnych poziomach organizacji biologicznej (pkt. 7, rozdział II.A).

Wieloletni projekt służący monitorowaniu dynamiki liczebności w naturalnej populacji nornika północnego na obszarze Biebrzańskiego Parku Narodowego stworzył mi znakomitą szansę na badaniu interakcji roślina-roślinożerca, jak również testowaniu czynników podnoszących dzienne wydatki energetyczne drobnych gryzoni w ich naturalnym środowisku życia. Równocześnie z badaniami własnymi opisanymi tutaj w pracy [3] i [5], uczestniczyłam też w realizacji projektów naukowych kolegów z innych ośrodków badawczych. Dzięki regularnym odłowom zwierząt i monitorowaniu ich przeżywalności możliwe było testowanie efektywności golenia sierści jako metody istotnie podnoszącej wydatki energetyczne gryzoni w środowisku naturalnym. Eksperymentalne manipulacje wydatkami energetycznymi, choć z powodzeniem testowane w naturze u ptaków podczas reprodukcji, u ssaków ograniczają się głównie do badań w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Pomiar dziennych wydatków energetycznych (*daily energy expenditure*, DEE) z wykorzystaniem techniki podwójnie znakowanej wody pokazał, że norniki pozbawione około 50% sierści istotnie podnosiły swoje wydatki energetyczne. Co ciekawe, prawdopodobieństwo ich powtórnego odłowienia bardzo istotnie zależało od masy ciała, ale było takie samo u osobników golonych, jak i tych z grupy kontrolnej. W przypadku cięższych ogolonych norników, ich większa odławialność mogła wynikać z podwyższonej aktywności ruchowej i wydłużonego czasu żerowania, czym kompensowały sobie starty ciepła spowodowane eksperymentalnym usunięciem sierści (pkt. 10, rozdział II.A). Inne zagadnienie testowane na tej samej populacji zwierząt dotyczyło zależności między zawartością krzemu we tkankach turzyc a liczebnością populacji. Przypuszcza się, że ilość krzemu akumulowana w roślinach jest ich odpowiedzią na uszkodzenia powodowane zgryzaniem. W badanej populacji wysokie zagęszczenie norników obserwowane pod koniec lata powodowało wyraźnie zwiększoną akumulację krzemu w korzeniach, a następnie w liściach turzyc w roku następnym. Podczas zimy zawartość krzemu

w roślinach zmieniała się w zależności od temperatury i grubości pokrywy śnieżnej, co wpływało na jakość pokarmu dostępnego o tej porze roku. Jednakże większa śmiertelność norników obserwowana na samym początku zimy sugeruje, że prawdopodobieństwo przeżycia nie zależało od jakości pokarmu dostępnego w środku zimy, ale raczej od koncentracji krzemu znajdującego się w turzycach jesienią (pkt. 11, rozdział II.A).

Wolnożyjące norniki, choć z innej niż opisana powyżej populacja, były też obiektem badań behawioralnych służących testowaniu zależności między statusem socjalnym, poziomem testosteronu i intensywnością znakowania za pomocą zapachu (pkt. 8, rozdział II.A). Status socjalny ułatwia rywalizację o samicę i tym samym zwiększa sukces rozrodczy samców. Pomimo tego, że powszechnie uważa się, że osobniki dominujące charakteryzują się większą masą ciała, utrzymują podwyższony poziom testosteronu i efektywniej posługują się zapachem jako indykátorem pozycji socjalnej, zależność ta nie jest tak uniwersalna i u niektórych gatunków w naturze po prostu nie występuje. Zaobserwowaliśmy, że najwyższy poziom testosteronu utrzymują samce z pozycją subdominanta, poziom hormonu nie zależy od masy ciała, intensywność zapachu nie koresponduje z pozycją socjalną i masą ciała, a ta ostatnia jest taka sama u osobników dominujących, subdominantów, jak również tych z najniższym statusem. Badania pokazały zatem, że w naturalnej populacji nornika północnego duża masa ciała, wysoki poziom testosteronu i intensywność zapachu nie informują o wysokim statusie socjalnym samców.

Podsumowując, oprócz prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe w przewodzie habilitacyjnym, po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam jeszcze 8 artykułów (wszystkie indeksowane w bazie JCR). Prace te powstały dzięki zaangażowaniu w badania realizowane przez kolegów z Instytutu Biologii UwB, w tym także projekty realizowane ze środków finansowych przyznawanych na drodze konkursów (pkt. 2 i 4, rozdział II.I), jak również dzięki współpracy z badaczami z innych jednostek naukowych (pkt. 3 i 4, rozdział III.Q.1). Ten etap mojej pracy był dla mnie szczególnie cenny, ponieważ zdobyłam zupełnie nowe dla mnie umiejętności polegające nie tylko na prowadzeniu kilkuletnich badań terenowych, ale także planowaniu i organizowaniu zaplecza technicznego tak dużego przedsięwzięcia (pkt. 3, rozdział III.A.2). Projekt służący monitorowaniu populacji nornika północnego w Biebrzańskim Parku Naukowym został też opisany w rozdziale monografii zredagowanej i wydanej przez Wydawnictwo Uniwersytetu w Białymstoku Trans Humana (pkt. 1, rozdział II.D.2).

III. PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

(odnośniki w tekście odpowiadają poszczególnym pozycjom z Załącznika nr 4)

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania z pogranicza fizjologii, energetyki, ekologii i ewolucjonizmu. W drugiej połowie 2017 roku rozpoczął realizację 3-letniego projektu, w którym proponuję alternatywny do dotychczasowego sposób testowania hipotezy o ograniczeniach w utracie ciepła (*heat dissipation limitation*, HDL). Zamiast testowania układów eksperymentalnych, w których matki nie ponosiły podwyższonych kosztów

utrzymania innych funkcji i dawały priorytet tylko reprodukcji, chcę powrócić do idei kompromisów (*trade-offs*) i testować okoliczności ich ujawniania się w kontekście hipotezy HDL. Głównym celem projektu jest testowanie hipotezy, która zakłada, że jeśli budżet energetyczny laktujących samic jest ograniczony przez trudności w oddawaniu ciepła, to powinny ujawniać się kompromisy między inwestowaniem w opiekę rodzicielską a funkcjonowaniem układu obronnego. Projekt otrzymał finansowanie ze środków Narodowego Centrum Nauki (pkt. 8, rozdział II.I). Badania realizowane będą we współpracy międzynarodowej z grupą badawczą prof. Johna R. Speakmana z Uniwersytetu w Aberdeen w Szkocji - pomysłodawcy hipotezy HDL (pkt. 5, rozdział III.Q.1).

Celem innego projektu w realizacji którego już uczestniczę, jest badanie wpływu białka UCP1 na zmiany w poziomie stresu oksydacyjnego podczas termogenezy u ssaków (pkt. 7, rozdział II.I). Stres oksydacyjny jest często wskazywany jako mechanizm, który na poziomie molekularnym może być odpowiedzialny za ujawnianie się kompromisów ewolucyjnych. Białko UCP1 umożliwia produkcję ciepła bez syntezy wolnych rodników, co może skutkować utrzymywaniem się niskiego poziomu stresu oksydacyjnego podczas termogenezy. Dzięki badaniu aktywności i roli tego białka w indukowaniu termogenezy możliwa będzie weryfikacja coraz częściej poddawanego w literaturze w wątpliwość założenia, że to wyższe tempo metabolizmu odpowiada za podnoszenie się poziom stresu oksydacyjnego.

Oba przedstawione powyżej problemy badawcze są testowane z wykorzystaniem linii myszy laboratoryjnych charakteryzujących się niskim lub wysokim BMR. Tym samym modelem posłużyłam się razem z moimi kolegami z zespołu badawczego do rozpoczęcia pilotowych eksperymentów badających wpływ selekcji na niski lub wysoki metabolizm podstawowy na strukturę mitochondriów, ich aktywność oddechową i ilość białka mTOR odpowiedzialnego za ujawnianie się międzyosobniczej wariacji w BMR na poziomie molekularnym (np. Laplante i Sabatini 2009). Wyniki tych badań pilotowych będą miały wpływ na decyzje o kierunku dalszych prac.

W ostatnim czasie podjęłam też współpracę z badaczami z innych ośrodków (pkt. 3 i 6, rozdział III.Q.1), dzięki której mam możliwość testowania wpływu środowiska na plastyczność cech fizjologicznych, historii życiowych i behawioralnych ptaków i ssaków. Uczestniczę w realizacji projektu dotyczącego poznania mechanizmów kształtujących ewolucję socjalności u samców nietoperzy (pkt. 6, rozdział II.I) oraz w programie poświęconym czynnej ochronie populacji głuszca i jego reintrodukcji na terenie Borów Dolnośląskich i Puszczy Augustowskiej (pkt. 9 i 10, rozdział II.I).

Ogólne podsumowanie dorobku naukowego

Dokładny wykaz opublikowanych prac badawczych, jak również informacje o pracy dydaktycznej, współpracy z instytutami naukowymi, odbytych stażach i szkolenia oraz pracy na rzecz macierzystego instytutu znajdują się w Załączniku nr 4.

Na dotychczasowy dorobek naukowy składa się łącznie 17 publikacji w czasopiśmie z bazy JCR (w tym 16 oryginalnych prac eksperymentalnych i 1 praca przeglądowa), 1 rozdział w

monografii oraz 30 doniesień konferencyjnych (z czego 6 abstraktów opublikowanych jest w recenzowanych suplementach indeksowanych w Web of Science). Charakterystykę dorobku naukowego obejmującą ocenę punktową publikacji wg listy MNiSW, jak również współczynnik wpływu IF, przedstawia Tabela 1 umieszczona poniżej.

Spośród 13 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, 5 prac eksperymentalnych stanowi osiągnięcie naukowe w przewodzie habilitacyjnym. W przypadku wszystkich 5 publikacji jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Zawarte w tych pracach wyniki stanowią spójną całość i oscylują wokół dwóch zagadnień:

a/ fizjologicznych i ewolucyjnych kompromisów *trade-off* u unikatowego na skalę światową modelu myszy laboratoryjnych selekcionowanych w kierunku posiadania niskiego bądź wysokiego tempa metabolizmu podstawowego (BMR)

b/ międzysobniczego zróżnicowania podstawowego (BMR), maksymalnego (PMR) tempa metabolizmu, parametrów odporności niespecyficznej i poziomu kortykosteronu oraz wpływem takiego zróżnicowania na zimową przeżywalność drobnych ssaków w populacjach naturalnych (na przykładzie nornika północnego).

Tabela 1. Bibliometryczna charakterystyka dorobku naukowego (ocena punktowa publikacji wg komunikatu MNiSW z dnia 12 grudnia 2016 r., współczynnik IF podany jest dla roku 2016).

	PRZED DOKTOREM			PO DOKTORACIE			ŁĄCZNIE		
	liczba	IF	punkty MNiSW	liczba	IF	punkty MNiSW	liczba	IF	punkty MNiSW
Publikacje inne niż w osiągnięciu naukowym	4	14,366	160	8	24,323	270	12	38,689	430
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym	-	-	-	5	14,418	160	5	14,418	160
Rozdziały w monografiach	-	-	-	1	-	-	1	-	-
publikacje ŁĄCZNIE	4	14,366	160	14	38,741	430	18	53,107	590
Doniesienia konferencyjne	4	2,382	45	26	11,340	205	30	13,722	250
publikacje i doniesienia ŁĄCZNIE	8	16,748	205	40	50,081	635	48	66,829	840

Liczba cytowań według bazy Web of Science i Scopus (stan z dnia 11.10.2017 r.)

Web of Science: 374 (bez autocytacji 338)

Scopus: 406 (bez autocytacji 370)

Indeks Hirscha według bazy Web of Science i Scopus (stan z dnia 11.10.2017 r.)

Web of Science: 10

Scopus: 10

Białystok,
dn. 11.10.2017 r.

Aneta Książek

Literatura:

Aars J., Ims R.A. 2002. Intrinsic and climatic determinants of population demography: the winter dynamics of tundra vole populations. *Ecology* 83: 3449-3456.

Accorsi P.A., Carloni E., Valsecchi P., Viggiani R., Gamberoni M., Tamanini C., Seren E. 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 398-402.

Bennett A., Hayssen V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39: 171-180.

Bourgeon S., Kauffmann M., Geiger S., Raclot T., Robin J.P. 2010. Relationships between metabolic status, corticosterone secretion and maintenance of innate and adaptive humoral immunities in fasted re-fed mallards. *J. Exp. Biol.* 213: 3810-3818.

Breuner C.W., Patterson S.H., Hahn T.P. 2008. In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157: 288-295.

Buehler D.M., Vezina F., Goymann W., Schwabl I., Versteegh M., Tieleman B.I., Piersma T. 2012. Independence among physiological traits suggests flexibility in the face of ecological demands on phenotypes. *J. Evol. Biol.* 25: 1600-1613.

Burthe S., Telfer S., Begon M., Bennett M., Smith A., Lambin X. 2008. Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: significant negative impacts on survival. *J. Anim. Ecol.* 77: 110-119.

Burton T., Killen S., Armstrong J., Metcalfe N. 2011. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? *Proc. R. Soc. B* 278: 3465-3473.

Cote J., Clobert J., Meylan S., Fitze P.S. 2006. Experimental enhancement of corticosterone levels positively affects subsequent male survival. *Horm. Behav.* 49: 320-327.

Court R.A., Jackson L.A., Lee R.P. 2001. Elevated antiparasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. *Int. J. Parasitol.* 19: 29-37.

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22: 760-772.

Demas G.E., Chefer V., Talan M.I., Nelson R. J. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* 273: R1631-R1637.

Demas G.E., Adamo S.A., French S.S. 2010. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Funct. Ecol.* doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01738.x

- Dlugosz E. M., Harris B.N., Saltzman W., Chappell M.A. 2012. Glucocorticoids, aerobic physiology, and locomotor behavior in California mice. *Physiol. Biochem. Zool.* 85: 671-683.
- Downs C.J., Brown J.L., Wone B., Donovan E.R., Hunter K., Hayes J.P. 2013. Selection for increased mass-independent maximal metabolic rate suppresses innate but not adaptive immune function. *Proc. R. Soc. B* 280: 2012-2636.
- Ergon T., Speakman J.R., Scantlebury M., Cavanagh R., Lambin X. 2004. Optimal body size and energy expenditure during winter: Why are voles smaller in declining populations? *Am. Nat.* 163: 442-457.
- Galuppi R., Leveque J.F.C., Beghelli V., Bonoli C., Mattioli M., Ostanello F., Tampieri M.P., Accorsi P.A. 2013. Cortisol levels in cats' hair in presence or absence of *Microsporum canis* infection. *Res. Vet. Sci.* 95: 1076-1080.
- Garland T. Jr., Midford P.E., Ives A.R. 1999. An introduction to phylogenetically based statistical methods, with a new method for confidence intervals on ancestral values. *Am. Zool.* 39: 374-388.
- Gębczyński A.K. 2005. Daily variation of thermoregulatory costs in laboratory mice selected for high and low basal metabolic rate. *J. Therm. Biol.* 30: 187-193.
- Hulbert A.J. 2007. Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids* 42: 811-819.
- Hegemann A., Matson K.D., Versteegh M.A., Tieleman B.I. 2012. Wild skylarks seasonally modulate energy budgets but maintain energetically costly inflammatory immune responses throughout the annual cycle. *PLoS ONE* 7, e36358.
- Jarcho M.R., Massner K.J., Eggert A.R., Wichelt E.L. 2016. Behavioral and physiological response to onset and termination of social instability in female mice. *Horm. Behav.* 78: 135-140.
- Karasov W.H., McWilliams S.R. 2005. Digestive constraint in mammalian and avian ecology. In *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (ed. J.M. Starck and T. Wang), pp. 87-112. Enfield, NH: Science Publishers.
- Karasov W.H., Martinez del Rio C. 2007. *Physiological Ecology: How Animals Process Energy, Nutrients, and Toxins*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Karasov W.H., Martinez del Rio C., Caviedes-Vidal E. 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Ann. Rev. Physiol.* 73: 69-93.
- Kloch A., Baran K., Buczek M., Konarzewski M., Radwan J. 2012. MHC influences infection with parasites and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evol. Ecol.* 27: 635-653.

- Konarzewski M., Książek A., Łapo I.B. 2005. Artificial selection on metabolic rates and related traits in rodents. *Integr. Comp. Biol.* 45: 416-425.
- Konarzewski M., Książek A. 2013. Determinants of intra-specific variation in basal metabolic rate. *J. Comp. Physiol. B* 183: 27-41.
- Koren L., Mokady O., Karaskov T., Klein J., Koren G., Geffen E. 2002. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav.* 63: 403-406.
- Koteja P. 2000. Energy assimilation, parental care and the evolution of endothermy. *Proc. R. Soc. B* 267: 479-484.
- Król E., Speakman J.R. 2003a. Limits to sustained energy intake. VI. Energetics of lactation in laboratory mice at thermoneutrality. *J. Exp. Biol.* 206: 4255-4266.
- Król E., Speakman J.R. 2003b. Limits to sustained energy intake. VII. Milk energy output in laboratory mice at thermoneutrality. *J. Exp. Biol.* 206: 4267-4281.
- Król E., Johnson M.S., Speakman J.R. 2003. Limits to sustained energy intake. VIII. Resting metabolic rate and organ morphology of laboratory mice lactating at thermoneutrality. *J. Exp. Biol.* 206: 4283-4291.
- Król E., Murphy M., Speakman J.R. 2007. Limits to sustained energy intake. X. Effects of fur removal on reproductive performance in laboratory mice. *J. Exp. Biol.* 210: 4233-4243.
- Książek A., Konarzewski M., Łapo I.B. 2004. Anatomic and energetic correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 890-899.
- Książek A., Konarzewski M. 2016. Heat dissipation does not suppress an immune response in laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate (BMR). *J. Exp. Biol.* 219: 1542-1551.
- Laland K., Uller T., Feldman M., Sterelny K., Müller G.B., Moczek A., Jablonka E., Odling-Smee J., Wray G.A., Futuyma D.J., Lenski R.E., Mackay T.F.C., Schluter D., Strassmann J.E. 2014. Does evolutionary theory need a rethink? *Nature* 514: 161-164.
- Laplante M., Sabatini D.M. 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 3589-3594.
- Lee K.A., Klasing K.C. 2004. A role for immunology in invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* 19: 523-529.
- Lee K.A. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46: 1000-1015.
- Li Y.G., Yan Z.C., Wang D.H. 2010. Physiological and biochemical basis of basal metabolic rates in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) and Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 157: 204-211.

Lighton J.R.B. 2008. Measuring metabolic rates: a manual for scientists. Oxford University Press, Oxford.

Lochmiller R.L., Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *OIKOS* 88: 87-98.

MacDougall-Shackleton S.A., Dindia L., Newman A.E.M., Potvin D.A., Stewart K.A., MacDougall-Shackleton E.A. 2009. Stress, song and survival in sparrows. *Biol. Lett.* 5: 746-748.

Marasco V., Boner W., Heidinger B., Griffiths K., Monaghan P. 2015. Repeated exposure to stressful conditions can have beneficial effects on survival. *Exp. Gerontol.* 69: 170-175.

Martin L.B., Gilliam J., Han P., Lee K., Wikelski M. 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140: 126-135.

Moczek A.P., Sultan S., Foster S., Ledón-Retting C., Dworkin I., Nijhout H.F., Abouheif E., Pfennig D.W. 2011. The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proc. R. Soc. B* 278: 2705-2713.

Naya D.E., Bozinovic F., Karasov W.H. 2008. Latitudinal trends in digestive flexibility: testing the climatic variability hypothesis with data on the intestinal length of rodents. *Am. Nat.* 172: E122-E134.

Nespolo R.F., Franco M. 2007. Whole-animal metabolic rate is repeatable trait: a meta-analysis. *J. Exp. Bio.* 210: 2000-2005.

Nespolo R.F., Bacigalupe L.D., Figueroa C.C., Koteja P., Opazo J.C. 2011. Using new tools to solve an old problem: the evolution of endothermy in vertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 26: 414-423.

Noble D., Jablonka E., Joyner M.J., Müller G.B., Omholt S.W. 2014. Evolution evolves: physiology returns to centre stage. *J. Physiol.* 592: 2237-2244.

Piersma T., Drent J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol. Evol.* 18: 228-233.

Piersma T., van Gils J.A. 2010. The flexible phenotype: a body-centred integration of ecology, physiology, and behaviour. Oxford University Press, Oxford.

Pigliucci M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* 20: 481-486.

Råberg L., Vestberg M., Hasselquist D., Holmdahl R., Svensson E., Nilsson J.A. 2002. Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 817-821.

Råberg L., Graham A.L., Read A.F. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 37-49.

Roff D.A. 2002. Life history evolution. Sinauer, Sunderland.

Sadowska J., Gębczyński A.K., Konarzewski M. 2013. Basal metabolic rate is positively correlated with parental investment in laboratory mice. *Proc. Biol. Sci.* 280: 2012-2576.

Schaarschmidt T., Jürss K. 2003. Locomotory capacity of Baltic Sea and freshwater populations of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 135: 411-424.

Schmidt-Nielsen K. 1997. Animal physiology: adaptation and environment. Cambridge University Press, Cambridge.

Speakman J.R., Król E. 2010. Maximal heat dissipation capacity and hyperthermia risk: neglected key factors in the ecology of endotherms. *J. Anim. Ecol.* 79: 726-746.

Speakman J.R., Garratt M. 2014. Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays* 36: 93-106.

Stearns S.C. 2002. The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.

Telfer S., Birtle R., Bennett M., Lambin X., Paterson S., Begon M. 2008. Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology* 135: 767-781.

Tripathi G., Verma P. 2004. Sex-specific metabolic changes in the annual reproductive cycle of a freshwater catfish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 137: 101-106.

White C.R., Kearney M.R. 2012. Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *J Comp Physiol B* 183: 1-26.

Woolsey I.D., Bune N.E.T., Jensen P.M., Deplazes P., Kapel C.M.O. 2015. *Echinococcus multilocularis* infection in the field vole (*Microtus agrestis*): an ecological model for studies on transmission dynamics. *Parasitol. Res.* 114: 1703-1709.

Wu S.H., Zhang L.N., Speakman J.R., Wang D.H. 2009. Limits to sustained energy intake. XI. A test of the heat dissipation limitation hypothesis in lactating Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *J. Exp. Biol.* 212: 3455-3465.

Versteegh M.A., Schwabl I., Jaquier S., Tieleman B.I., 2012. Do immunological, endocrine and metabolic traits fall on a single Pace-of-Life axis? Covariation and constraints among physiological systems. *J. Evol. Biol.* 25: 1864-1876.

Vidal N., Zaldua N., D'Anatro A., Naya D.E. 2014. Are the most plastic species the most abundant ones? An assessment using a fish assemblage. *PLOS One* 9: e92446.

Yadav S.K., Haldar C. 2014. Experimentally induced stress, oxidative load and changes in immunity in a tropical wild bird, *Perdicula asiatica*: involvement of melatonin and glucocorticoid receptors. *Zoology* 117: 261-268.

Yang H.Z., Lan J., Meng Y.J., Wan X.J., Han D.W. 1998. A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67: 447-450.

Yang D.B., Li L., Wang L.P., Chi Q.S., Hambly C., Wang D.H., Speakman J.R. 2013. Limits to sustained energy intake. XIX. A test of the heat dissipation limitation hypothesis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Exp. Biol.* 216: 3358-3368.

Yu T., Xub H., Wang W., Li S., Chena Z., Deng H. 2015. Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS. *J. Chromatogr. B* 1002: 267-276.

Zhao Z.J., Chi Q.S., Cao J., Han Y.D. 2010. The energy budget, thermogenic capacity and behavior in Swiss mice exposed to a consecutive decrease in temperatures. *J. Exp. Biol.* 213: 3988-3997.

Zub K., Borowski Z., Szafrńska P.A., Wieczorek M., Konarzewski M. 2014. Lower body mass, but higher metabolic rates enhance winter survival in root voles, *Microtus oeconomus*. *Biol. J. Lin. Soc.* 113: 297-309.