

Łukasz Ołdakowski

**Stres oksydacyjny jako koszt reprodukcji
u nornicy rudej *Myodes glareolus***

Rozprawa doktorska

wykonana w Instytucie Biologii

Uniwersytetu w Białymstoku

pod kierunkiem

prof. dr hab. Jana R.E. Taylora

Białystok 2015

Podziękowania

Przede wszystkim chciałbym podziękować Agnieszce, Wiktorii i Bartoszowi, moim najważniejszym osobom w życiu, za okazaną pomoc i wyrozumiałość, zarówno podczas prowadzenia badań do niniejszej rozprawy, jak i ostatecznego przelewania tych badań na papier. A także moim Rodzicom, którzy zawsze mnie wspierali w dążeniu do celu. Kocham Was wszystkich.

Gorące podziękowania składam mojemu promotorowi prof. Janowi R. E. Taylorowi, który zawsze mnie wspierał w dążeniu do postawionych celów. Dzięki niemu poznałem warsztat pracy naukowca i ekologa „od kuchni”. Nauczyłem się także, że niezależnie od sytuacji, odpowiedź na pytanie „dlaczego?” najczęściej nie generuje prostej odpowiedzi, a tylko kolejne pytania.

Chciałbym również podziękować prof. Pawłowi Kotei z Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego za możliwość prowadzenia badań na zwierzętach z Jego hodowli. A także Edycie Sadowskiej i Katarzynie Chrzęścik za ogromną pomoc i pierwsze kroki w pracy ze zwierzętami.

Szczere wyrazy wdzięczności kieruję także do prof. Iwony Ciereszko i dr Bożeny Kozłowskiej-Szerenos z Zakładu Fizjologii Roślin oraz prof. Izabeli Święcickiej i dr Anety Książek z Zakładu Mikrobiologii za możliwość pracy w ich laboratoriach oraz korzystanie z ich sprzętu naukowego.

„Last, but not least”, ogromne podziękowania kieruję do moich koleżanek i kolegów z Zakładu Ekologii Zwierząt. Zawsze i w każdej sprawie mogłem liczyć na Waszą pomoc i odpowiedzi na nawet najdziwniejsze pytania. Szczególne podziękowania kieruję do Anny Koszewnik, Małgorzaty Lewoc, Bogusława Lewończuka i Stanisława Płonowskiego za nieocenioną pomoc podczas hodowli zwierząt. Bez Was zapanowanie nad tą całą armią nornic byłoby znacznie trudniejsze.

Badania przedstawione w niniejszej pracy były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki, N 304 280840, przyznanego J. R. E. Taylorowi.

Spis treści

Streszczenie	5
1. Wstęp.....	8
2. Materiały i metody	15
2.1. Zwierzęta	15
2.2. Analizy biochemiczne	16
2.2.1. Uszkodzenia oksydacyjne	16
2.2.2. Poziom obrony antyoksydacyjnej.....	18
3. Wpływ liczby wykarmionych miotów na poziom uszkodzeń oksydacyjnych	19
3.1. Wstęp, cele i hipotezy.....	19
3.2. Materiały i metody	20
3.2.1. Schemat eksperymentu	20
3.2.2. Analiza statystyczna.....	21
3.3. Wyniki	22
3.4. Dyskusja	23
3.5. Tabele i ryciny	28
4. Wpływ eksperymentalnego zwiększania i zmniejszania wysiłku reprodukcyjnego na poziom stresu oksydacyjnego.....	36
4.1. Wstęp, cele i hipotezy.....	36
4.2. Materiał i metody	39
4.2.1. Plan eksperymentu	39
4.2.2. Analiza statystyczna.....	40
4.3. Wyniki	41
4.3.1. Wielkość i masa miotu	41
4.3.2. Masa ciała i masa metabolicznie aktywnych narządów u samic.....	42
4.3.3. Uszkodzenia oksydacyjne tkanek	43
4.3.4. Obrona antyoksydacyjna	44
4.4. Dyskusja	45
4.5. Tabele i ryciny	50
5. Wpływ rozmnażania na poziom stresu oksydacyjnego u dziko żyjących nornic rudych z różnych kohort	60
5.1. Wstęp, cele, hipotezy	60
5.2. Materiały i metody	62

5.2.3. Schemat badań	62
5.2.2. Analiza statystyczna	63
5.3. Wyniki	63
5.4. Dyskusja	65
5.5. Tabele i ryciny	69
6. Podsumowanie	79
7. Bibliografia	81

Streszczenie

Jednym z najbardziej kluczowych pojęć w ekologii ewolucyjnej jest kompromis (ang. *trade-off*) w alokacji energii podczas całego życia zwierzęcia. Energia dostępna w przyrodzie jest ograniczona i zwierzęta zużywając ją na jedną z czynności, nie mogą jej wykorzystać w innych procesach życiowych. Do najważniejszych funkcji życiowych wszystkich organizmów, w tym także zwierząt, należy rozmnażanie. W przypadku ssaków bardzo duża ilość energii jest zużywana podczas ciąży, a w szczególności laktacji. Tak jak i inne energochłonne procesy, reprodukcja generuje również koszty. Inwestowanie w aktualne potomstwo powoduje obniżenie kolejnych sukcesów reprodukcyjnych, a także obniżenie własnej przeżywalności. Pomimo intensywnych badań nad mechanizmem powstawania tych kosztów, proces ten nie został dotychczas wyjaśniony.

W niniejszej rozprawie testowałem hipotezę, że stres oksydacyjny, uwidaczniający się w oksydacyjnych uszkodzeniach tkanek, jest bezpośrednim fizjologicznym kosztem rozrodu. Stres oksydacyjny to stan organizmu, w którym produkcja reaktywnych form tlenu (RFT, ubocznych produktów oddychania komórkowego), przewyższa w dużym stopniu możliwość ich neutralizacji poprzez różnego rodzaju substancje antyoksydacyjne. W okresie o podwyższonych wydatkach energetycznych, takim jak rozmnażanie, wraz ze zwiększaniem się tempa metabolizmu zwiększa się również produkcja RFT, co w konsekwencji może powodować uszkodzenia komórkowe i prowadzić do obniżenia przeżywalności.

Hipotezę dotyczącą stresu oksydacyjnego jako bezpośredniego kosztu rozmnażania testowałem na samicach nornicy rudej *Myodes glareolus*. Zwierzęta użyte w dwóch eksperymentach laboratoryjnych pochodziły z hodowli selekcyjnej na maksymalne tempo metabolizmu tlenowego. Różniły się od użytych także nie selekcionowanych osobników kontrolnych wyższymi wydatkami energetycznymi. W pierwszym eksperymencie zarówno samice selekcionowane, jak i osobniki z linii kontrolnych, mogły urodzić jeden lub dwa naturalne mioty. Z obu linii miałem także osobniki nie rozmnażające się. Oznaczyłem uszkodzenia oksydacyjne lipidów i białek w wątrobie, sercu, nerkach i mięśniach szkieletowych samic. Spodziewałem się uszkodzeń

proporcjonalnych do wysiłku i większych u samic selekcionowanych. Wbrew oczekiwaniom, uszkodzenia te albo nie różniły się między samicami z jednym miotem, dwoma i nie rozmnażającymi się, albo były niższe u samic rozmnażających się. Brak było też różnic między samicami z linii selekcionowanych i kontrolnych. Można przypuszczać, że w eksperymencie tym samice produkowały różną liczbę potomstwa w zależności od swego stanu fizjologicznego. W drugim eksperymencie różnicowałem więc wysiłek samic poprzez dodawanie dwóch młodych do oryginalnego miotu lub zmniejszałem go do dwóch młodych w kolejnych czterech miotach rodzonych przez samice. Przez trzy pierwsze laktacje samice były jednocześnie w ciąży. Eksperyment zaplanowany był tak, by maksymalnie zwiększyć wydatki energetyczne części samic. Spodziewałem się największych uszkodzeń oksydacyjnych u selekcionowanych samic z powiększonymi miotami. Wbrew przewidywaniom teorii stresu oksydacyjnego, wyniki tego eksperymentu były jakościowo podobne do tychże w eksperymencie pierwszym – uszkodzenia u samic rozmnażających się nie różniły się od uszkodzeń samic nie rozmnażanych lub były od nich niższe, a linie selekcionowane nie różniły się od kontrolnych. W eksperymencie tym oznaczane były też antyoksydanty: aktywność katalazy i stężenie całkowitego glutationu, co dostarczyło umiarkowanego wsparcia hipotezie, że niski poziom uszkodzeń oksydacyjnych tkanek u rozmnażających się osobników jest powiązany ze zwiększoną produkcją enzymów antyoksydacyjnych.

Takie same oznaczenia uszkodzeń oksydacyjnych, w tych samych tkankach, wykonałem u samic nornicy bezpośrednio po odłowieniu z naturalnego środowiska, przed i po okresie rozrodu. Samice pochodziły z pokolenia wiosennego i jesienno, które różniły się tempem wzrostu oraz wiekiem przed i po rozmnażaniu. Ogólnie, podobnie jak w eksperymentach laboratoryjnych, samice po reprodukcji najczęściej albo się nie różniły pod względem poziomu stresu oksydacyjnego od osobników przed reprodukcją, albo poziom ten był nawet niższy (choć w dwóch kombinacjach markerów i narządów był wyższy). Nie potwierdził się też wpływ wieku i wzrostu na uszkodzenia oksydacyjne w tkankach nornic.

Podsumowując, wyniki dwóch eksperymentów laboratoryjnych i badań nad nornicami złowionymi w terenie falsyfikują hipotezę, że stres oksydacyjny jest kluczowym elementem mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie kompromisów w

historii życia pomiędzy aktualnym inwestowaniem energii w rozród a przeżywalnością i przyszłym sukcesem reprodukcyjnym.

Summary

In evolutionary ecology the evolutionary trade-off is one of the most key concept about energy allocation during the entire life of the animal. The energy is limited in nature and animals consuming it on one of the function, cannot use it in other processes of life. The reproduction is one of the most important vital functions of all organisms. In the case of mammals, a very large amount of energy is consumed during pregnancy and lactation in particular. Like other energy-consume processes, reproduction also generates costs. The most important of these are a decline in subsequent reproductive success and a decrease in their own survival. Despite the various proposals on the mechanisms of these costs, this process has not been fully explained.

One hypothesis considers that this oxidative stress may be one of the main direct costs of reproduction and this hypothesis was tested in this trial. Oxidative stress is a body state, in which the production of oxygen free radicals (ROS) greatly exceeds the ability to neutralize them through various antioxidant substances. In the period of increased energy expenditure, such as reproduction, with increasing metabolic rate also increases the production of ROS as a consequence can increase the cellular damage which in turn can lead to a lower survival.

The hypothesis concerning oxidative stress as a direct cost of reproduction I was tested on the bank vole *Myodes glareolus*. Animals used in two laboratory experiments were derived from experimental breeding selection for maximum metabolic rate of oxygen during swimming. They had also higher energy expenditures from control animals also used in this experiments. In the first experiment, both the females from the selection and from the control line may wean 1 or 2 natural litters. From both lines I had also a non-breeding individuals. I expected that level of oxidative damage will be proportional to the reproductive effort and will be higher in selection line. However, opposite to predictions, level of oxidative damage did not differ between females from different reproductive groups or was lower in breeding females. Level of oxidative damage also did not differ between females from selection and control line. I suppose that this result could be the effect of females that produced number of offspring depends on their physiological condition.

In the second experiment, I experimentally manipulate with reproductive effort of females from both lines (selected and control). Females born 4 consecutive litters with experimentally increased or decreased number of offspring per litter. As in the first experiment non-breeding females were as a control. During first three lactations females were

concurrently pregnant what additionally increased energy expenditures. I expected the highest level of oxidative damage in selected females with increasing number of offspring. However, opposite to predictions of oxidative stress hypothesis, the results were similar to those from first experiment – level of oxidative damage in breeding voles did not differ from non-breeding individuals or was even lower. Again females from selection line did not differ from control lines in terms of oxidative stress markers. In this experiment I also measured level of antioxidants: activity of catalase and level of total glutathione which gave me moderate support of hypothesis that increased level of oxidative damage is connected with decreasing level of antioxidants.

I also measured level of the same oxidative stress markers (in exact the same organs) in bank vole females from free living population. Captured females came from spring and autumn generation and differ in breeding status (before, after), growth rate and age. Like in the laboratory experiments, females after reproduction mostly did not differ in level of oxidative stress from females before reproduction or the level was even lower (although in two combinations of markers and organs the level of oxidative damage was higher in females after breeding). The impact of age and growth rate on level of oxidative stress was also not confirmed.

In summary, my results from two experiments in strictly controlled laboratory conditions, as well as from the natural environment undermine the hypothesis that oxidative stress is the key element in a proximate mechanism underlying the fundamental life-history trade-off between the current energy investment in reproduction and the future survival or reproductive success.

1. Wstęp

Zwiększenie inwestycji (głównie w postaci energii i czasu) w dany proces życiowy zmniejsza możliwość inwestycji w inne procesy. Istnienie takich kompromisów ewolucyjnych (ang. *trade-offs*) jest jednym z głównych założeń teorii dotyczącej historii życiowych (ang. *life-history theory*) (Williams, 1966; Reznick, 1985; Roff, 1992; Stearns, 1992). Wśród najważniejszych kompromisów można wymienić te związane z reprodukcją. Stwierdzono na przykład ujemny wpływ przystąpienia do reprodukcji na tempo wzrostu, obserwowany przede wszystkim u zwierząt o niezdeterminowanym wzroście (Crisp i Patel, 1961; Barnes, 1962; Hirshfield, 1980; Warner, 1984; Ernsting et al., 1993; Bonnet et al., 2002; Castellano i Cadeddu, 2011). Zwiększony wysiłek reprodukcyjny powoduje powstawanie kompromisów ewolucyjnych, które nierozłącznie związane są z kosztami. Zwiększenie inwestycji na reprodukcję prowadzi często do obniżenia przeżywalności rodziców przynajmniej jednej płci (Askenmo, 1979; Clutton-Brock et al., 1982; Reid, 1987; Lindén, 1988; Dijkstra et al., 1990; Gunderson, 19978; Bonnet et al., 2002; Koivula et al., 2003; Oksanen et al., 2003; Nussey et al., 2006). Wyprodukowanie większej ilości potomstwa najczęściej powoduje, że młode te są mniejsze i w związku z tym mają obniżone prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego (Nur, 1984; Smith et al., 1989; Mappes i Koskela, 2004; Skibieli et al., 2013). Zwiększenie wysiłku reprodukcyjnego powoduje z jednej strony wzrost liczby młodych w danym miocie lub lęgu, ale także i zmniejszenie liczby i jakości potomstwa w kolejnych miotach czy lęgach (Slagsvold, 1984; Tinbergen, 1987; Roskaft, 1985; Milonoff et al., 2004; Parejo i Danchin, 2006). W przypadku muchołówki białoszyjej, *Ficedula albicollis*, samice, którym powiększono liczbę piskląt w pierwszym lęgu, w kolejnych latach wychowywały mniejszą liczbę piskląt w stosunku do osobników kontrolnych. Ponadto, młode z powiększonych lęgów były mniej płodne i miały niższą przeżywalność (Gustafsson i Sutherland, 1988; Gustafsson i Pärt, 1990).

O ile koszty reprodukcji są dość dobrze znane, to ich fizjologiczne podstawy nie są do końca wyjaśnione. Próby wyjaśnienia powstawania kosztów reprodukcji koncentrują się na alokacji ograniczonej energii i czasu pomiędzy wysiłkiem reprodukcyjnym a innymi procesami życiowymi (Sibly i Calow, 1986). Zauważono, między innymi, że zwiększony wysiłek reprodukcyjny jest powiązany ze zmniejszoną

obroną immunologiczną organizmu (Nordling et al., 1998; Norris i Evans, 2000), osteoporozą (ubytkiem wapnia z kości), a także zaburzeniami snu (Speakman, 2008). W ciągu ostatniej dekady uwaga ekologów ewolucyjnych skupiła się na stresie oksydacyjnym jako prawdopodobnym, bezpośrednim mechanizmie odpowiedzialnym za powstawanie kosztów reprodukcyjnych (Monaghan et al., 2009; Metcalfe i Alonso-Alvarez, 2010; Stier et al., 2012; Metcalfe i Monaghan, 2013; Speakman i Garratt, 2014).

Stres oksydacyjny to stan, w którym produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) przewyższa możliwość ich neutralizacji przez system antyoksydacyjny (Monaghan et al., 2009; Metcalfe i Alonso-Alvarez, 2010). RFT są ubocznym produktem normalnego metabolizmu tlenowego i powstają głównie w mitochondriach podczas oddychania komórkowego, a dokładniej w łańcuchu oddechowym (Finkel i Holbrook, 2000; Barja, 2004). Do RFT zaliczane są między innymi takie cząsteczki jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), hydroksylowy ($\cdot OH$), nadtlenki, w tym nadtlenek wodoru (H_2O_2) czy tlen singletowy (1O_2), a ich wysoka reaktywność związana jest z posiadaniem jednego lub więcej niesparowanego elektronu na zewnętrznej powłoce. W małych ilościach umożliwiają one prawidłowe funkcjonowanie organizmu i wpływają na różne, często podstawowe procesy życiowe, takie jak wzrost i rozwój, obrona immunologiczna i sygnalizacja komórkowa (Dowling i Simmons, 2009). Z drugiej jednak strony, nadprodukcja RFT może prowadzić do uszkodzenia podstawowych biomolekuł takich jak białka, lipidy czy DNA (Finkel i Holbrook, 2000; Van Remmen i Richardson, 2001).

Organizm nie jest bezbronny w stosunku do RFT. W toku ewolucji powstały różnorodne mechanizmy zabezpieczające organizm przed ich negatywnym wpływem. Do systemu antyoksydacyjnego, mającego za zadanie neutralizowanie powstających RFT, jak i naprawę uszkodzeń przez nie wyrządzonych, można zaliczyć takie substancje jak dysmutaza ponadtlenkowa, glutation oraz peroksydaza glutationowa, katalaza czy karotenoidy lub witaminę E (Halliwell i Gutteridge, 1999; von Schantz et al., 1999; Monaghan et al., 2009). Powstające w komórce anionorodniki ponadtlenkowe są szybko wylapywane przez dysmutazę ponadtlenkową i przekształcane w nadtlenek wodoru i tlen singletowy. Następnie nadtlenek wodoru jest rozkładany do cząsteczki wody za pośrednictwem systemu oksydo-redukcyjnego glutationu i/lub katalazy, a tlen singletowy wychwytywany i neutralizowany między innymi przez witaminę E (Meister i Anderson, 1983; von Schantz et al., 1999; Balaban et al., 2005; Isaksson et al., 2011). Sprawnie

działający system antyoksydacyjny jest w stanie szybko przywrócić równowagę oksydo-redukcyjną w organizmie (Monaghan et al., 2009).

Stres oksydacyjny prawdopodobnie odgrywa dużo większą rolę w życiu zwierząt niż wcześniej uważano (Dowling i Simmons, 2009), choć już od ponad 50 lat znana jest teoria mówiąca o roli stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się (Harman, 1957; Kirkwood i Austad, 2000; Finkel i Holbrook, 2000; Selman et al., 2012; Speakman i Selman, 2011). Według niej, RFT powstające w komórkach prowadzą do uszkodzeń oksydacyjnych, które kumulując się doprowadzają do śmierci organizmu. Wysokie tempo wzrostu również może powodować stres oksydacyjny (Alonso-Alvarez et al., 2006; Nussey et al., 2009). Udowodniono, że zwiększony wysiłek fizyczny, który powoduje zwiększenie tempa metabolizmu, również jest związany z podwyższeniem poziomu stresu oksydacyjnego (Larcombe et al., 2008; Costantini et al., 2008). W przypadku gołębi latających na długich dystansach, nastąpił wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w osoczu (Costantini et al., 2008). Natomiast regularne treningi mogą zmniejszyć powstające uszkodzenia oksydacyjne (Radak et al., 2008; Larcombe et al., 2010). Papużki faliste, które trenowały poderwanie się do lotu przez 9 tygodni charakteryzowały się mniejszym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych niż papużki bez treningu (Larcombe et al., 2010). Z kolei inne badania, prowadzone na gryzoniach, nie wykazały powiązania pomiędzy wysiłkiem fizycznym w postaci biegania a poziomem uszkodzeń oksydacyjnych i obrony antyoksydacyjnej (Vaanholt et al., 2008; Selman, et al., 2002a). Podwyższone tempo metabolizmu na skutek ekspozycji zwierząt na działanie niskich temperatur również może powodować wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych (Selman et al., 2002b), aczkolwiek podobny wynik nie był potwierdzony w innych eksperymentach (Selman et al., 2008). Należy przy tym wspomnieć, że zależność pomiędzy tempem metabolizmu a poziomem uszkodzeń oksydacyjnych niekoniecznie musi być wprost proporcjonalna i czasami wyższe tempo metabolizmu może prowadzić do mniejszych uszkodzeń, zarówno poprzez wzrost poziomu obrony antyoksydacyjnej, jak i poprzez aktywność białek UCP (Speakman, 2003; Mailloux i Harper, 2011). Aktywność tych białek w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wzrasta wraz z tempem metabolizmu i hamuje wyciek protonów, a tym samym produkcję RFT (Brand, 2000).

W przypadku ptaków, stres oksydacyjny może mieć duży wpływ na dobór partnera, jako że karotenoidy odpowiedzialne za ubarwienie samców mają także właściwości antyoksydacyjne. Samce o żywych barwach rozpoznawane są przez samice jako osobniki o dobrej kondycji, które są w stanie przeznaczyć odpowiednią ilość karotenoidów zarówno na ubarwienie, jak i na obronę antyoksydacyjną (Torres i Velando, 2007; Pike et al., 2007; Alonso-Alvarez et al., 2008; Pérez-Rodríguez, 2009).

Zwierzęta podczas reprodukcji, znacząco zwiększając tempo metabolizmu i przemian energetycznych, stają się bardziej narażone na wpływ RFT na organizm. Ptaki karmiące pisklęta mają o 33-50% wyższy poziom metabolizmu w stosunku do osobników nie rozmnażających się (Drent i Daan, 1980). Spoczynkowe tempo metabolizmu u ssaków w czasie laktacji jest średnio 1,6, a maksymalnie nawet 2,7 razy wyższe w porównaniu z nie rozmnażającymi się osobnikami (Cretegny i Genoud, 2006; Speakman, 2008). Podczas ciąży, i w szczególności laktacji, znacząco wzrasta także konsumpcja pokarmu, która pośrednio również wskazuje na podwyższone tempo metabolizmu w tym okresie (Kaczmarski, 1966; Speakman i McQueenie, 1996; Aloise King et al., 2013). Można więc przewidywać, że wysokie tempo metabolizmu podczas ciąży i laktacji powinno prowadzić do zwiększonej produkcji RFT i w konsekwencji do uszkodzeń oksydacyjnych biomolekuł.

Pomimo bardzo licznych badań nad wpływem wysiłku reprodukcyjnego na poziom uszkodzeń oksydacyjnych, rola stresu oksydacyjnego w okresie reprodukcji nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Wyniki tych badań są bardzo zróżnicowane. Wśród nich są takie, które potwierdzają szkodliwy wpływ RFT w okresie reprodukcji. Tak na przykład, u samców zeberek (*Taeniopygia guttata*), które wychowały eksperymentalnie powiększone lęgi, zaobserwowano osłabioną odporność na hemolizę indukowaną przez RFT (Alonso-Alvarez et al., 2004). Natomiast samice, wychowujące dwoje lub sześć piskląt, miały mniejszą odporność na hemolizę od nie rozmnażających się osobników, ale nie różniły się pod tym względem między sobą. W innym eksperymencie na zeberkach potwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy liczbą złożonych jaj a odpornością na stres oksydacyjny. Zależność ta zniknęła po podaniu ptakom karmy z dodatkiem antyoksydantów (Bertrand et al., 2006). Stwierdzono także, że zeberki wychowujące większe lęgi mają obniżoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych w stosunku do samic z mniejszymi lęgami (Wiersma et al., 2004). W powyższych

badaniach nie oznaczano niestety poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach, co jest niezbędne, aby udowodnić zaistnienie stresu oksydacyjnego (Monaghan et al., 2009). Zwiększona produkcja RFT lub obniżona aktywność antyoksydantów, relacjonowane w tych pracach, tylko pośrednio sugerują stres oksydacyjny.

Badania w kolejnych latach zaczęły uzupełniać ten brak wiedzy o poziomie uszkodzeń. Samice góropatwy czerwonej (*Alectoris rufa*) o wyższym sukcesie reprodukcyjnym posiadają wyższy poziom uszkodzeń lipidów w erytrocytach (Alonso-Alvarez et al., 2010). W przypadku pręgowca amerykańskiego (*Tamias striatus*) badacze zaobserwowali dodatnią korelację pomiędzy uszkodzeniami oksydacyjnymi lipidów a wielkością miotu (Bergeron et al., 2011). Amerykańska wiewiórka czerwona (*Tamiasciurus hudsonicus*) podczas laktacji charakteryzowała się wyższymi uszkodzeniami oksydacyjnymi w stosunku do nie rozmnażających się osobników (Fletcher et al., 2013), natomiast poziom tych uszkodzeń był mniejszy u wiewiórek z terenu, gdzie wykładany był dodatkowy pokarm. U północnych słoni morskich (*Mirounga angustirostris*), które w okresie reprodukcji nie pobierają pokarmu, także zaobserwowano wzrost poziomu stresu oksydacyjnego (Sharick et al., 2015). Z kolei wyniki badań nad dziko żyjącą populacją owiec rasy Soay (*Ovis aries*) nie pokazują żadnego wpływu (ani pozytywnego, ani negatywnego) wysiłku reprodukcyjnego na poziom uszkodzeń oksydacyjnych (Nussey et al., 2009). Podobnie nie rozmnażające i rozmnażające się myszy laboratoryjne nie różniły się między sobą w poziomie uszkodzeń oksydacyjnych (Brzęk et al., 2014). Z kolei inny eksperyment na myszy domowej (*Mus musculus domesticus*) prezentuje wyniki dokładnie przeciwne do powyższych. Samice w szczycie laktacji charakteryzowały się obniżonym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie w stosunku do nie rozmnażających się samic (Garratt et al., 2011). W ostatnich latach pojawiły się badania nad gryzoniami, w których wysiłek reprodukcyjny był manipulowany poprzez dodawanie i odejmowanie młodych w miotach, z jednoczesnym oznaczaniem poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach samic (Garratt et al., 2013; Aloise King et al., 2013; Plumel et al., 2014; Xu et al., 2014; Costantini et al., 2014). Spośród tych prac tylko jedna, i to w sposób pośredni, przedstawia wzrost stresu oksydacyjnego (produkcji nadtlenu wodoru) u samic myszy domowej o zwiększonej liczbie młodych w miocie, w stosunku do samic o pomniejszonych miotach (Plumel et al., 2014). Pozostałe badania prezentują albo brak

wpływu wysiłku reprodukcyjnego na poziom uszkodzeń oksydacyjnych (Xu et al., 2014), albo samice charakteryzujące się wyższym nakładem reprodukcyjnym wykazywały niższy poziom stresu oksydacyjnego (Aloise King et al., 2013; Garratt et al., 2013; Costantini et al., 2014).

Wobec tak niejednoznacznych wyników dotychczasowych prac, aby sprawdzić, czy zwiększony wysiłek reprodukcyjny może powodować powstawanie uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach, przeprowadziłem swoje własne badania, które stanowią niniejszą rozprawę doktorską. **Nadrzędna testowana w niniejszej pracy hipoteza brzmi: stres oksydacyjny, uwidaczniający się w oksydacyjnych uszkodzeniach tkanek, jest bezpośrednim fizjologicznym kosztem rozrodu.**

Obiektem była nornica ruda (*Myodes glareolus*, Schreber 1780). Nornica ruda jest bardzo dobrym gatunkiem do badań nad rolą stresu oksydacyjnego podczas reprodukcji, gdyż wykazano u niej istnienie kompromisu pomiędzy wysiłkiem reprodukcyjnym a przeżywalnością. Samicom nornicy, którym w naturalnym środowisku eksperymentalnie zwiększono miot o dwa młode, drastycznie obniżyła się przeżywalność w porównaniu z samicami wychowującymi normalne lub pomniejszone mioty (Koivula et al., 2003). Co ważne, gryzonie te łatwo jest odławiać w ich środowisku i hodować w warunkach laboratoryjnych.

W celu przetestowania przedstawionej powyżej hipotezy, przeprowadziłem dwa eksperymenty na osobnikach z hodowli laboratoryjnej oraz badania na nornicach pochodzących ze środowiska naturalnego (opisane w Rozdziałach 3–5). Pierwszy eksperyment polegał na określeniu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych u samic, które wykarmiły jeden lub dwa mioty, w porównaniu z osobnikami nie rozmnażającymi się (Rozdział 3). Nowatorskim podejściem było tutaj użycie zwierząt o genetycznie podwyższonym tempie metabolizmu. Użyłem nornic z hodowli laboratoryjnej prof. Pawła Kotei, w której były one selekcjonowane na maksymalne tempo metabolizmu (szersze informacje w rozdziale „Materiały i metody”). W eksperymencie tym nie wykazałem zwiększonych uszkodzeń oksydacyjnych u rozmnażających się samic, co mogło być spowodowane zbyt małym wysiłkiem reprodukcyjnym. Dlatego zaplanowałem kolejny eksperyment na osobnikach z tej samej hodowli, który polegał na manipulacji wysiłkiem reprodukcyjnym samic poprzez powiększanie i pomniejszanie

wielkości czterech kolejnych miotów (Rozdział 4). Według mojej wiedzy był to eksperyment o najwyższym wymuszonym wysiłku reprodukcyjnym (porównywalnym do wysiłku w środowisku naturalnym), testującym wpływ reprodukcji na poziom stresu oksydacyjnego. Jeśli rzeczywiście wysiłek reprodukcyjny powoduje wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych, to powinny one uwidocznić się u samic, które wykarmiły cztery powiększone mioty.

Oprócz wyżej wspomnianych dwóch eksperymentów laboratoryjnych, przeprowadziłem także badania na samicach nornicy rudej odławianych w ich naturalnym środowisku, szczegółowo opisane w Rozdziale 5. Odławiane samice różniły się statusem reprodukcyjnym (przed reprodukcją i po reprodukcji), a także generacją (wiosenna i jesienna). Ponieważ oznaczałem tu poziom tych samych markerów stresu oksydacyjnego, w tych samych narządach i tkankach co poprzednio, uzyskane dane „terenowe” w znacznym stopniu uzupełniły wyniki wcześniejszych eksperymentów laboratoryjnych, co pozwoliło na wielostronne odniesienie się do postawionych celów i hipotez.

Określiłem poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w wątrobie, nerkach, sercu i mięśniach szkieletowych kończyny tylnej samic nornicy, jak również oznaczyłem aktywność antyoksydantów, katalazy i całkowitego glutationu, w części z tych tkanek (antyoksydanty nie były badane w pierwszym eksperymencie). Spodziewałem się wyższego poziomu stresu oksydacyjnego u osobników o większym wysiłku reprodukcyjnym.

Trzy etapy moich badań (dwa eksperymenty laboratoryjne i badania „terenowe”) opisałem w trzech kolejnych rozdziałach. Przedstawione są w nich szczegółowe cele i hipotezy, a także materiały i metody badawcze. Każdy rozdział ma też swoją odrębną dyskusję. Ostateczne wnioski z wszystkich przeprowadzonych badań przedstawiłem w końcowym rozdziale „Podsumowanie”. Rozdziały te są poprzedzone krótką charakterystyką obiektu badań i opisem metod wspólnych wszystkim etapom badań.

2. Materiały i metody

2.1. Zwierzęta

Nornica ruda, obiekt badań przedstawionych w niniejszej rozprawie, jest drobnym gryzoniem, o masie ciała około 20–25 g, bardzo pospolitym w naszych lasach. W warunkach naturalnych, w czasie sezonu rozrodczego, który trwa od wczesnej wiosny do późnej jesieni, może wychować do czterech miotów (Bujalska, 1983). Osobniki urodzone wiosną i wczesnym latem szybko dojrzewają i rozmnażają się jeszcze w tym samym roku, a większość z nich nie dożywa do kolejnego sezonu rozrodczego. Osobniki urodzone późnym latem i jesienią rozmnażają się po przezimowaniu, od wczesnej wiosny. W każdym miocie rodzi się średnio 5–6 młodych (Schwarz et al., 1964; Zejda, 1971; Bujalska, 1983; Gliwicz, 1983). Nornica ruda bardzo dobrze znosi warunki laboratoryjne (Sadowska et al., 2005). Bez większego problemu można ją rozmnażać, a nawet manipulować wysiłkiem reprodukcyjnym poprzez dodawanie lub odejmowanie młodych, o ile jest to zrobione tuż po porodzie (Mappes et al., 1995).

Badania przeprowadziłem zarówno na osobnikach pochodzących z hodowli laboratoryjnej jak i na osobnikach z populacji naturalnych. Dwa pierwsze eksperymenty (Rozdział 3 i 4) zostały przeprowadzone na samicach nornicy rudej pochodzącej ze sztucznej wielokierunkowej selekcji laboratoryjnej prowadzonej na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie pod kierunkiem prof. Pawła Kotei (Sadowska et al., 2008; Sadowska et al., 2015). W swoich badaniach posłużyłem się zwierzętami z linii selekcjonowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu podczas pływania oraz z linii kontrolnych. W liniach selekcjonowanych na wysokie tempo metabolizmu kryterium selekcyjnym był najwyższy 1-minutowy poziom konsumpcji tlenu osiągnięty przez nornice podczas pływania w wodzie o temperaturze 38°C. Temperatura ta była tak dobrana, aby wzrost tempa metabolizmu pochodził tylko z aktywności lokomotorycznej, bez dodatkowych wydatków na termoregulację. Samice z linii selekcyjnych posiadały maksymalne tempo metabolizmu o 40% wyższe w stosunku do samic z linii kontrolnych (Chrzęściak et al., 2014), o 10% wyższe tempo metabolizmu podstawowego (Sadowska et al., 2015) oraz o 18% wyższą konsumpcję pokarmu (G. Dheyongera, K. Grzebyk, dane niepubl.) (wszystkie te wartości dotyczą nornic z pokolenia 11 selekcji i są korygowane o

masę ciała). Zarówno zwierzęta selekcjonowane, jak i kontrolne, reprezentowane były przez cztery linie replikacyjne. Samice nie rozmnażane, jak również samice rozmnażane przed połączeniem z samcem, były trzymane w standardowych plastikowych klatkach ($26 \times 20 \times 16$ cm) z trocinami jako podłożem. Po połączeniu z samcem, każda samica przebywała z nim w większej klatce ($43 \times 27 \times 16$ cm) z odwróconą glinianą doniczką (Rozdział 3) lub plastikowym domkiem (Rozdział 4) i papierowym ręcznikiem do zbudowania gniazda. W hodowli utrzymywana była stała temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) i fotoperiod (16 h : 8 h dzień : noc). Zwierzęta miały dostęp do wody i pokarmu *ad libitum*. Pokarmem była standardowa karma dla gryzoni (Labofeed H., Kcynia) bez antyoksydantów jako środków konserwujących, o zawartości witaminy E = 90 mg kg^{-1} .

Badania opisane w Rozdziale 5 przeprowadziłem na naturalnej populacji normicy rudej. Zwierzęta o różnym statusie reprodukcyjnym (przed i po rozrodzie), pochodzące zarówno z generacji wiosennej, jak i jesiennej, odłowilem na terenie Puszczy Knyszyńskiej.

2.2. Analizy biochemiczne

2.2.1. Uszkodzenia oksydacyjne

Wcześniej pobrane i zamrożone tkanki homogenizowałem w zmrożonym mózdzierzu (Rozdział 3) lub za pomocą homogenizatora nożowego CAT X120 (Rozdziały 4 i 5) w 50 mmol l^{-1} buforze fosforanowym z dodatkiem 1 mmol l^{-1} EDTA, pH = 7,0. Supernatant po odwirowaniu (10000 g , 15 min w 4°C) chwilowo był trzymany na lodzie do czasu analizy uszkodzeń oksydacyjnych.

Poziom oksydacyjnych uszkodzeń lipidów zmierzyłem przy pomocy reakcji malandialdehydu (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA) (Ohkawa et al., 1979). Pokrótce, supernatant, 20% kwas octowy i 0,5% kwas tiobarbiturowy, zmieszano i inkubowano przez 1 godz. w łaźni wodnej w 95°C . Następnie zmierzyłem absorbancję supernatantu w spektrofotometrze Beckman Coulter Du 730 przy długości fali 532 nm. Krzywa kalibracyjna z użyciem tetraetoksypropanu o znanych stężeniach posłużyła do obliczeń poziomu MDA. W ten sposób przeprowadzono analizę uszkodzeń lipidów w

pierwszym eksperymencie (Rozdział 3). Wyniki przedstawione w Rozdziałach 4 i 5 zostały otrzymane nieco zmodyfikowaną metodą. Po inkubacji w łaźni wodnej, wyekstrahowano supernatant w mieszaninie butanolu i pirydyny (1 : 15) i zmierzono absorbancję górnej warstwy supernatantu przy długościach fali 532 i 600 nm. Różnicę pomiędzy tymi dwiema absorbancjami użyto do dalszych obliczeń. Zabiegi te spowodowały, że próbka była dokładniej oczyszczona, a końcowy wynik był w mniejszym stopniu zależny od innych substancji mogących reagować z TBA, które mają swoje maksimum absorbancji, tak jak MDA, przy długości fali około 532 nm. Zawartość białka w próbce we wszystkich analizach została oznaczona metodą Lowry'ego z modyfikacjami Petersona (Lowry et al., 1951; Peterson, 1977). Wyniki dotyczące uszkodzeń lipidów przedstawiłem jako stężenie TBARS (substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym) wyrażone w nmol mg^{-1} białka.

Poziom oksydacyjnych uszkodzeń białek zmierzyłem za pomocą reakcji 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) z białkowymi grupami karbonyłowymi (Stadtman i Oliver, 1991; Levine et al., 1994). Supernatant umieszczono w dwóch probówkach, później do pierwszej (próbka, S) dodano 10 mmol DNPH w 2,5 M HCl, a do drugiej (kontrola, C) dodano sam 2,5 M HCl. Po 1 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej, do każdej z probówek dodano 50% kwas trójchlorooctowy (TCA), zawartość wymieszano i schłodzono przez 20 min w temperaturze -20°C . Następnie próbki odwirowano (10000 g, 15 min, 4°C), supernatant został odlany, a osad przepłukany mieszaniną alkoholu etylowego i octanu etylu w równych proporcjach. Płukanie te było powtórzone trzykrotnie, a następnie osad został rozpuszczony w 6 M chlorowodoru guanidyny. Absorbancja próbek S i C została zmierzona przy długości fali 370 nm. Poziom grup karbonylowych obliczyłem na podstawie różnicy w absorbancji pomiędzy próbką S a C. Zawartość białka w próbce została oznaczona na podstawie próbki C, przy absorbancji 280 nm. Końcowe stężenie grup karbonylowych wyraziłem w nmol mg^{-1} białka. Prawie wszystkie oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, a powtarzalność (współczynnik korelacji wewnątrzklasowej) wyliczono według Lessels i Boag (Lessels i Boag, 1987).

2.2.2. Poziom obrony antyoksydacyjnej

Aktywność katalazy oznaczyłem zgodnie z metodą opisaną przez Aebi (Aebi, 1986). Tkanki zhomogenizowano w 100 mmol l⁻¹ buforze fosforanowym o pH = 7,0 z dodatkiem 0,1 mmol l⁻¹ EDTA zmieszanym z TRIS w proporcji 1 : 99. Próbkę z supernatantem wyzerowano w spektrofotometrze przy długości fali 240 nm. Następnie do kuwetki został dodany 30 mmol l⁻¹ roztwór H₂O₂ i obserwowano spadek absorbancji. Ostateczną wartość aktywności katalazy oznaczyłem jako stałą szybkości reakcji (k) przeliczoną na mg białka.

Poziom całkowitego glutationu zmierzyłem zgodnie z metodą Andersona (Anderson, 1996) z modyfikacją do czytnika 96-dołkowych płytek (Vasilaki et al., 2006). W skrócie, tkanki zhomogenizowano w 1% roztworze SSA i odwirowano (10000 g, 10 min., 4°C). Do dołków w płytce titracyjnej został dodany klarowny supernatant oraz mieszanina reakcyjna (roztwór NADPH, DNTB i reduktazy glutationowej) i mierzono przyrost absorbancji przez 30 minut w odstępach 5 min. Na podstawie krzywej kalibracyjnej obliczyłem stężenie całkowitego glutationu i wartość końcową wyraziłem w nmol mg⁻¹ białka. Zarówno przy analizie katalazy, jak i glutationu, ilość białka w próbce została określona metodą Lowry'ego (Lowry et al., 1951; Peterson, 1977).

3. Wpływ liczby wykarmionych miotów na poziom uszkodzeń oksydacyjnych

3.1. Wstęp, cele i hipotezy

Głównym celem moich badań było sprawdzenie czy wysiłek reprodukcyjny u samic nornicy rudej powoduje wzrost uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w stosunku do samic nie rozmnażających się. W chwili planowania tego eksperymentu i w trakcie jego realizacji, bardzo mało było wiadomo o poziomie stresu oksydacyjnego u ssaków w czasie reprodukcji. Znane mi były tylko trzy prace na ten temat i relacjonowały one bardzo rozbieżne wyniki: zarówno wyższy poziomu stresu oksydacyjnego u samic pręgowca amerykańskiego wychowującego większe mioty (Bergeron et al., 2011), poprzez brak zależności pomiędzy reprodukcją a poziomem uszkodzeń oksydacyjnych u dzikich owiec rasy Soay (Nussey et al., 2009), do niższego poziomu stresu u rozmnażających się myszy domowych (Garratt et al., 2011)

Wraz ze wzrostem tempa metabolizmu powinien wzrastać poziom uszkodzeń oksydacyjnych. Wysiłek reprodukcyjny jest nieodłącznie związany ze zwiększeniem zapotrzebowania energetycznego i tempa metabolizmu i w związku z tym, uszkodzenia oksydacyjne również powinny rosnać. Nornice rude ze sztucznej selekcji na wysokie maksymalne tempo metabolizmu tlenowego oraz nie selekcjonowane nornice kontrolne, z uwagi na swoje zróżnicowanie tempa metabolizmu, stanowiły idealny materiał do testowania moich dwóch hipotez:

1. Samice o wyższym wysiłku reprodukcyjnym charakteryzują się wyższym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych w stosunku do samic nie rozmnażających się.
2. Samice o genetycznie uwarunkowanym wyższym poziomie zapotrzebowania energetycznego (z linii selekcjonowanych) posiadają wyższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych w porównaniu do samic z linii kontrolnych.

Aby przetestować powyższe hipotezy zbadałem poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w różnych narządach wewnętrznych u samic z linii selekcjonowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu oraz u samic z linii

kontrolnych. Każda grupa różniła się wysiłkiem reprodukcyjnym samic, które albo się nie rozmnażały albo mogły urodzić i wykarmić jeden lub dwa mioty. W przypadku słuszności moich hipotez, spodziewałem się (1) wyższego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych u samic, które wykarmiły więcej miotów w porównaniu do nie rozmnażających się samic oraz (2) wyższego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych u samic z linii selekcionowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu w stosunku do linii kontrolnych. Taki wynik potwierdziłby prawdziwość mojej głównej hipotezy dotyczącej uszkodzeń oksydacyjnych jako bezpośredniego kosztu reprodukcji.

3.2. Materiały i metody

3.2.1. Schemat eksperymentu

Na początku eksperymentu wszystkie zwierzęta były w jednakowym wieku ok. 90 dni. Do badań użyłem 72 samice z ósmego pokolenia hodowli laboratoryjnej prowadzonej na Uniwersytecie Jagiellońskim. 36 samic pochodziło z linii kontrolnych i 36 samic z linii selekcionowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu (po 9 samic z każdej z ośmiu linii). Tak więc grupa selekcyjna z zagnieżdżonymi liniami replikacyjnymi była pierwszym czynnikiem dwuczynnikowego eksperymentu. Drugim czynnikiem była liczba wykarmionych miotów, reprezentująca wysiłek reprodukcyjny. Samice zostały losowo przypisane do jednej z trzech grup (3 osobniki w każdej linii replikacyjnej). Samice w grupie 0, których nie rozmnażano, nie miały kontaktu z samcami przez cały okres eksperymentu. Samice z grupy 1 urodziły i wykarmiły jeden miot (jedna pełna laktacja), natomiast samice z grupy 2 wykarmiły dwa mioty (dwie pełne laktacje). Samice z grup 1 i 2 trzymane były wraz samcem, który był usuwany z klatki po wykarmieniu pierwszego miotu. Wszystkie te samice były więc w kolejnej ciąży w czasie karmienia pierwszego miotu, zapoczątkowanej w krótkim okresie rui poporodowej, typowej dla gryzoni. Liczba młodych była sprawdzana 17-go dnia od urodzenia, przy odstawianiu młodych od matki i młode były wówczas ważone z dokładnością do 0,01 g. Samice z grupy 2, po oddzieleniu od młodych z pierwszego miotu, przenoszone były do nowej czystej klatki, już bez samca, gdzie mogły urodzić drugi miot (drugi miot wychowywały więc nie będąc jednocześnie w ciąży).

Wszystkie samice zostały zabite poprzez dyslokację rdzenia kręgowego. Ponieważ samice z grupy 1 były w drugiej ciąży gdy karmiły pierwszy miot, z powodów etycznych były zabijane w dniu urodzenia drugiego miotu, a samice z grupy 2 po odstawieniu drugiego miotu. Samice z grupy 0 zabijane były losowo wraz z samicami z grup 1 i 2. Samice przed sekcją zważyłem z dokładnością do 0,1 g, pobrałem i zważyłem z dokładnością do 0,001 g narządy wewnętrzne do dalszych analiz biochemicznych: wątrobę, nerki, serce a także mięśnie szkieletowe uda. Wszystkie pobrane tkanki zostały zamrożone w ciekłym azocie w przeciągu 2–3 minut od uśmiercenia samicy. Następnie tkanki przechowywałem w temperaturze -80°C , gdzie czekały na analizy biochemiczne.

Zgodnie z opisanymi wcześniej metodami (Rozdział 2.2.1) oznaczyłem poziom uszkodzeń lipidów (poziom TABRS) we wszystkich tkankach oraz poziom uszkodzeń białek (zawartość grup karbonylowych w białkach) we wszystkich tkankach oprócz mięśni szkieletowych. Powtarzalność oznaczeń TBARS, które były wykonane dwukrotnie, wynosiła 0,89 dla nerek, 0,94 dla serca i 0,86 dla mięśni szkieletowych. Powtarzalność dla grup karbonylowych w nerkach była równa 0,72, a w sercu 0,68. Wszystkie te wartości były statystycznie wysoce istotne ($P < 0,0001$).

3.2.2. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej uszkodzeń oksydacyjnych użyłem zagnieżdżonego modelu ANOVA z grupą selekcyjną (zwierzęta z linii selekjonowanych na maksymalne tempo metabolizmu oraz z linii kontrolnych), liczbą wykarmionych miotów (0, 1, 2) oraz ich interakcjami jako czynnikami ustalonymi. Linie replikacyjne zagnieżdżone w grupie selekcyjnej oraz interakcja pomiędzy liczbą wykarmionych miotów i liniami replikacyjnymi były czynnikami losowymi. Masę ciała samic, masę narządów wewnętrznych oraz liczbę młodych wykarmionych przez samice analizowałem przy pomocy tego samego modelu. Dla korygowania masy narządów wewnętrznych o zmienność masy ciała samic, do modelu dodano masę ciała jako zmienną towarzyszącą. Dane były transformowane logarytmicznie (masy ciała i masy narządów) lub z użyciem pierwiastka kwadratowego (TBARS i zawartość grup karbonylowych w sercu) dla spełnienia założeń testów parametrycznych.

Wszystkie obliczenia przeprowadziłem z użyciem procedury MIXED, opartej na metodzie ograniczonej maksymalnej wiarygodności (REML), w programie SAS 9.1.

3.3. Wyniki

Samice z grupy 2 wykarmiły średnio 2,6 razy (grupa selekcjonowana) i 2,4 razy (grupa kontrolna) więcej młodych niż samice z grupy 1 (Ryc. 3.1). W dwuczynnikowym modelu ANOVA dla liczby wykarmionych młodych, liczba miotów była wysoce istotna ($F_{1,6} = 85,35$, $P < 0,001$), przy braku istotnego wpływu grupy selekcyjnej ($F_{1,6} = 1,79$, $P = 0,229$) oraz interakcji pomiędzy tymi dwoma czynnikami ($F_{1,6} = 0,91$, $P < 0,376$).

Samice nie rozmnażające się (grupa 0) miały istotnie mniejszą masę ciała od samic rozmnażających się z grup 1 i 2, które z kolei nie różniły się między sobą (ogólny efekt grup reprodukcyjnych w dwuczynnikowej ANOVA: $F_{2,12} = 22,81$, $P < 0,001$; Tabela 3.1). Jednocześnie samice z linii selekcjonowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu były cięższe od samic z linii kontrolnych ($F_{1,6} = 7,23$, $P = 0,0361$), a różnice te były podobne w trzech grupach reprodukcyjnych (brak istotnej statystycznie interakcji, $F_{2,12} = 0,05$, $P = 0,948$).

Podobne różnice jak w masie ciała, wykryłem w masie wątroby i nerek (Tabela 3.2). Masa obu tych narządów, kontrolowana o masę ciała, była mniejsza u osobników nie rozmnażających się (grupa 0) w stosunku do grup rozmnażających się (grupa 1 i 2), bez istotnych różnic w masie pomiędzy tymi dwoma ostatnimi grupami. Masa serca różniła się istotnie pomiędzy dwiema rozmnażającymi się grupami samic (1 i 2) i była wyższa u osobników z grupy, która wykarmiła dwa pełne mioty, natomiast obie te grupy nie różniły się w stosunku do grupy nie rozmnażającej się (Tabela 3.2). Grupa selekcyjna miała wpływ tylko na masę nerek kontrolowaną o masę ciała, która była wyższa u osobników selekcjonowanych na wysokie tempo metabolizmu (Tabela 3.2).

Poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów w nerkach i mięśniach szkieletowych (mierzony jako stężenie TBARS) okazał się istotnie niższy u samic rozmnażających się w porównaniu z nie rozmnażanymi (Tabela 3.3, Ryc. 3.2). Poziom uszkodzeń białek w sercu (mierzonych jako stężenie grup karbonylowych) miał podobny trend, ale efekt nie

osiągnął poziomu istotności statystycznej (Tabela 3.3, Ryc. 3.3). Liczba wychowanych miotów nie miała istotnego wpływu na uszkodzenia oksydacyjne w pozostałych kombinacjach rodzaju uszkodzeń i narządów. Ponadto, poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek nie różnił się pomiędzy zwierzętami z linii selekcionowanych i kontrolnych (Tabela 3.3, Ryc. 3.2, 3.3).

Poszczególne samice z obu grup rozmnażających się (1 i 2) różniły się w dużym stopniu pomiędzy sobą liczbą wykarmionych młodych na koniec eksperymentu (zakres od 1 do 14) oraz ich całkowitą masą (od 9,9 do 137 g). Wraz ze wzrostem liczby młodych w miocie i ich masą, zwiększa się również konsumpcja pokarmu, co w następstwie może prowadzić do wyższych uszkodzeń oksydacyjnych. Z tego powodu sprawdziłem, czy poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w badanych tkankach jest zależny od nakładu reprodukcyjnego samicy. Analiza nie wykazała żadnych istotnych zależności pomiędzy markerami uszkodzeń oksydacyjnych a całkowitą liczbą lub masą wykarmionych młodych (jednoczynnikowa zagnieżdżona ANCOVA; grupa selekcyjna jako czynnik i liczba młodych lub ich masa jako zmienna towarzysząca; poziom istotności P dla zmiennej towarzyszącej był w przedziale od 0,101 do 0,912).

3.4. Dyskusja

Przeprowadzone pomiary uszkodzeń oksydacyjnych u samic nornicy rudej nie potwierdzają hipotezy, że reprodukcja podwyższa poziom stresu oksydacyjnego. Wręcz przeciwnie, wbrew przewidywaniom, poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów w nerkach i mięśniach i prawdopodobnie białek w sercu był niższy u samic rozmnażających się niż u nie rozmnażających się, przy czym wszystkie pozostałe różnice między grupami różniącymi się liczbą miotów były nieistotne. Według mojej wiedzy, moje badania są drugimi, w których stwierdzono niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych podczas rozmnażania. Garratt i współpracownicy (Garratt et al., 2011) rok wcześniej stwierdzili niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów w wątrobie i mięśniach szkieletowych oraz białek w wątrobie u myszy domowych (*Mus musculus domesticus*). Różne wyniki dla poszczególnych tkanek u nornicy i badanych przez Garratta myszy wskazują na potrzebę analiz markerów stresu oksydacyjnego w różnych tkankach i narządach. Warto

wspomnieć, że samice jaszczurek o wyższym nakładzie reprodukcyjnym (o większym łęgu kontrolowanym o rozmiary ciała samicy) mają niższy komórkowy poziom RFT niż samice o niższym nakładzie (Olsson et al., 2009). Nowatorski charakter moich badań w porównaniu z wszystkimi innymi dotyczącymi stresu polega na użyciu zwierząt o genetycznie zróżnicowanym tempem metabolizmu. Jednakże nie spowodowało to podwyższenia poziomu stresu oksydacyjnego u samic z linii selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu.

Głównym założeniem moich hipotez było to, że laktacja u nornic istotnie zwiększa tempo metabolizmu ponad poziom typowy dla samic nie rozmnażających się. U wielu gatunków małych ssaków podczas laktacji notowane było istotnie zwiększone tempo metabolizmu spoczynkowego mierzone w strefie termoneutralnej (RMR_t) (Creteghy i Genoud, 2006 oraz cytacje tam zawarte). Najwyższy wzrost w całkowitym RMR_t , o 123%, odnotowano u myszy Azara (*Akodon azarae*) i u myszy laboratoryjnej – o 151%; wartości te, przy przeliczeniu RMR_t na masę ciała, wynoszą odpowiednio 101 i 61% (Speakman i McQueenie, 1996; Antinuchi i Busch, 2001). Nornice rude z macierzystej hodowli na Uniwersytecie Jagiellońskim (z której pochodziły osobniki użyte w moim eksperymencie), w czasie szczytu laktacji posiadały RMR_t o 49% wyższy niż samice nie rozmnażające się i o 30% wyższy, kiedy korygowano pomiar o masę ciała (A. Ryś i P. Koteja, dane niepubl.). W przeciwieństwie do naszych zwierząt, Trebatická i współpracownicy nie stwierdzili istotnych zmian w RMR_t nornicy rudej w czasie cyklu reprodukcyjnego (Trebatická et al., 2007). Autorzy ci przyznali jednak, że metody użyte przez nich do pomiaru RMR_t mogły zaniżyć wydatki energetyczne ponoszone przez samice podczas karmienia młodych. Moje wyniki uzyskane z mas narządów wewnętrznych (Tabela 3.2) dodatkowo potwierdzają wyższe wydatki energetyczne u nornic w czasie laktacji. Masa wątroby i nerek, korygowana o masę ciała, była u samic rozmnażających się istotnie wyższa niż u samic nie rozmnażających się. Innymi słowy, narządy te stanowiły większy procent masy ciała u nornic karmiących młode. Zarówno wątroba i nerki, a także jelito cienkie i serce, są narządami wysoce aktywnymi metabolicznie, które umożliwiają samicom przemianę pobranego pokarmu w mleko i przetwarzanie zbędnych produktów metabolizmu (Speakman i McQueenie, 1996). Tak więc większa masa tych organów, w połączeniu z wysokimi kosztami ich utrzymania, odzwierciedla się w wyższym poziomie RMR_t (Konarzewski i Diamond, 1995;

Speakman i McQueenie, 1996; Książek et al., 2004). Podobnie, istotnie większa masa nerek i marginalnie większe masa serca u nornic z linii selekcyjnych w porównaniu z liniami kontrolnymi, mogły wskazywać na wyższy poziom tempa metabolizmu u tych pierwszych. Dodatkowo, samice podczas karmienia pierwszego miotu były jednocześnie w ciąży z kolejnym miotem, co również mogło wpływać na podwyższenie ich wydatków energetycznych (Oswald i McClure, 1987; Oswald i McClure, 1990) (choć patrz Johnson et al., 2001). Tak więc, wydaje się mało prawdopodobne, aby brak zwiększonego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych mógł być spowodowany zbyt małą różnicą w tempie metabolizmu pomiędzy rozmnażającymi i nie rozmnażającymi się nornicami.

Jaki mógł być mechanizm unikania zwiększonych uszkodzeń oksydacyjnych tkanek przez rozmnażające się samice? Najprostszym wytłumaczeniem wydaje się, że zwiększone wydatki energetyczne i produkcja wolnych rodników stymulują organizm do większej produkcji substancji antyoksydacyjnych, co umożliwia uporanie się ze stresem oksydacyjnym (Monaghan et al., 2009). W badaniach nad dzikimi myszami domowymi wykazano że, obniżony poziom uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie u samic po okresie reprodukcyjnym był skorelowany ze wzrostem poziomu glutationu (Garratt et al., 2011), jednego z najbardziej aktywnych antyoksydantów (Halliwell i Gutteridge, 1999). Natomiast obniżony poziom uszkodzeń w mięśniach u tych samych samic, był raczej wynikiem działania innych czynników niż glutation, jako że nie zaobserwowano podwyższonego poziomu tego antyoksydantu w tej tkance (Garratt et al., 2011).

Innym prawdopodobnym wytłumaczeniem braku stresu oksydacyjnego u rozmnażających się nornic może być ochronna rola hormonów płciowych, głównie estrogenów. Jak i u innych ssaków, także i u gryzoni, stężenie estradiolu we krwi osiąga wysokie wartości w czasie rui i późnej ciąży, w przeciwieństwie do samic bez kontaktu z samcami (jak u naszych nie rozmnażających się samic), u których poziom estradiolu pozostaje na bardzo niskim poziomie, na granicy wykrywalności (McCormack i Greenwald, 1974; Cushing et al., 1995). Wykazano, że szczury po usunięciu jajników produkowały istotnie więcej nadtlenu wodoru niż samice kontrolne, a efekt ten zniknął po podaniu estrogenu (Borrás et al., 2003; Borrás et al., 2010). Ponadto, suplementacja samic estradiolem po zabiegu usunięcia jajników skutkowałą zwiększoną aktywnością peroksydazy glutationowej oraz wzrostem stężenia glutationu (Borrás et al., 2003; Kireev et al., 2007). Najważniejsze jest jednak to, że supresja produkcji wolnych rodników tlenu

przez estrogeny prowadzi do obniżenia poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów w różnych typach tkanek (Huh et al., 1994; Persky et al., 2000). W moim eksperymencie wszystkie samice były w ciąży podczas pierwszej laktacji, ale nie podczas drugiej (patrz metody w Rozdziale 3.2.1). Samice z jednym miotem i z dwoma miotami były uśmiercane w różnych fazach okresu reprodukcyjnego, tuż po urodzeniu drugiego miotu i po wykarmieniu drugiego miotu. Ponieważ poziom estradiolu jest najwyższy w późnej ciąży i tuż po porodzie, możliwe jest (zakładając istotną rolę estradiolu w ochronie tkanek samicy), że poziom uszkodzeń oksydacyjnych u samic z dwoma miotami byłby jeszcze niższy, gdyby były w trzeciej ciąży i zostały uśmiercone w wkrótce po urodzeniu trzeciego miotu.

Oprócz hormonów płciowych, istotny wpływ na wielkość produkcji RFT odgrywają białka rozprzegające (UCP) zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białka UCP2 i UCP3 katalizują wyciek protonów, co obniża emisję RFT z mitochondriów (Mailloux i Harper, 2011). Udowodniono jednak, że podczas laktacji aktywność białka UCP3 jest obniżona, zmniejsza się też ekspresja genów UCP3 w mięśniach, a ekspresja genów UCP2 pozostaje bez zmian (Speakman, 2008). Tak więc, rozpręganie fosforylacji oksydacyjnej przez białka UCP nie może wytłumaczyć brak stresu oksydacyjnego u karmiących samic normicy.

Biorąc pod uwagę warunki i sposób przeprowadzenia eksperymentu, nie można wykluczyć, że samice normicy, żyjące w warunkach naturalnych, doświadczają stresu oksydacyjnego podczas rozmnażania. W opisanym powyżej eksperymencie samice nie musiały być aktywne ruchowo aby zdobyć pokarm, nie musiały bronić młodych przed drapieżnikami i wykarmiły nie więcej niż dwa mioty. W warunkach naturalnych normice mogą odchowwać nawet cztery mioty podczas sezonu rozrodczego (Bujalska, 1983; Koivula et al., 2003). Eksperymentalne zwiększenie wielkości miotu u normic rudych w ich naturalnym środowisku negatywnie wpływało zarówno na płodność samic w kolejnych próbach reprodukcji, jak i na ich przeżywalność (Koivula et al., 2003). Bezpośredni mechanizm tych zmian nie był jednak znany. Takich kosztów reprodukcji nie odnotowano jednak w innych, podobnych eksperymentach na normicy rudej, prowadzonych w warunkach laboratoryjnych lub pół-naturalnych (Mappes et al., 1995; Koskela, 1998; Koskela et al., 2009). W badaniach nad pręgowcem amerykańskim (*Tamias striatus*) stwierdzono wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów wraz z

wielkością miotu i dziennymi wydatkami energetycznymi, aczkolwiek wzrost ten był bardzo słaby (Bergeron et al., 2011).

Moje powyższe badania wpisują się w bardzo zróżnicowany obraz zależności pomiędzy wysiłkiem reprodukcyjnym a stanem oksydacyjnym samic dzikich gatunków ssaków. U rozmnażających się ssaków opisano zarówno niższe uszkodzenia oksydacyjne w niektórych tkankach (Garratt et al., 2011; Xu et al. 2014; moje badania), brak wpływu reprodukcji (Nussey et al., 2009), jak i podwyższony poziom stresu oksydacyjnego (Bergeron et al., 2011; Fletcher et al., 2013; Xu et al. 2014).

Podsumowując, przeprowadzony eksperyment nie potwierdził żadnej z dwóch postawionych hipotez. Uszkodzenia oksydacyjne tkanek nie były proporcjonalne do wysiłku reprodukcyjnego, co było niezgodne z pierwszą hipotezą. Nie znalazłem też potwierdzenia drugiej hipotezy – samice o genetycznie wyższym zapotrzebowaniu energetycznym nie wykazywały większych uszkodzeń oksydacyjnych – poziom uszkodzeń nie różnił się pomiędzy samicami z linii selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu i samicami z linii kontrolnych. Podwyższony poziom obrony antyoksydacyjnej i działanie hormonów płciowych byłby najprostszym wytłumaczeniem tych wyników. Być może zwiększenie wydatków energetycznych rozmnażających się samic, uwidocznione w ich większych narządach wewnętrznych, nie było wystarczające, aby mogło doprowadzić do zwiększonych uszkodzeń oksydacyjnych. Z tego też względu zaplanowałem kolejny eksperyment, w którym samice były zmuszane do znacznie wyższego wysiłku reprodukcyjnego.

3.5. Tabele i ryciny

Tabela 3.1. Średnia masa ciała (gramy) ($\pm$ SE, błąd standardowy średniej) samic nornicy rudej selekcjonowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu oraz samic kontrolnych z trzech grup eksperymentalnych, różniących się liczbą odchowanych miotów. N = 12 dla każdej ze średnich. Różne litery (a, b) pokazują istotne statystycznie różnice masy ciała pomiędzy samicami z grup 0, 1 i 2, otrzymane z analizy wielokrotnych kontrastów po ANOVA ($P < 0,05$).

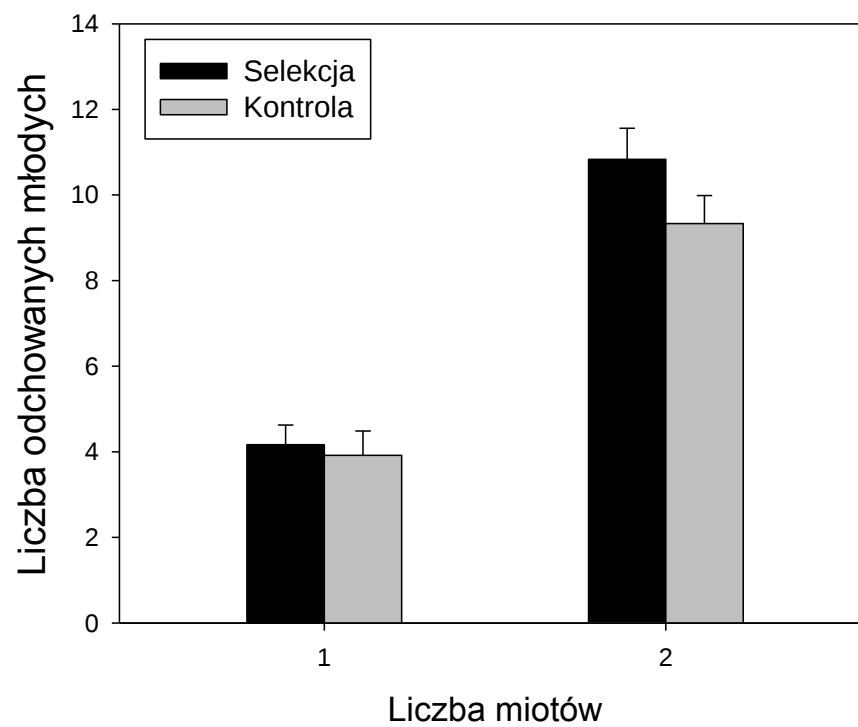
Grupa selekcyjna	Liczba miotów		
	0	1	2
Selekcja	23,5 $\pm$ 1,6	29,8 $\pm$ 1,4	29,3 $\pm$ 1,0
Kontrola	20,6 $\pm$ 1,2	25,6 $\pm$ 0,6	25,5 $\pm$ 0,5
	a	b	b

Tabela 3.2. Masa narządów wewnętrznych (g, $\pm$ SE) samic nornicy rudej (A), oraz wyniki dwuczynnikowej zagnieżdżonej ANCOVA mas narządów z grupą selekcyjną i liczbą miotów jako główne czynniki oraz masą ciała jako zmienną towarzyszącą (B). N = 12 dla każdej ze średnich. Różne litery (a, b) w części (A) pokazują istotne statystycznie różnice pomiędzy samicami z grup 0, 1 i 2, otrzymane z analizy wielokrotnych kontrastów po ANCOVA ($P < 0,05$).

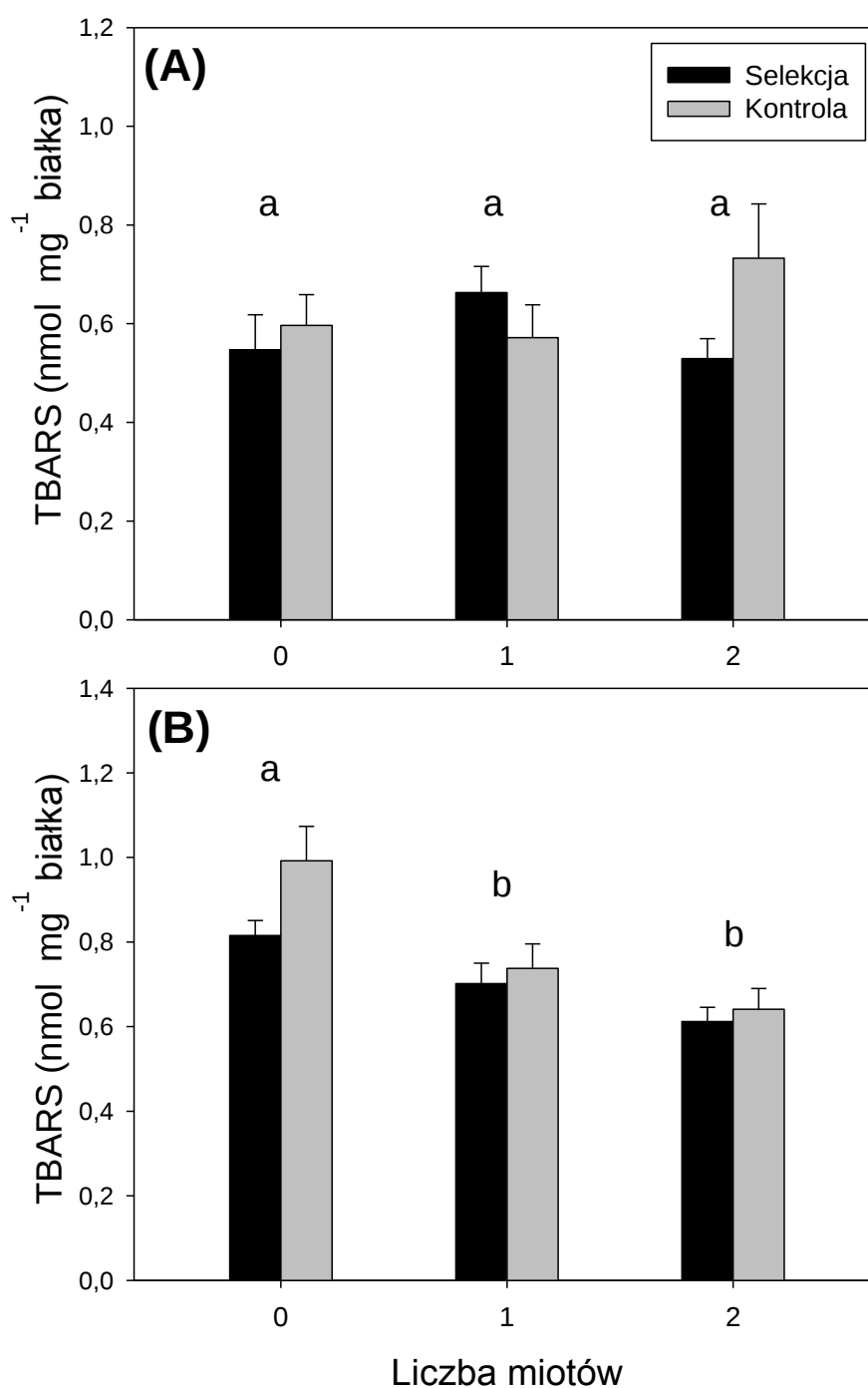
(A) Narząd	Grupa selekcyjna	Liczba miotów		
		0	1	2
Wątroba	Selekcja	1,31 $\pm$ 0,11	1,97 $\pm$ 0,12	1,95 $\pm$ 0,13
	Kontrola	0,98 $\pm$ 0,06	1,76 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,08
		a	b	b
Nerki	Selekcja	0,316 $\pm$ 0,021	0,430 $\pm$ 0,017	0,385 $\pm$ 0,013
	Kontrola	0,251 $\pm$ 0,012	0,351 $\pm$ 0,015	0,344 $\pm$ 0,015
		a	b	b
Serce	Selekcja	0,150 $\pm$ 0,009	0,169 $\pm$ 0,007	0,174 $\pm$ 0,006
	Kontrola	0,116 $\pm$ 0,004	0,143 $\pm$ 0,006	0,153 $\pm$ 0,005
		ab	a	b
(B) Narząd	Liczba miotów	Grupa selekcyjna	Interakcja	Masa ciała
Wątroba	$F_{2,12} = 17,16$	$F_{1,6} = 0,07$	$F_{2,12} = 4,26$	$F_{1,46} = 145,4$
	$P = 0,0003$	$P = 0,803$	$P = 0,040$	$P < 0,0001$
Nerki	$F_{2,12} = 7,28$	$F_{1,6} = 6,07$	$F_{2,12} = 1,77$	$F_{1,47} = 63,59$
	$P = 0,0085$	$P = 0,049$	$P = 0,211$	$P < 0,0001$
Serce	$F_{2,12} = 3,13$	$F_{1,6} = 4,59$	$F_{2,12} = 2,34$	$F_{1,47} = 60,68$
	$P = 0,081$	$P = 0,076$	$P = 0,139$	$P < 0,0001$

Tabela 3.3. Wyniki dwuczynnikowej zagnieżdżonej ANOVA dla markerów uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w badanych narządach samic nornicy rudej, z liczbą miotów i grupą selekcyjną jako głównymi czynnikami. Interakcje pomiędzy grupą selekcyjną a liczbą miotów nie były istotne w żadnym narządzie.

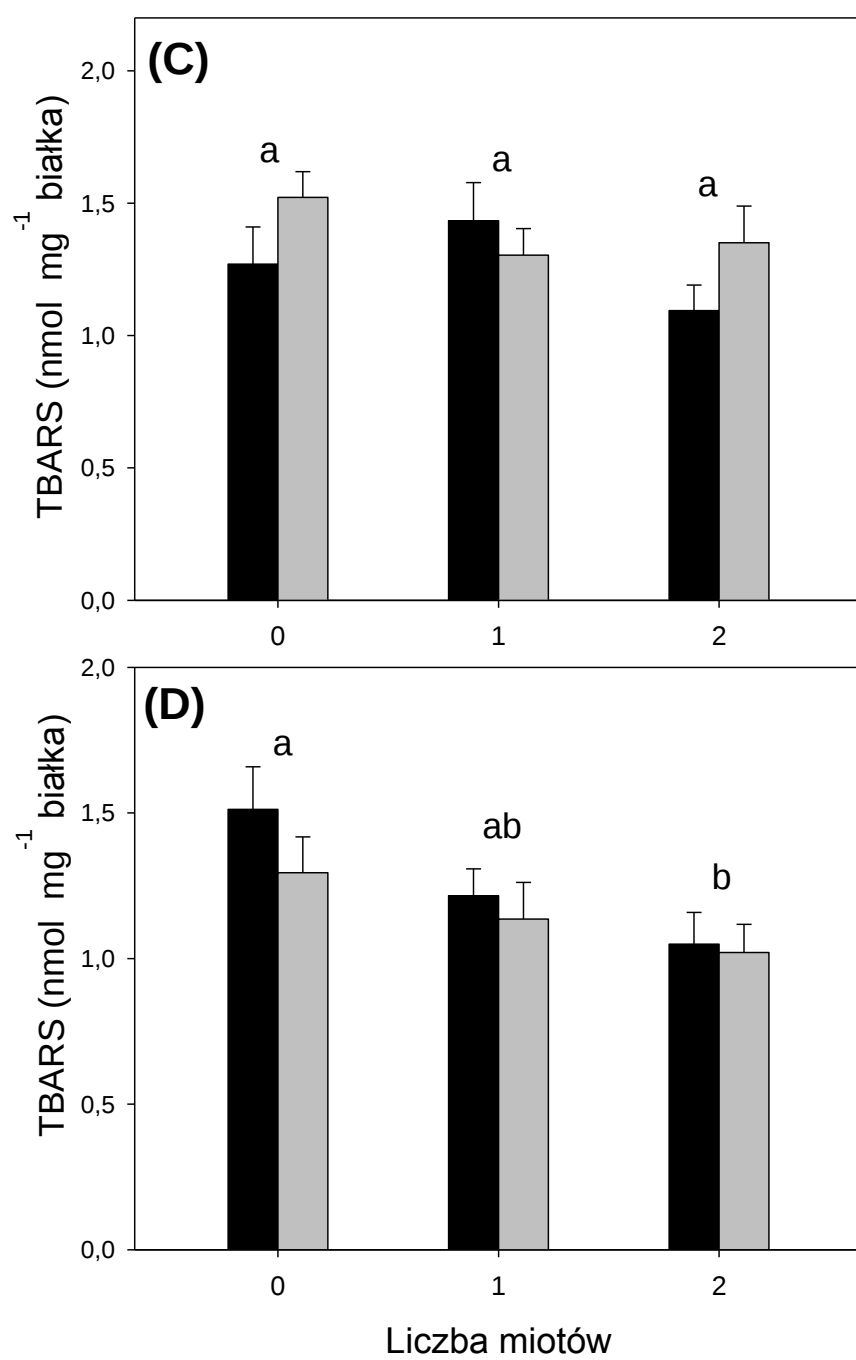
Uszkodzenia oksydacyjne	Narząd	Liczba miotów	Grupa selekcyjna
Lipidy (TBARS)	wątroba	$F_{2,12} = 0,38, P = 0,689$	$F_{1,6} = 0,87, P = 0,387$
	nerki	$F_{2,12} = 12,21, P = 0,001$	$F_{1,6} = 2,99, P = 0,134$
	serce	$F_{2,12} = 1,40, P = 0,284$	$F_{1,6} = 2,17, P = 0,191$
	mięśnie	$F_{2,12} = 5,03, P = 0,0259$	$F_{1,6} = 1,29, P = 0,299$
Białka (grupy karbonylowe)	wątroba	$F_{2,12} = 1,53, P = 0,256$	$F_{1,6} = 0,08, P = 0,791$
	nerki	$F_{2,12} = 1,07, P = 0,373$	$F_{1,6} = 0,00, P = 0,991$
	serce	$F_{2,12} = 2,83, P = 0,098$	$F_{1,6} = 1,38, P = 0,284$



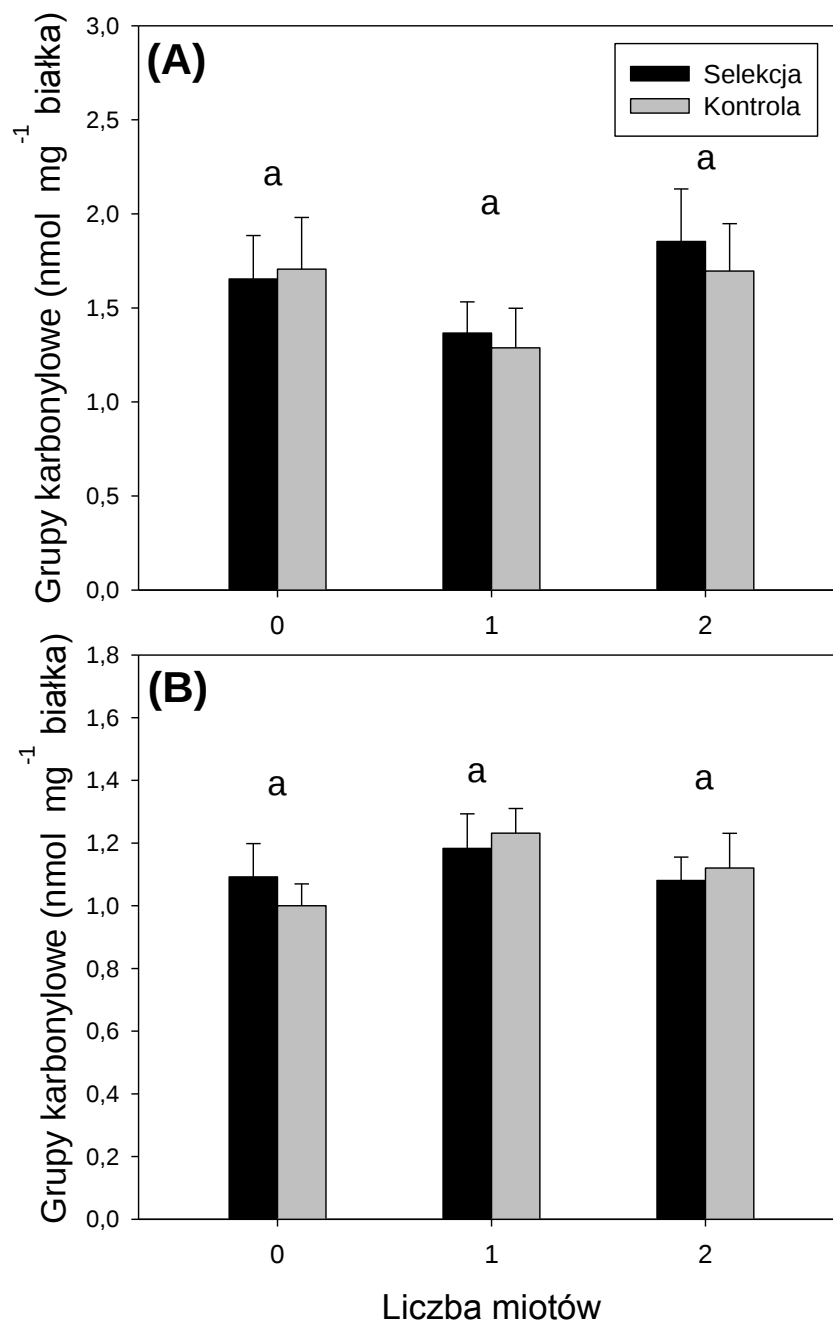
Ryc. 3.1. Całkowita liczba młodych wykarmionych przez samice, które miały jeden i dwa mioty. Samice pochodziły z linii selekcjonowanych na wysokie tempo metabolizmu i linii kontrolnych. Wartości średnie + SE (błąd standardowy średniej).



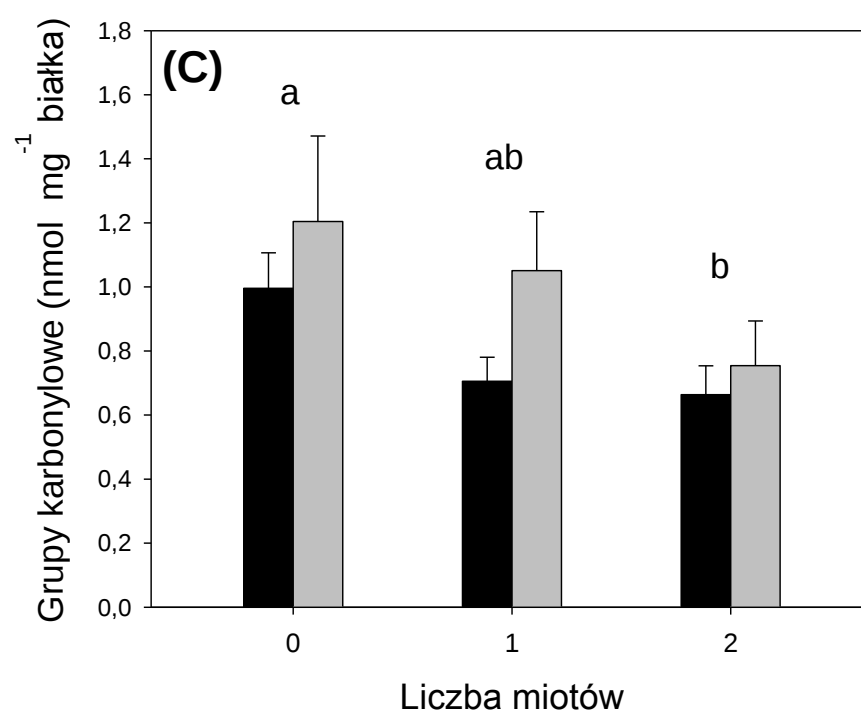
Ryc. 3.2 (część 1/2). Średnie (+ SE) stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS; markerów oksydacyjnych uszkodzeń lipidów) w narządach i mięśniach szkieletowych samic nie rozmnażających się i samic, które wykarmiły jeden i dwa mioty. (A) wątroba, (B) nerki, (C) serce, (D) mięśnie szkieletowe. Różne litery nad słupkami pokazują statystycznie istotne różnice pomiędzy samicami z grup 0, 1 i 2, otrzymane z analizy wielokrotnych kontrastów po ANOVA ($P < 0,05$).



Ryc. 3.2 (część 2/2).



Ryc. 3.3 (część 1/2). Średnie (+ SE) stężenie grup karbonylowych w białkach, markera oksydacyjnych uszkodzeń białek w narządach samic nie rozmnażających się i samic, które wykarmiły jeden i dwa mioty. (A) wątroba, (B) nerki, (C) serce. Oznaczenia jak na Ryc. 3.2.



Ryc. 3.3 (część 2/2).

4. Wpływ eksperymentalnego zwiększania i zmniejszania wysiłku reprodukcyjnego na poziom stresu oksydacyjnego

4.1. Wstęp, cele i hipotezy

Mój pierwszy eksperyment wykazał, że samice, które wykarmiły jeden lub dwa mioty nie wykazują podwyższonego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w porównaniu z osobnikami nie rozmnażającymi się, a w niektórych narządach poziom ten był nawet niższy. Wyniki te mogły mieć związek ze zbyt małym wysiłkiem reprodukcyjnym samic nornicy, dlatego też w kolejnym eksperymencie znacznie zwiększyłem ten wysiłek poprzez manipulowanie wielkością miotów.

Wyniki dotychczasowych badań, w których autorzy próbowali wyjaśnić zależność pomiędzy kosztami reprodukcji a poziomem stresu oksydacyjnego nie są jednoznaczne i przedstawiają wszelkie możliwe wyniki od dodatnich korelacji, poprzez ich brak, aż do korelacji ujemnych (Stier et al., 2012; Metcalfe i Monaghan, 2013; Speakman i Garratt, 2014). Jedną z przyczyn takiej rozbieżności w wynikach mogły być wady układu eksperymentalnego w pracach laboratoryjnych (Metcalfe i Monaghan, 2013). Zwierzęta w tych eksperymentach były karmione *ad libitum*, przez co mogły po prostu zwiększyć konsumpcję pokarmu i spożytkowywać ją na obronę antyoksydacyjną i mechanizmy naprawcze. Co ważniejsze, wysiłek reprodukcyjny zwierząt powinien być manipulowany poprzez zwiększanie lub zmniejszanie liczby młodych w miocie lub lęgu. Jeśli zwierzęta mogą się swobodnie rozmnażać, produkują zróżnicowaną liczbę potomstwa w zależności od swego stanu fizjologicznego, unikając w ten sposób stresu oksydacyjnego. Prawdziwe koszty reprodukcyjne mogą się pojawić wtedy, gdy zwierzęta zostaną zmuszone do wyższego wysiłku reprodukcyjnego poprzez powiększenie miotu/lęgu lub przez zmuszenie do dodatkowej pracy aby zdobyć odpowiednią ilość pokarmu (Metcalfe i Monaghan, 2013).

Badania dotyczące manipulacji wysiłkiem reprodukcyjnym u ssaków i jego wpływu na poziom stresu oksydacyjnego są ciągle nieliczne (Aloise King et al., 2013; Xu et al., 2014; Plumel et al., 2014; Garratt et al., 2013). Wszystkie one były prowadzone mniej więcej w tym samym czasie, co mój eksperyment. Trzy z nich (Aloise King et al.,

2013; Garratt et al., 2013; Xu et al., 2014) nie wykazały wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego wraz ze zwiększaniem się wysiłku reprodukcyjnego, a w kilku przypadkach rejestrowany był nawet jego spadek w porównaniu z nie rozmnażającymi się samicami. W czwartej pracy, autorstwa Plumela i współpracowników (Plumel et al., 2014), wykazano wzrost poziomu nadtlenku wodoru w osoczu u samic myszy o zwiększonych miotach, względem samic z miotami pomniejszonymi, co może, ale niekoniecznie musi oznaczać wzrost poziomu stresu oksydacyjnego.

We wszystkich powyższych eksperymentach manipulacje wysiłkiem reprodukcyjnym ograniczone były tylko do jednego miotu (Garratt et al., 2013; Plumel et al., 2014; Xu et al., 2014) lub do dwóch miotów (Aloise King et al., 2013). Garratt i współpracownicy (Garratt et al., 2013), którzy nie znaleźli oznak stresu oksydacyjnego u samic myszy domowej z powiększonymi miotami, sugerowali, że mogłyby się one pojawić po wychowaniu kolejnych miotów. Speakman i Garratt (2013) zwrócili uwagę na fakt, że młode samice mają potencjalnie duże perspektywy rozmnażania się w przyszłości i może im się bardziej niż starszym samicom opłacać, by zainwestować w obronę antyoksydacyjną i zagwarantować sobie dożycie do późniejszego pomyślnego rozrodu. Mogłoby to tłumaczyć niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych obserwowany u samic rozmnażających się po raz pierwszy niż u samic dziewiczych w eksperymencie tych autorów (jak również w moich badaniach, opisanych w poprzednim rozdziale).

Swoje kolejne badania ponownie przeprowadziłem na nornicy rudej pochodzącej ze sztucznej selekcji prowadzonej na Uniwersytecie Jagiellońskim (Sadowska et al., 2008, 2015; Konczal et al., 2015), ale plan eksperymentu został tak skonstruowany, aby rozwiązać wspomniane wyżej problemy metodologiczne. Po pierwsze, zgodnie z zaleceniami Metcalfe i Monaghan (2013), postanowiłem manipulować wysiłkiem rodzicielskim samic poprzez zmniejszanie i zwiększanie oryginalnej wielkości miotu. Samice nie rozmnażające się posłużyły mi za kontrolę. Po drugie, samice wychowywały cztery kolejne mioty, co jest maksymalną liczbą miotów w sezonie reprodukcyjnym i najprawdopodobniej w całym życiu nornicy rudej. Samice pozostawały we wspólnej klatce z samcami do czasu urodzenia czwartego miotu, w związku z czym w czasie laktacji były jednocześnie w kolejnej ciąży. Zabieg ten spowodował skoncentrowanie bardzo energochłonnych okresów kolejnych laktacji w krótkim czasie. Nie są mi znane inne eksperymenty, w których badano poziom stresu oksydacyjnego u zwierząt o tak

wysokim wysiłku reprodukcyjnym. Tak więc, ewentualny brak zwiększonych uszkodzeń oksydacyjnych, lub innych objawów stresu oksydacyjnego, u samic zmuszonych do wykarmienia czterech powiększonych miotów wskazywałby wyraźnie, że zwiększony poziom stresu oksydacyjnego nie jest istotnym mechanizmem leżącym u podstaw kompromisu ewolucyjnego pomiędzy wysiłkiem reprodukcyjnym a przyszłą płodnością i przeżywalnością (np. Koivula et al., 2003).

Tak jak w poprzednim eksperymencie, badałem poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w różnych tkankach. Dla lepszej interpretacji wyników, rozszerzyłem badania o pomiar poziomu całkowitego glutationu i aktywność katalazy – dwóch bardzo ważnych antyoksydantów odpowiedzialnych za ochronę przed stresem oksydacyjnym. Jeśli hipoteza dotycząca stresu oksydacyjnego jest prawdziwa, oznaki tego stresu powinny być widoczne u samic o powiększonych miotach, a samice te powinny się charakteryzować obniżonym poziomem antyoksydantów. Z drugiej strony, oczekiwałem, że w grupie samic o zmniejszonych miotach, będzie widoczny ochronny efekt działania estrogenów, a poziom obrony antyoksydacyjnej będzie wyższy, co doprowadzi do mniejszego stresu oksydacyjnego. Testowałem cztery hipotezy:

1. Samice o niskim wysiłku reprodukcyjnym (o zredukowanych miotach) mają niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach niż nie rozmnażające się samice (podobnie jak w moim poprzednim eksperymencie).
2. Samice o podwyższonym wysiłku reprodukcyjnym (o powiększonych miotach) mają większe uszkodzenia oksydacyjne w stosunku do nie rozmnażających się samic.
3. Samice z linii selekcjonowanych (o wyższym tempie metabolizmu) mają wyższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych w porównaniu do samic z linii kontrolnych (zarówno w grupie samic rozmnażających się, jak i nie rozmnażających).
4. Poziom antyoksydantów jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu uszkodzeń oksydacyjnych.

4.2. Materiał i metody

4.2.1. Plan eksperymentu

Do moich badań ponownie posłużyłem się nornicami rudymi ze sztucznej selekcji prowadzonej na Uniwersytecie Jagiellońskim (Sadowska et al., 2008; Sadowska et al., 2015). Tym razem osobniki pochodziły z 12 i 14 pokolenia i podobnie jak w pierwszym eksperymencie, należały do linii selekcionowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu oraz do linii kontrolnych. W hodowli wyjściowej, na Uniwersytecie Jagiellońskim, średnia wielkość miotu samic z linii selekcyjnych w chwili odstawienia młodych od matki (w 17-tym dniu ich życia), dla pokoleń 12 i 14, wynosiła 5,3 oraz 4,8 w liniach kontrolnych (dane uśrednione dla samic, które wykarmiły przynajmniej trzy mioty, i dla dwóch pokoleń; P. Koteja, dane niepubl.). Pozostałe szczegóły dotyczące hodowli zostały zawarte w Rozdziale 2.1 („Zwierzęta”) w głównych „Materiałach i metodach”.

Na początku eksperymentu wszystkie osobniki były dziewicze i miały ok. 3,5 miesiąca życia. Łącznie użyłem 172 samic, 89 z linii selekcionowanych i 83 z linii kontrolnych (92 samice pochodziły z 12 pokolenia, a 80 z 14 pokolenia eksperymentu selekcyjnego) (Tabela 4.1). W każdym z pokoleń, samice z każdej z czterech linii replikacyjnych w dwóch grupach selekcyjnych zostały losowo przyporządkowane do jednej z trzech grup reprodukcyjnych: 1. osobniki nie rozmnażające się, bez kontaktu z samcem przez cały okres eksperymentu; 2. samice o zredukowanej wielkości każdego z czterech miotów do 2 młodych; 3. samice o zwiększonej wielkości każdego z czterech miotów o dwa dodatkowe młode (Tabela 4.1). Manipulacje liczbą młodych w miotach były robione w ciągu dwóch pierwszych dni po urodzeniu, przez cztery kolejne mioty. Samice nornicy rudej bardzo łatwo akceptują obce młode, jeżeli są zbliżone wiekiem i wielkością do własnych (Mappes et al., 1995). W 17 dniu od urodzenia odnotowywano liczbę i masę młodych i odłączano je od matki, a samica z samcem trafiały do nowej, czystej klatki, w której rodzony był kolejny miot. Samiec był usuwany z klatki dopiero po urodzeniu czwartego miotu przez samicę (aby samica nie zaszła w ciążę po raz piąty).

Po wykarmieniu ostatniego, czwartego miotu samica była zabijana przez dyslokację rdzenia kręgowego. Samice z grupy nie rozmnażanej były uśmiercane w tym samym

czasie co samice z powiększonymi i pomniejszonymi miotami. Wszystkie samice zostały zważone z dokładnością do 0,1 g, a następnie wątroba, obie nerki, serce (po usunięciu krwi) i mięśnie szkieletowe uda zostały wysekcjonowane, zważone z dokładnością do 0,001 g i natychmiast zamrożone w ciekłym azocie. Zamrożone próbki zostały przeniesione do zamrażarki i przechowywane w temperaturze -80°C , gdzie czekały na analizy. Całe jelito (jelito cienkie, ślepe i grube) zostało wypreparowane, oczyszczone z treści pokarmowej, wysuszone do stałej masy i zważone z dokładnością do 0,001 g. Oznaczenia uszkodzeń oksydacyjnych lipidów (stężenie TBARS) i białek (zawartość grup karbonylowych w białkach) oraz poziomu antyoksydantów (całkowity glutation i katalaza) zostały przeprowadzone zgodnie z opisem w Rozdziale 2.2. Powtarzalność (współczynnik korelacji wewnątrzklasowej; Lessels i Boag, 1987) wszystkich oznaczeń uszkodzeń oksydacyjnych była wyższa niż 0,96.

4.2.2. Analiza statystyczna

Główny model ANOVA – użyty do testowania różnic w liczbie i masie młodych, okresie czasu pomiędzy kolejnymi urodzeniami, masie samic i ich narządów wewnętrznych oraz stężeniu markerów stresu oksydacyjnego i antyoksydantów – zawierał grupę reprodukcyjną (samice nie rozmnażające się, zmniejszone mioty, zwiększone mioty), grupę selekcyjną (linie selekcyjne i kontrolne) i pokolenie (12, 14) jako czynniki ustalone oraz linie replikacyjne zagnieżdżone w grupie selekcyjnej jako czynnik losowy. Wyjściowy model zawierał także wszystkie odpowiednie interakcje pomiędzy czynnikami. Interakcje nieistotne statystycznie były kolejno usuwane, za wyjątkiem interakcji między grupą reprodukcyjną a grupą selekcyjną, która była traktowana jako immanentna część modelu, obecna bez względu na jej statystyczną istotność.

Dla spełnienia założeń testów parametrycznych, porównania liczby i masy młodych pomiędzy grupami reprodukcyjnymi, selekcyjnymi i pokoleniami, były wykonywane po transformacji z użyciem pierwiastka kwadratowego. Długości okresów pomiędzy kolejnymi urodzeniami u samic były logarytmowane. W porównaniach masy wątroby, nerek, serca i jelit, do głównego modelu została włączona całkowita masa ciała jako zmienna towarzysząca, a masa wszystkich narządów, jak również masa ciała,

zostały zlogarytmowane. Przed analizą stężenia TBARS z zastosowaniem głównego modelu, wartości stężeń we wszystkich tkankach (w wątrobie, nerkach, sercu i mięśniach szkieletowych) były logarytmowane, a w analizie zawartości grup karbonylowych logarytmowano tylko stężenia w wątrobie. Takie same transformacje TBARS i grup karbonylowych były użyte przy testowaniu ich korelacji z liczbą i masą wykarmionych młodych (liczba i masa nie transformowane). Poziom antyoksydantów (glutationu i katalazy) był logarytmowany we wszystkich przeprowadzonych analizach. Zależność pomiędzy zlogarytmowanym stężeniem TBARS i grup karbonylowych a poziomem antyoksydantów był testowany poprzez włączenie do głównego modelu stężenia glutationu lub aktywności katalazy jako zmiennej towarzyszącej.

Założenie o homogenności nachyleń było zawsze sprawdzane przed przeprowadzeniem ANCOVA. Dla porównań *a posteriori* parami pomiędzy grupami czynników z więcej niż dwoma poziomami, został użyty test Tukeya-Kramera. Wszystkie analizy statystyczne były przeprowadzone w programie SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA) z użyciem procedury MIXED, opartej na metodzie ograniczonej maksymalnej wiarygodności (REML). Wobec kontrolowania zmienności analizowanych zmiennych o dużą liczbę czynników i z powodu licznych transformacji danych, w niniejszym rozdziale przedstawiono średnie korygowane z zastosowanych modeli wraz z ich 95% przedziałami ufności.

4.3. Wyniki

4.3.1. Wielkość i masa miotu

Wszystkie samice urodziły cztery kolejne mioty. Samice z grupy o powiększonych miotach wykarmiły 3,5 razy więcej młodych niż samice z grupy o zmniejszonych miotach. Nie znalazłem statystycznie istotnych różnic pomiędzy dwiema grupami selekcyjnymi (nornice z linii selekcyjnych i linii kontrolnych), ani między dwoma pokoleniami (ANOVA; grupa reprodukcyjna: $F_{1,6} = 765,2$, $P < 0,0001$; grupa selekcyjna: $F_{1,6} = 0,17$, $P = 0,698$; pokolenie: $F_{1,7} = 1,02$, $P = 0,347$; interakcja grupa reprodukcyjna $\times$ grupa selekcyjna $F_{1,6} = 5,57$, $P = 0,056$) (Ryc. 4.1. A). Samice

selekcyjne i kontrolne z grupy o powiększonych miotach wykarmiły średnio o 0,89 ([0,53 - 1,25], 95% przedział ufności) i o 0,93 [0,56 - 1,31] młodych więcej niż odnotowano w ich miotach przed manipulacją. Średnia wielkość miotu u tych samic w chwili odłączenia po wykarmieniu wyniosła odpowiednio 6,26 [5,88 - 6,64] i 5,86 [5,36 - 6,36] młodych.

Całkowita masa czterech wykarmionych miotów była 2,7 razy większa w grupie o zwiększonej niż o zmniejszonej wielkości miotu ($F_{1,6} = 402,6$, $P < 0,0001$) i była większa w pokoleniu 14 niż w 12 ($F_{1,7} = 8,91$, $P = 0,020$). Nie różniła się jednak istotnie pomiędzy liniami selekcyjonowanymi i kontrolnymi ($F_{1,6} = 0,48$, $P = 0,516$). Interakcja pomiędzy grupą reprodukcyjną a grupą selekcyjną również nie była istotna statystycznie ($F_{1,6} = 2,79$, $P = 0,146$) (Ryc. 4.1. B).

Średni czas pomiędzy urodzeniem dwóch kolejnych miotów był dłuższy u samic o powiększonych miotach niż u samic o miotach zmniejszonych; mediana wyniosła odpowiednio 24,4 i 20,7 dni (grupa reprodukcyjna: $F_{1,6} = 6,49$, $P = 0,044$; grupa selekcyjna: $F_{1,6} = 0,40$, $P = 0,551$; pokolenie: $F_{1,7} = 0,01$, $P = 0,943$; grupa reprodukcyjna $\times$ grupa selekcyjna: $F_{1,6} = 0,14$, $P = 0,719$). Wniosując na podstawie tych okresów, 84% drugich, trzecich i czwartych miotów było poczęte w czasie krótkiego okresu rui pourodzeniowej, a samice były w ciąży podczas laktacji (83,3% samic z powiększonymi miotami i 84,4% samic z pomniejszonymi miotami) (założono tu okres poniżej 28 dni pomiędzy kolejnymi urodzeniami; Steven, 1957; Gustafsson et al., 1980).

4.3.2. Masa ciała i masa metabolicznie aktywnych narządów u samic

Masa ciała samic różniła się pomiędzy poszczególnymi grupami reprodukcyjnymi (ANOVA; $F_{2,12} = 50,68$, $P < 0,0001$). Była ona niższa u nie rozmnażających się samic, zarówno w porównaniu z samicami o powiększonych, jak i o pomniejszonych miotach (test Tukeya-Kramera; $P < 0,0001$), ale nie różniła się pomiędzy tymi dwiema grupami rozmnażających się samic (test Tukeya-Kramera; $P < 0,593$; Tabela 4.2). Masa ciała samic z linii selekcyjonowanych była wyższa niż u samic z linii kontrolnych ($F_{1,6} = 9,07$, $P = 0,024$), a także była wyższa w pokoleniu 14 niż w 12 ($F_{1,7} = 24,59$; $P = 0,0016$).

Masa metabolicznie aktywnych narządów wewnętrznych (wątroby, nerek, serca i jelit) wzrastała wraz ze wzrostem całkowitej masy ciała, aczkolwiek w przypadku

wątroby i serca stwierdzono statystycznie istotną interakcję pomiędzy masą ciała a grupą reprodukcyjną (ANCOVA z masą ciała jako zmienną towarzyszącą; Tabela 4.3). Interakcja ta wynikała z większego nachylenia linii regresji dla grupy nie rozmnażających się samic (wątroba: $b = 1,292 \pm 0,092$; serce: $b = 0,867 \pm 0,083$ [$\pm$ błąd standardowy]) w porównaniu z dwoma grupami samic rozmnażających się (które nie różniły się między sobą; wątroba: $b = 0,759 \pm 0,128$; serce: $b = 0,351 \pm 0,070$). Pomimo tej interakcji, aby przedstawić ogólny obraz zależności, dla każdego z narządów obliczyłem model ANCOVA z jednym wspólnym nachyleniem prostej dla wszystkich trzech grup reprodukcyjnych (bez włączania interakcji do modelu). Masy wszystkich czterech narządów wewnętrznych, po skorygowaniu o masę ciała, były wyższe u samic z linii selekcyonowanych w stosunku do linii kontrolnych, aczkolwiek różnice te były marginalnie nieistotne statystycznie dla wątroby i jelita (Tabela 4.3). Skorygowana o masę ciała masa wątroby, nerek, jelit, ale nie serca, była większa u samic z grupy o powiększonych miotach niż w dwóch pozostałych grupach reprodukcyjnych. Ponieważ porównanie grup reprodukcyjnych było mało wiarygodne w przypadku wątroby i serca z powodu niespełnienia założenia o homogenności nachyleń, przeprowadziłem podobną analizę ANCOVA dla tych dwóch narządów, ograniczając ją do dwóch grup samic rozmnażających się (dla których założenie homogenności było spełnione). Analiza ta potwierdziła, że skorygowana o masę ciała masa wątroby, ale nie serca, była większa w grupie o powiększonych miotach w stosunku do samic z grupy ze zmniejszonymi miotami (Tabela 4.3 B, część 2).

4.3.3. Uszkodzenia oksydacyjne tkanek

Stężenie TBARS, markera uszkodzeń oksydacyjnych lipidów, różniło się istotnie pomiędzy grupami reprodukcyjnymi tylko w wątrobie (Tabela 4.4, Ryc. 4.2). W przeciwieństwie do przewidywań, najwyższe stężenie TBARS w tym narządzie było u nie rozmnażających się samic, a najniższe u samic z powiększonymi miotami (Ryc. 4.2 A). Dokładnie taki sam obraz otrzymałem w przypadku poziomego stężenia grup karbonylowych (markera uszkodzeń oksydacyjnych białek) w wątrobie; tam także stężenie było najwyższe u samic nie przystępujących do reprodukcji, a najniższe u samic o powiększonych miotach (Ryc. 4.3 A). Statystycznie istotny efekt grupy reprodukcyjnej

otrzymałem także w przypadku stężenia grup karbonylowych w sercu, aczkolwiek tutaj dodatkowo istotna była interakcja pomiędzy grupą reprodukcyjną a pokoleniem (Tabela 4.4). W modelach ANOVA liczonych oddzielnie dla każdego z dwóch pokoleń, różnice pomiędzy grupami reprodukcyjnymi były istotne w pokoleniu 12 (Ryc. 4.3 C) ($F_{2,12} = 15,52$, $P = 0,0005$; grupa selekcyjna: $F_{1,6} = 1,36$, $P = 0,287$), ale nie w pokoleniu 14 ($F_{2,12} = 0,30$, $P = 0,746$; grupa selekcyjna: $F_{1,6} = 0,37$, $P = 0,565$).

Samice selekcjonowane na wysokie tempo metabolizmu nie różniły się istotnie od samic z grupy kontrolnej, ani w przypadku TBARS, ani grup karbonylowych, w żadnych z badanych narządów (Tabela 4.4, Ryc. 4.2 i 4.3). Z drugiej jednak strony, samice z dwóch badanych pokoleń różniły się poziomem uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w prawie każdym badanym narządzie. W każdym z przypadków, gdzie różnica ta była istotna statystycznie, uszkodzenia były wyższe w pokoleniu 12 niż w 14, za wyjątkiem uszkodzeń lipidów w sercu, gdzie sytuacja była odwrotna.

Poszczególne samice, które rozmnażały się, różniły się w znaczący sposób całkowitą liczbą młodych odchowanych w czterech miotach (od 3 do 34) oraz ich łączną masą (od 28 do 282 g). Z tego też względu sprawdziłem, czy wielkość tego wysiłku reprodukcyjnego wpłynęła na poziom uszkodzeń oksydacyjnych (stężenie TBARS i grup karbonylowych) w badanych tkankach. Nie znalazłem jednak żadnej istotnej statystycznie zależności pomiędzy tymi zmiennymi (wartości P : 0,075–0,994; ANCOVA z liczbą lub masą odchowanych młodych jako zmienną towarzyszącą).

4.3.4. Obrona antyoksydacyjna

Aktywność katalazy nie różniła się pomiędzy grupami reprodukcyjnymi, grupami selekcyjnymi, czy między dwoma pokoleniami, zarówno w wątrobie (ANOVA; odpowiednio: $F_{2,12} = 2,69$, $P = 0,108$; $F_{1,6} = 0,01$, $P = 0,938$; $F_{1,7} = 0,37$, $P = 0,562$), jak i w nerkach ($F_{2,12} = 2,13$, $P = 0,162$; $F_{1,6} = 0,09$, $P = 0,773$; $F_{1,7} = 1,48$, $P = 0,264$). Także poziom całkowitego glutationu (GSH) w wątrobie nie różnił się istotnie pomiędzy grupami reprodukcyjnymi ($F_{2,12} = 1,66$, $P = 0,231$), czy grupami selekcyjnymi ($F_{1,6} = 0,11$, $P = 0,757$). Poziom GSH różnił się jednak statystycznie istotnie między pokoleniami ($F_{1,7} = 53,58$, $P = 0,0002$) i był on wyższy w pokoleniu 14 (w którym poziom uszkodzeń

oksydacyjnych białek i lipidów w wątrobie był niższy). Wszystkie interakcje były nieistotne statystycznie.

Następnie sprawdziłem, czy poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów lub białek w wątrobie i nerkach jest zależny od poziomu obrony antyoksydacyjnej. W tym celu przetestowałem model ANCOVA z poziomem uszkodzeń oksydacyjnych jako zmienną zależną i poziomem GSH lub aktywności katalazy jako zmienną towarzyszącą (Tabela 4.5). W przypadku wątroby poziom uszkodzeń oksydacyjnych nie był zależny od badanych antyoksydantów, ale w nerkach poziom uszkodzeń oksydacyjnych zarówno lipidów, jak i białek, zmniejszał się wraz ze wzrostem aktywności katalazy (poziom glutationu nie był mierzony w nerkach; Tabela 4.5). Wszystkie powyższe analizy wskazały wyższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych (korygowanych o poziom antyoksydantów) w pokoleniu 12. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie, korygowanych o stężenie GSH lub o aktywność katalazy, był nadal wyższy w grupie nie rozmnażających się samic w stosunku do dwóch pozostałych grup samic rozmnażających się (Tabela 4.5; test Tukeya-Kramera; $P < 0,05$). Poziom uszkodzeń w nerkach korygowanych o poziom aktywności katalazy nie różnił się jednak pomiędzy trzema grupami reprodukcyjnymi (Tabela 4.5).

4.4. Dyskusja

Podstawowe przewidywanie hipotezy wiążącej historię życia ze stresem oksydacyjnym jest takie, że podwyższenie poziomu tempa metabolizmu podczas reprodukcji prowadzi nieuchronnie do zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu, które powodują trwałe uszkodzenia oksydacyjne, utrzymujące się po okresie rozrodu. Wcześniejsze badania laboratoryjne testujące tę hipotezę, przeprowadzone na małych ssakach, dostarczają nie do końca spójne wyniki, które mogą być efektem korzystnych warunków laboratoryjnych i w konsekwencji wysiłku rodzicielskiego dalekiego od maksymalnego (Metcalf i Monaghan, 2013). Z tego względu manipulowałem wielkością miotu u samic nornicy rudej poprzez dodawanie dwóch dodatkowych młodych lub pozostawienie tylko dwójki młodych w miocie. Co ważne, średnia wielkość powiększonych miotów w chwili oddzielenia od samicy była większa tylko o 0,9 młodego w porównaniu z oryginalną wielkością miotu odnotowaną w ciągu 2 dni po

narodzinach, i tylko średnio o jednego młodego większa niż w niemanipulowanych miotach w macierzystej hodowli (P. Koteja, dane niepubl.). Najwidoczniej samice nie były w stanie opiekować się dwoma dodatkowymi młodymi lub odmówiły opieki, co wskazuje, że osiągnęły one górną granicę wysiłku reprodukcyjnego (określoną przez ograniczenia fizjologiczne lub mechanizmy optymalizacji historii życia).

Na wysoki poziom wydatkowania energii samic o powiększonych miotach wskazuje wysoka masa wątroby, nerek i jelita – narządów aktywnych metabolicznie odpowiedzialnych za przetwarzanie pokarmu i pochodnych produktów metabolizmu. Masa nerek i jelita, korygowana o masę ciała, była istotnie większa u osobników rozmnażających się w stosunku do nie rozmnażających (Tabela 4.3). W przypadku wątroby porównania te były skomplikowane z powodu różnego nachylenia prostych regresji w ANCOVA, ale masa wątroby korygowana o masę ciała była istotnie większa w grupie z powiększonymi miotami niż w grupie z miotami zmniejszonymi (Tabela 4.3). W literaturze bardzo dobrze udokumentowany jest fakt, że wzrost masy tych narządów powoduje wzrost spoczynkowego tempa metabolizmu mierzonego w temperaturach termoneutralnych (Konarzewski i Diamond, 1995; Speakman i McQueenie, 1996; Książek et al., 2004) i musiał on też spowodować wzrost tempa metabolizmu u moich nornic karmiących powiększone mioty.

Jak wspomniano w dyskusji poprzedniego rozdziału (Rozdział 3.4), wysokie tempo przetwarzania energii u samic w czasie laktacji jest powiązane ze zwiększonym tempem metabolizmu spoczynkowego (RMR_t), co stwierdzono także w macierzystej kolonii hodowlanej, z której pochodziły nornice do niniejszego eksperymentu. Korygowany o masę ciała RMR_t samic z tej kolonii był w szczycie laktacji o 30% wyższy niż u samic nie rozmnażających się (A. Ryś i P. Koteja, dane niepubl.). W obecnym eksperymencie, w czasie pierwszych trzech laktacji, wartości ta mogła być jeszcze bardziej podwyższona, ponieważ większość samic była jednocześnie w ciąży. Dla porównania, RMR_t gryzoni: szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*), nowika (*Neotoma floridana*) i bawelniaka (*Sigmodon hispidus*) był o 11– 26% wyższy w przypadku jednoczesnej laktacji i ciąży niż w samej laktacji (Oswald i McClure, 1987; Oswald i McClure, 1990) (choć taki wzrost nie był odnotowany w przypadku myszy laboratoryjnej; Johnson et al., 2001). W moim eksperymencie proporcja samic będących jednocześnie w ciąży i w trakcie laktacji nie różniła się pomiędzy samicami z grupy o

zwiększonych i zmniejszonych miotach, ale samice z tej pierwszej grupy miały dłuższe odstępy pomiędzy urodzeniami kolejnych miotów. Mogło to do pewnego stopnia kompensować zwiększony wysiłek metaboliczny związany z jednoczesną ciążą. Z drugiej jednak strony, wydłużone odstępy pomiędzy kolejnymi urodzeniami wskazywały, że samice wychowujące powiększone mioty musiały poświęcić tempo rozwoju kolejnego miotu na rzecz skutecznego wykarmienia miotu bieżącego, co dostarcza silnego argumentu, że samice te były zmuszone do osiągnięcia maksymalnego poziomu zaopatrywania w energię.

W omawianym eksperymencie samice wykarmiły cztery kolejne mioty. W ten sposób samice z grupy o powiększonych miotach były zmuszone do przemiany energii zbliżonej do ich maksymalnych możliwości w czasie odpowiadającym często całkowitej długości życia dorosłych osobników w warunkach naturalnych. Z tego też względu eksperyment ten przedstawia odpowiedni model do testowania hipotezy, że uszkodzenia oksydacyjne lipidów i białek stanowią koszt utrzymywania wysokiego tempa metabolizmu, a więc są też prawdopodobnym biochemicznym mechanizmem leżącym u podstaw fundamentalnego kompromisu ewolucyjnego pomiędzy bieżącym wysiłkiem reprodukcyjnym a przeżywalnością i sukcesem reprodukcyjnym w przyszłości. Jednak w przeciwieństwie do przewidywań „hipotezy stresu oksydacyjnego”, uszkodzenia oksydacyjne lipidów i białek w wątrobie (w obu badanych pokoleniach) oraz białek w sercu (tylko w jednym pokoleniu) były istotnie niższe u samic karmiących powiększone mioty, niż u samic nie rozmnażających się (Tabela 4.4, Ryc. 4.2, 4.3). Poziom uszkodzeń lipidów w sercu oraz lipidów i białek w nerkach i mięśniach szkieletowych nie różnił się pomiędzy grupami reprodukcyjnymi (Tabela 4.4, Ryc. 4.2, 4.3), co także nie jest zgodne z hipotezą. Markery uszkodzeń oksydacyjnych nie różniły się pomiędzy nornicami z linii selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu i linii nieselekcionowanych, co daje kolejny argument przeciwko hipotezie stresu oksydacyjnego.

Wyniki z niniejszego eksperymentu, który spowodował zarówno zwiększone, jak i wydłużone w czasie obciążenie energetycznego rozmnażających się samic, są jakościowo podobne do innych eksperymentów z manipulowaną liczbą młodych w miocie. U pochodzących ze środowiska naturalnego myszy domowych, uszkodzenia białek w sercu i mięśniach szkieletowych nie różniły się pomiędzy samicami nie rozmnażającymi się a samicami z powiększonymi lub pomniejszonymi miotami,

natomiast w wątrobie, poziom uszkodzeń albo się nie różnił pomiędzy tymi grupami, albo był nawet niższy u samic z powiększonymi miotami (Aloise King et al., 2013; Garratt et al., 2013). Wyniki kilku innych badań przeprowadzonych na małych gryzoniach pochodzących ze środowiska naturalnego pokazują, że poziom uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie i innych narządach nie uległ zmianie lub zmniejszył się podczas opieki nad niemanipulowanymi miotami (Garratt, et al., 2011; Schmidt et al., 2014, mój pierwszy eksperyment). Co interesujące, zwiększony poziom uszkodzeń białek został stwierdzony w osoczu krwi u rozmnażających się samic, pomimo że w tych samych pracach nie wykazano zwiększonych uszkodzeń w narządach wewnętrznych (Yang et al., 2013; Plumel et al., 2014; Xu et al., 2014). Podobnie dwie inne prace, donoszące o wzroście uszkodzeń oksydacyjnych spowodowanych wysiłkiem reprodukcyjnym u małych ssaków badanych w warunkach naturalnych, przedstawiają oznaczenia uszkodzeń tylko w osoczu (Bergeron et al., 2011; Fletcher et al., 2013). Nie wiadomo jednak, czy uszkodzenia wykryte w osoczu są bardziej znaczące od tych stwierdzonych w narządach.

Najprostszym wytłumaczeniem braku wzrostu, czy nawet spadku uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach, spowodowanych reprodukcją, jest zwiększenie obrony antyoksydacyjnej. Rzeczywiście, aktywność katalazy była wyższa w nerkach samic o niższym poziomie uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w tym narządzie. Niemniej jednak, nie znalazłem istotnej korelacji pomiędzy poziomem markerów uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie a aktywnością katalazy, jak również i stężeniem glutationu (Tabela 4.5), jednego z najbardziej aktywnych antyoksydantów (Halliwell i Gutteridge, 1999). Wzrasta liczba dowodów na to, że zwiększenie produkcji antyoksydantów jest powiązane ze zmniejszeniem poziomu markerów stresu oksydacyjnego u ssaków podczas reprodukcji, aczkolwiek przykłady braku takiej zależności są również liczne (Garratt et al., 2011, 2013; Yang et al., 2013; Xu et al., 2014). Podobnie jak w poprzednim eksperymencie, tak i w niniejszym, istotną rolę zabezpieczającą przed stresem oksydacyjnym mogło odegrać u rozmnażających się nornic rudych pleiotropowe działanie hormonów płciowych. Estrogeny mają właściwości antyoksydacyjne i ochronne, jako że zwiększają ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych (Borrás et al., 2010). Zostało dowiedzione np., że estrogeny zmniejszają peroksydację lipidów w wątrobie oraz mięśniach sercowym i szkieletowych samic szczurów (Huh et al., 1994;

Persky et al., 2000), a więc w tych samych tkankach, które były badane u nornicy w tym i poprzednim eksperymencie.

Co zaskakujące, w przeciwieństwie do przewidywań, nie stwierdziłem także żadnych istotnych statystycznie różnic w uszkodzeniach oksydacyjnych lipidów i białek w badanych narządach i mięśniach pomiędzy samicami z linii selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu i linii nieselekcionowanych, ani u samic rozmnażających się, ani u nie rozmnażających. W niedawno opublikowanych badaniach Brzęka i współpracowników (Brzęk et al., 2014) statystycznie istotne różnice w uszkodzeniach oksydacyjnych lipidów zostały wykryte w wątrobie, nerkach i sercu pomiędzy myszami laboratoryjnymi selekcionowanymi na wysokie i niskie tempo metabolizmu podstawowego (BMR), zarówno u nie rozmnażających jak i rozmnażających się samic. Jednak kierunek zmian był odwrotny od przewidywanego i poziom uszkodzeń był wyższy u myszy cechujących się niskim BMR, co także jest sprzeczne z hipotezą stresu oksydacyjnego (Brzęk et al., 2014).

Podsumowując, moje wyniki: a) podważają prawdziwość hipotezy, że stres oksydacyjny jest kluczowym elementem mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie kompromisów w historii życia pomiędzy obecnymi inwestycjami energii w reprodukcję a przeżywalnością i przyszłym sukcesem reprodukcyjnym oraz b) dostarczają umiarkowanego wsparcia dla hipotezy, że niski poziom uszkodzeń oksydacyjnych tkanek u rozmnażających się osobników jest powiązany ze zwiększoną produkcją enzymów antyoksydacyjnych.

Można argumentować, że wysokie tempo metabolizmu, związane z wysiłkiem reprodukcyjnym, może stać się istotnym czynnikiem powodującym stres oksydacyjny (i związane z nim potencjalne konsekwencje w przyszłym życiu), jeśli budżet energetyczny rozmnażających się zwierząt zostanie dodatkowo obciążony innymi stresorami, takimi jak np. obroną przed patogenami lub pasożytami (Speakman i Garratt, 2014). Trudno się nie zgodzić, że taki scenariusz może mieć miejsce. Jednakże, taki argument sam w sobie podważa klasyczny paradygmat kompromisu „obecny wysiłek reprodukcyjny – sukces w przyszłości”, ze stresem oksydacyjnym jako mediatorem, gdyż zakłada, że kompromis musi w sobie zawierać inne, dodatkowe elementy, takie jak np., koszt działania systemu immunologicznego.

4.5. Tabele i ryciny

Tabela 4.1. Liczba samic nornicy rudej użyta w eksperymencie z manipulowaniem wielkością miotów, z podziałem na grupy selekcyjne (selekcja i kontrola), grupy eksperymentalne o różnym wysiłku reprodukcyjnym (nie rozmnażające się, o pomniejszonych miotach, o powiększonych miotach), w dwóch pokoleniach zwierząt.

Nr pokolenia (rok)	Selekcja			Kontrola			Suma
	Nie rozmnażane	Zmniejszone mioty	Powiększone mioty	Nie rozmnażane	Zmniejszone mioty	Powiększone mioty	
12 (2012)	15	18	18	15	15	11	92
14 (2013)	13	13	12	15	14	13	80
Suma	28	31	30	30	29	24	172

Tabela 4.2. Skorygowana masa ciała (g; 95% przedziały ufności w nawiasach) samic nornicy rudej z linii selekcionowanych na wysokie tempo metabolizmu i z linii kontrolnych, w trzech grupach reprodukcyjnych, otrzymana z modeli ANOVA (patrz „Analiza statystyczna”, Rozdział 4.2.2). Różne litery (a, b) pokazują istotne różnice statystyczne w masie ciała pomiędzy grupami reprodukcyjnymi (test Tukeya-Kramera, $P < 0,0001$).

Grupa selekcyjna	Grupa reprodukcyjna		
	Nie rozmnażające się	Zmniejszone mioty	Powiększone mioty
Selekcja	24,3 (22,0 - 26,5)	33,2 (30,9 - 35,4)	33,9 (31,7 - 36,2)
Kontrola	22,0 (19,7 - 24,2)	30,2 (27,9 - 32,4)	31,5 (29,1 - 33,9)
	a	b	b

Tabela 4.3. Skorygowane średnie masy narządów wewnętrznych samic normicy rudej (g; 95% przedziały ufności w nawiasach) otrzymane w analizie ANCOVA z grupą reprodukcyjną, grupą selekcyjną, linią selekcyjną zagnieżdżoną w grupie selekcyjnej i pokoleniem jako czynnikami oraz masą ciała samicy jako zmienną towarzyszącą (**A**), oraz poziom istotności czynników i zmiennej towarzyszącej w tym modelu (**B**). (**A**) oraz górna część (**B**) przedstawia wyniki dla wszystkich trzech grup reprodukcyjnych. Ponieważ interakcja pomiędzy grupą reprodukcyjną a masą ciała samic okazała się istotna w wątrobie i sercu, dolna część (**B**) dotyczy tych organów tylko u samic z grup o zmniejszonej i powiększonej liczbie młodych w miocie (założenie o homogenności nachyleń linii regresji było spełnione w tych modelach). Różne litery (a, b) w (**A**) pokazują istotne różnice statystyczne pomiędzy grupami reprodukcyjnymi (test Tukeya-Kramera, $P < 0,05$). Statystycznie istotne poziomy istotności w (**B**) zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

A

Narząd ^a	Grupa selekcyjna	Grupa reprodukcyjna		
		Nie rozmnażające się	Zmniejszone mioty	Powiększone mioty
Wątroba	Selekcja	1,52 (1,42 - 1,64)	1,57 (1,46 - 1,69)	1,75 (1,63 - 1,88)
	Kontrola	1,41 (1,30 - 1,52)	1,46 (1,36 - 1,56)	1,66 (1,55 - 1,79)
		a	a	b
Nerki	Selekcja	0,360 (0,339 - 0,382)	0,373 (0,352 - 0,395)	0,381 (0,359 - 0,404)
	Kontrola	0,323 (0,303 - 0,345)	0,329 (0,311 - 0,348)	0,376 (0,354 - 0,399)
		a	a	b
Serce	Selekcja	0,166 (0,156 - 0,178)	0,171 (0,160 - 0,182)	0,167 (0,157 - 0,179)
	Kontrola	0,141 (0,131 - 0,151)	0,144 (0,135 - 0,153)	0,152 (0,142 - 0,162)
		a	a	a
Jelito	Selekcja	0,322 (0,302 - 0,344)	0,354 (0,333 - 0,378)	0,382 (0,358 - 0,408)
	Kontrola	0,318 (0,296 - 0,342)	0,311 (0,292 - 0,330)	0,374 (0,350 - 0,401)
		a	a	b

B

	Narząd	Grupa reprodukcyjna	Selekcja	Pokolenie	Grupa reprodu. × Selekcja	Masa ciała
1)	Wątroba	$F_{2,12} = 13,09$ $P = \mathbf{0,001}$	$F_{1,6} = 4,25$ $P = 0,085$	$F_{1,7} = 5,03$ $P = 0,060$	$F_{2,12} = 0,19$ $P = 0,831$	$F_{1,138} = 230,26$ $P < \mathbf{0,0001}$
	Nerki	$F_{2,12} = 8,18$ $P = \mathbf{0,006}$	$F_{1,6} = 9,72$ $P = \mathbf{0,021}$	$F_{1,7} = 0,00$ $P = 0,962$	$F_{2,12} = 3,52$ $P = 0,063$	$F_{1,138} = 125,0$ $P < \mathbf{0,0001}$
	Serce	$F_{2,12} = 0,86$ $P = 0,447$	$F_{1,6} = 20,28$ $P = \mathbf{0,004}$	$F_{1,7} = 9,95$ $P = \mathbf{0,016}$	$F_{2,12} = 1,59$ $P = 0,243$	$F_{1,138} = 91,73$ $P < \mathbf{0,0001}$
	Jelita	$F_{2,12} = 14,70$ $P = \mathbf{0,001}$	$F_{1,6} = 4,99$ $P = 0,067$	$F_{1,7} = 4,51$ $P = 0,071$	$F_{2,12} = 3,04$ $P = 0,085$	$F_{1,138} = 85,26$ $P < \mathbf{0,0001}$
2)	Wątroba	$F_{1,6} = 21,81$ $P = \mathbf{0,003}$	$F_{1,6} = 3,70$ $P = 0,103$	$F_{1,7} = 2,41$ $P = 0,165$	$F_{1,6} = 0,38$ $P = 0,559$	$F_{1,88} = 82,26$ $P < \mathbf{0,0001}$
	Serce	$F_{1,6} = 1,62$ $P = 0,251$	$F_{1,6} = 23,51$ $P = \mathbf{0,003}$	$F_{1,7} = 5,97$ $P = \mathbf{0,045}$	$F_{1,6} = 3,77$ $P = 0,100$	$F_{1,88} = 25,29$ $P < \mathbf{0,0001}$

^a Mokra masa wątroby, nerek i serca, sucha masa jelita.

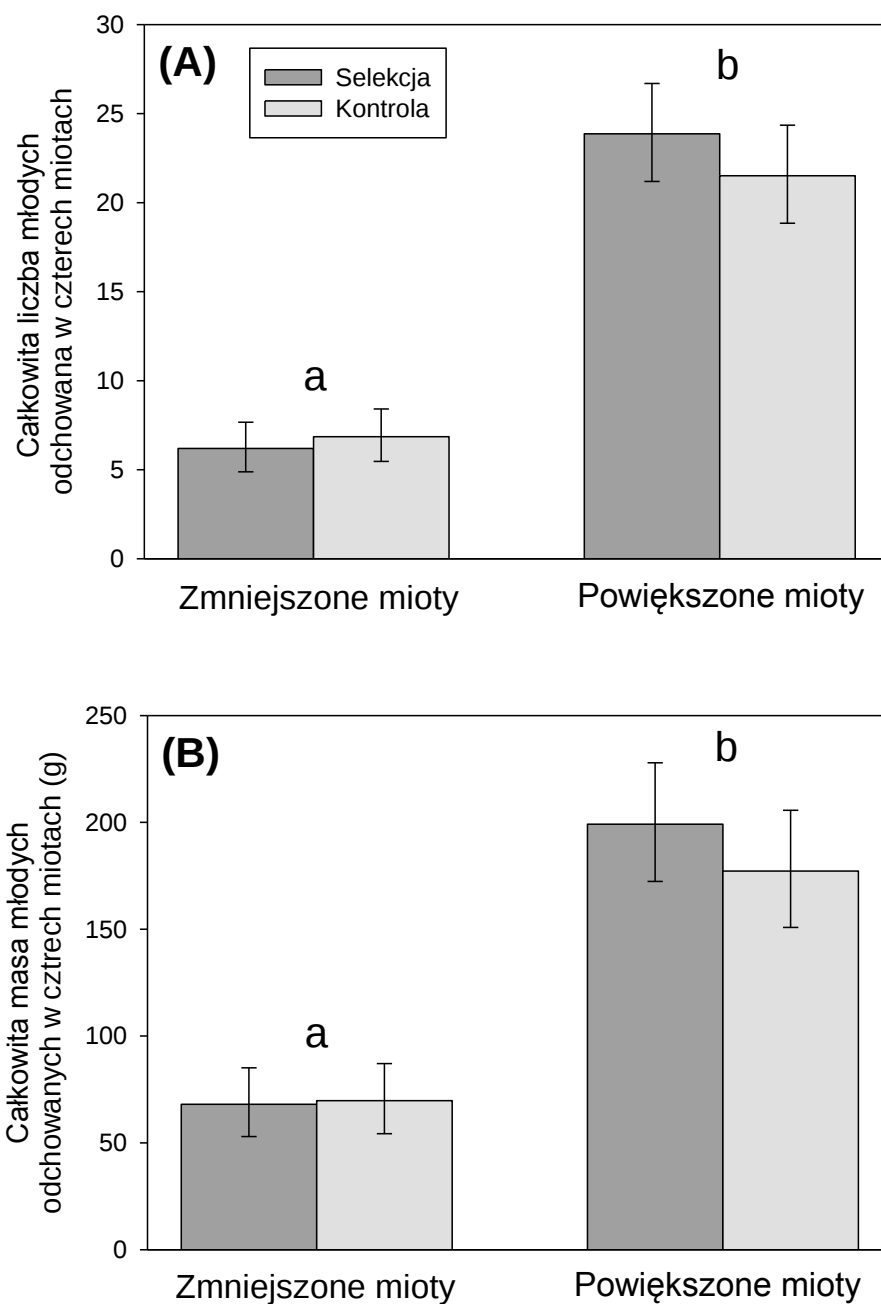
Tabela 4.4. Wyniki modelu ANOVA dla stężeń TBARS i grup karbonylowych w wątrobie, nerkach, sercu i mięśniach. Wartości *P* dla statystycznie istotnych efektów zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

		Grupa reprodukcyjna	Selekcja	Pokolenie	Grupa reprodu. × Selekcja
TBARS	Wątroba	$F_{2,12} = 5,25$ $P = \mathbf{0,023}$	$F_{1,6} = 0,27$ $P = 0,622$	$F_{1,7} = 106,6$ $P < \mathbf{0,0001}$	$F_{2,12} = 0,59$ $P = 0,567$
	Nerki	$F_{2,12} = 3,29$ $P = 0,072$	$F_{1,6} = 0,45$ $P = 0,526$	$F_{1,7} = 30,52$ $P = \mathbf{0,001}$	$F_{2,12} = 1,38$ $P = 0,289$
	Serce	$F_{2,12} = 0,60$ $P = 0,564$	$F_{1,6} = 0,36$ $P = 0,573$	$F_{1,7} = 17,14$ $P = \mathbf{0,004}$	$F_{2,12} = 1,73$ $P = 0,219$
	Mięśnie	$F_{2,12} = 0,66$ $P = 0,535$	$F_{1,6} = 0,08$ $P = 0,785$	$F_{1,7} = 2,34$ $P = 0,170$	$F_{2,12} = 0,53$ $P = 0,600$
Grupy karbonylowe	Wątroba	$F_{2,12} = 5,09$ $P = \mathbf{0,025}$	$F_{1,6} = 1,77$ $P = 0,231$	$F_{1,7} = 15,90$ $P = \mathbf{0,005}$	$F_{2,12} = 1,16$ $P = 0,345$
	Nerki	$F_{2,12} = 0,09$ $P = 0,912$	$F_{1,6} = 0,24$ $P = 0,643$	$F_{1,7} = 69,68$ $P < \mathbf{0,0001}$	$F_{2,12} = 1,12$ $P = 0,357$
	Serce ^a	$F_{2,12} = 7,62$ $P = \mathbf{0,007}$	$F_{1,6} = 1,87$ $P = 0,221$	$F_{1,7} = 2,41$ $P = 0,165$	$F_{2,12} = 1,49$ $P = 0,263$
	Mięśnie	$F_{2,12} = 2,48$ $P = 0,126$	$F_{1,6} = 0,13$ $P = 0,729$	$F_{1,7} = 5,36$ $P = \mathbf{0,005}$	$F_{2,12} = 0,32$ $P = 0,729$

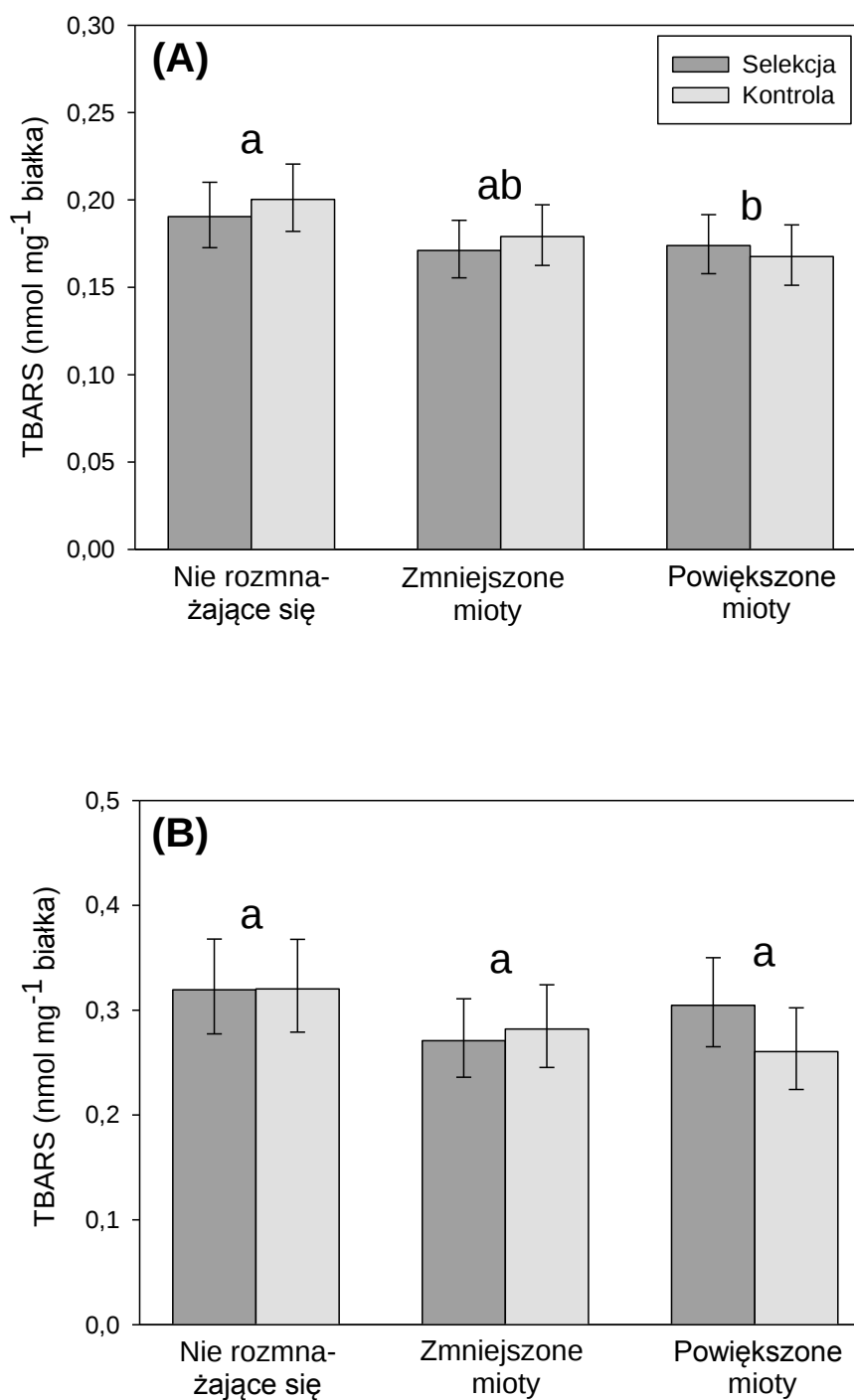
^a Interakcja pomiędzy grupą reprodukcyjną a pokoleniem była istotna ($F_{2,132} = 5,59$; $P = 0,005$) i dlatego pozostała w modelu ANOVA.

Tabela 4.5. Zależność pomiędzy stężeniem TBARS, markera uszkodzeń lipidów, i grup karbonylowych, markera uszkodzeń białek, a poziomem antyoksydantów: stężeniem całkowitego glutationu (GSH) i aktywnością katalazy. Wyniki otrzymane z modelu ANCOVA ze stężeniem danego antyoksydantu jako zmienną towarzyszącą. Wartości *P* dla statystycznie istotnych efektów zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

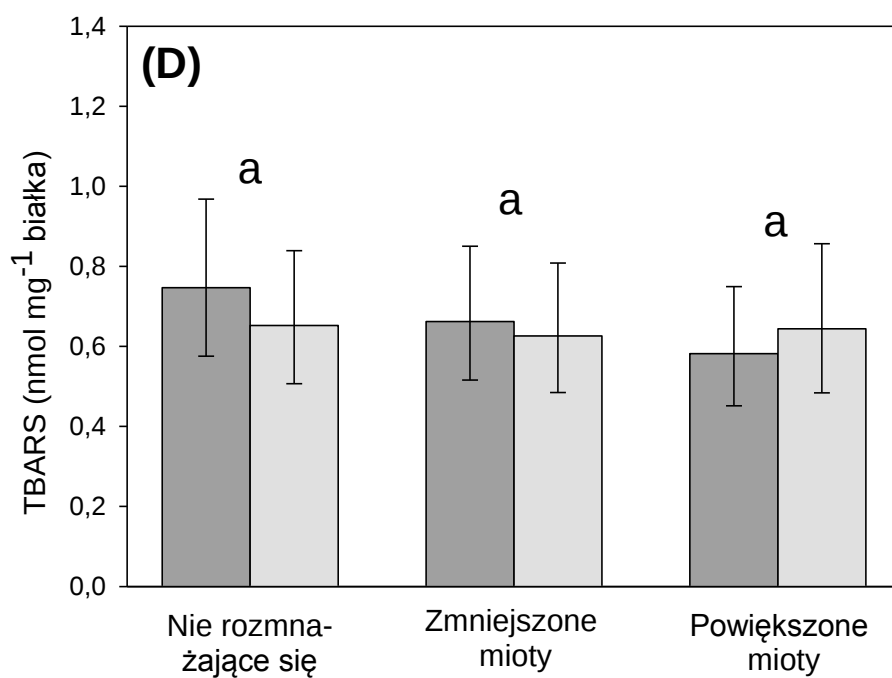
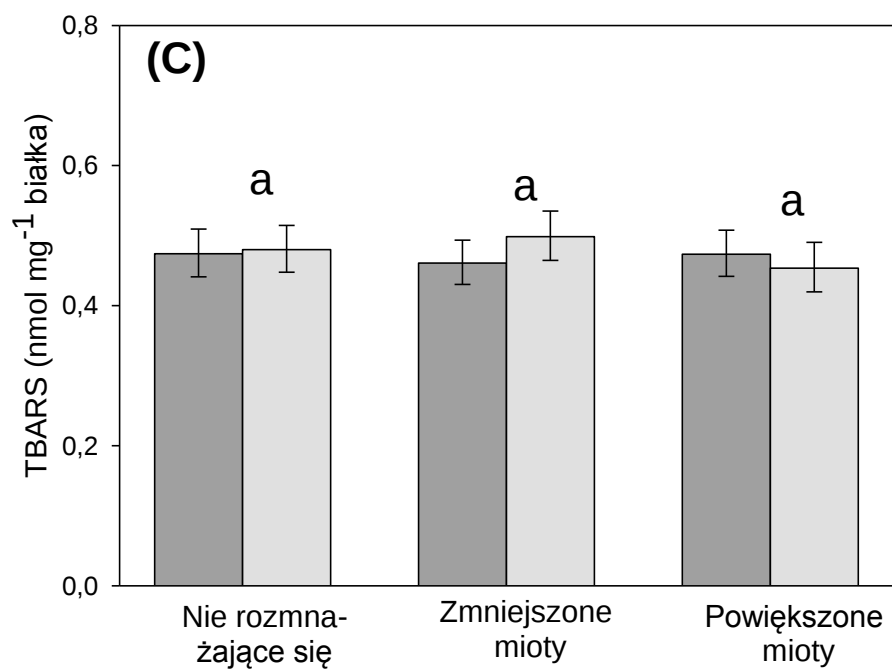
Narząd	Marker	Antyoksy- dant	Antyoksydant	Grupa reprodukcyjna	Selekcja	Pokolenie	Grupa reprodu. × Selekcja
Wątroba	TBARS	GSH	$F_{1,139} = 0,04$ $P = 0,838$	$F_{2,12} = 5,29$ $P = \mathbf{0,023}$	$F_{1,6} = 0,27$ $P = 0,625$	$F_{1,7} = 75,24$ $P < \mathbf{0,0001}$	$F_{2,12} = 0,58$ $P = 0,577$
		Katalaza	$F_{1,139} = 0,00$ $P = 0,977$	$F_{2,12} = 5,17$ $P = \mathbf{0,024}$	$F_{1,6} = 0,27$ $P = 0,622$	$F_{1,7} = 106,3$ $P < \mathbf{0,0001}$	$F_{2,12} = 0,59$ $P = 0,569$
	Grupy karbonylowe	GSH	$F_{1,139} = 2,89$ $P = 0,091$	$F_{2,12} = 5,81$ $P = \mathbf{0,017}$	$F_{1,6} = 1,99$ $P = 0,208$	$F_{1,7} = 6,96$ $P = \mathbf{0,034}$	$F_{2,12} = 0,95$ $P = 0,415$
		Katalaza	$F_{1,139} = 0,28$ $P = 0,599$	$F_{2,12} = 5,20$ $P = \mathbf{0,024}$	$F_{1,6} = 1,69$ $P = 0,241$	$F_{1,7} = 15,64$ $P = \mathbf{0,006}$	$F_{2,12} = 1,23$ $P = 0,326$
Nerki	TBARS	Katalaza	$F_{1,136} = 5,01$ $P = \mathbf{0,027}$	$F_{2,12} = 3,77$ $P = 0,054$	$F_{1,6} = 0,36$ $P = 0,571$	$F_{1,7} = 24,90$ $P = \mathbf{0,002}$	$F_{2,12} = 1,79$ $P = 0,209$
	Grupy karbonylowe	Katalaza	$F_{1,136} = 4,13$ $P = \mathbf{0,044}$	$F_{2,12} = 0,45$ $P = 0,646$	$F_{1,6} = 0,18$ $P = 0,688$	$F_{1,7} = 63,62$ $P < \mathbf{0,0001}$	$F_{2,12} = 1,42$ $P = 0,279$



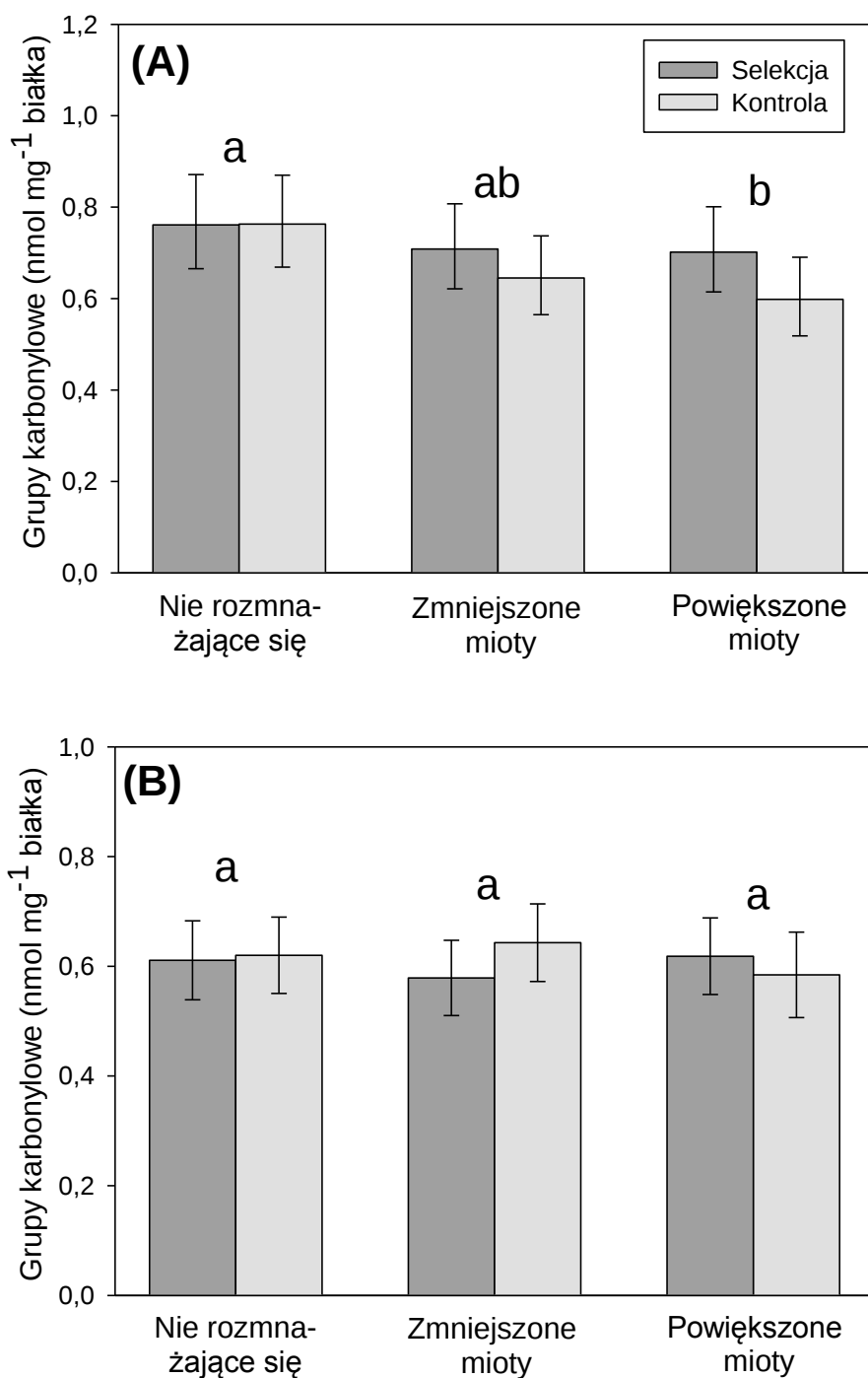
Ryc. 4.1. Korygowane średnie (i 95% przedziały ufności) całkowitej liczby (A) i masy (B) młodych wychowanych w czterech kolejnych miotach przez samice z grup o pomniejszonej i powiększonej liczbie młodych w każdym z miotów. Różne litery nad słupkami pokazują istotne statystycznie różnice pomiędzy samicami o zmniejszonych i powiększonych miotach.



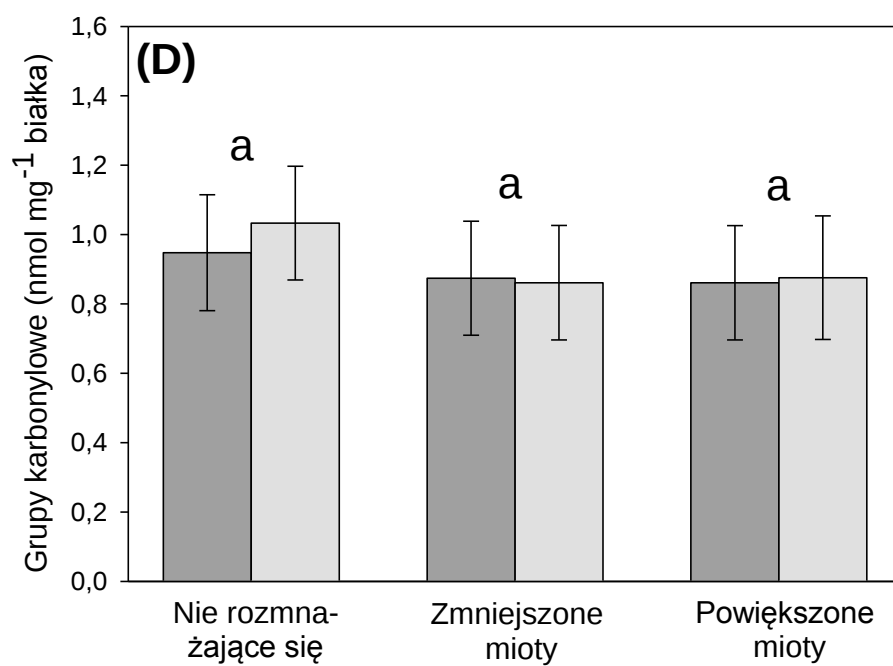
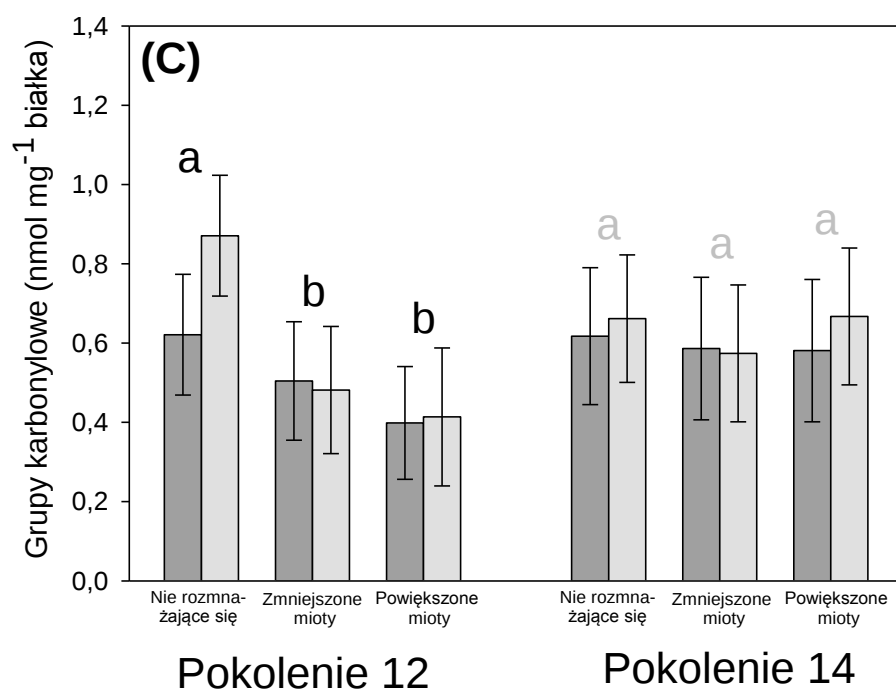
Ryc. 4.2 (część 1/2). Korygowane średnie (i 95% przedziały ufności) stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), markera uszkodzeń lipidów, w tkankach nornic z trzech grup reprodukcyjnych. (A) wątroba, (B) nerki, (C) serce, (D) mięśnie szkieletowe. Różne litery nad słupkami pokazują istotne statystycznie różnice pomiędzy samicami z grup o różnym wysiłku reprodukcyjnym (test Tukeya-Kramera po ANOVA; $P < 0,05$).



Ryc. 4.2 (część 2/2).



Ryc. 4.3 (część 1/2). Korygowane średnie (i 95% przedziały ufności) stężenia grup karbonylowych, markera uszkodzeń białek w tkankach nornic z trzech grup reprodukcyjnych. (A) wątroba, (B) nerki, (C) serce, (D) mięśnie szkieletowe. Stężenie grup karbonylowych w sercu (C) pokazano oddzielnie dla dwóch pokoleń z uwagi na istotną interakcję między pokoleniem a grupą reprodukcyjną. Inne oznaczenia jak na Ryc. 4.2.



Ryc. 4.3 (część 2/2).

5. Wpływ rozmnażania na poziom stresu oksydacyjnego u dziko żyjących nornic rudych z różnych kohort

5.1. Wstęp, cele, hipotezy

W poprzednich rozdziałach pisałem, że dotychczasowe badania nad wpływem wysiłku reprodukcyjnego na poziom stresu oksydacyjnego dały bardzo różne, często sprzeczne wyniki (Alonso-Alvarez et al., 2004; Bergeron et al., 2011; Garratt et al., 2011; Aloise King et al. 2013; Fletcher et al., 2013; Garratt et al., 2013; Costantini et al., 2014; Xu et al. 2014). Większość tych badań, jak również moje powyżej opisane, prowadzona była w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych eksperymentów. Z drugiej strony, możliwość badania zwierząt w ich naturalnym środowisku, nawet pomimo braku możliwości kontrolowania takich czynników jak dieta, temperatura, czy wreszcie sam wysiłek reprodukcyjny, daje nam odpowiedzi o realnych kosztach życia w ich środowisku życia. Optymalnym rozwiązaniem jest oczywiście połączenie obu podejść do badań naukowych, co jest często konieczne, aby wszechstronnie zbadać dany problem biologiczny i co zwiększa możliwość znalezienia odpowiedzi na postawione wcześniej pytania. Dotychczasowe badania nad stresem oksydacyjnym i jego rolą w okresie reprodukcji w warunkach naturalnych są nieliczne, co szczególnie dotyczy dzikich populacji ssaków. Znane mi są cztery takie prace. W pierwszej z nich autorzy nie stwierdzili wyraźnych zależności pomiędzy poziomem uszkodzeń oksydacyjnych a wysiłkiem reprodukcyjnym dzikich owiec rasy Soay (Nussey et al., 2009). Zarówno w przypadku pręgowca amerykańskiego, jak i amerykańskiej wiewiórki czerwonej, badacze zaobserwowali wzrost poziomu stresu oksydacyjnego wraz ze wzrostem wysiłku reprodukcyjnego (Bergeron et al., 2011; Fletcher et al., 2013). Wzrost poziomu stresu oksydacyjnego został zaobserwowany także u rozmnażających się północnych słoni morskich, które w odróżnieniu do poprzednich trzech gatunków, w czasie całego okresu reprodukcyjnego nie pobierają pokarmu i polegają wyłącznie na wcześniej zgromadzonych zapasach tłuszczu (Sharick et al., 2015).

Moje dwa poprzednie eksperymenty wykazały, że zwiększony wysiłek reprodukcyjny nie powoduje wzrostu poziomu uszkodzeń oksydacyjnych u nornicy rudej, tak więc mechanizm powstawania kosztów reprodukcyjnych (tj. obniżony sukces

reprodukcyjny w dalszym życiu i obniżona przeżywalność) jest raczej inny. Aby ostatecznie zweryfikować główną hipotezę mojej rozprawy doktorskiej, postanowiłem przeprowadzić badania na wolno żyjącej populacji nornicy rudej. Oznaczyłem poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek oraz poziom obrony antyoksydacyjnej (katalazy i całkowitego glutationu) w narządach samic nornic rudych, odłowionych w ich naturalnym środowisku przed i po okresie reprodukcji. Aby pomiary te można było porównać z otrzymanymi wcześniej z laboratorium, użyłem dokładnie tych samych metod badawczych i markerów stresu oksydacyjnego, a oznaczenia przeprowadziłem w tych samych narządach.

Badane samice należały do dwóch pokoleń, wiosennego i jesienno. Pokolenia te różnią się tempem wzrostu i okresem przystąpienia do reprodukcji (Schwarz et al., 1964; Zejda, 1971). Nornice urodzone wiosną i wczesnym latem (pokolenie wiosenne, zwykle dwie kohorty młodych) szybko rosną, dojrzewają i rozmnażają się jeszcze w tym samym roku (Ryc. 5.1). Większość z nich nie dożywa do kolejnego sezonu rozrodczego. Nornice urodzone późnym latem i jesienią (pokolenie jesienne) rosną wolniej i rozmnażają się po przezimowaniu, poczynając od wczesnej wiosny. Porównanie dwóch pokoleń nornic daje dodatkową okazję do przetestowania potencjalnego znaczenia stresu oksydacyjnego w życiu gryzoni. Można przewidywać, że szybki wzrost samic pokolenia wiosennego przed przystąpieniem do rozrodu (Schwarz et al., 1964; Zejda, 1971), wiążący się nieuchronnie ze wzrostem tempa metabolizmu, może prowadzić do stresu oksydacyjnego (Monaghan et al. 2009; Nussey et al., 2009; Hall et al. 2010). Ponadto, nornice z pokolenia jesienno kończą sezon rozrodczy w wieku około 9 miesięcy życia, podczas gdy osobniki pokolenia wiosennego – gdy są około dwa razy młodsze. Stosunkowo dobrze udokumentowana jest rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia – wraz z wiekiem akumulują się w organizmie uszkodzenia oksydacyjne, które z czasem mogą prowadzić do śmierci osobnika (Fukagawa, 1999; Kirkwood i Austad, 2000; Muller et al., 2007; Speakman i Selman, 2011; Barja, 2013). Można więc przewidywać, że samice z pokolenia jesienno, starsze, będą się charakteryzować wyższym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych.

W badaniach nad uszkodzeniami oksydacyjnymi u nornic odławianych w ich naturalnym środowisku, testowałem cztery hipotezy, uwzględniające przynależność samic do pokolenia wiosennego i jesienno:

1. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych u samic z danego pokolenia jest wyższy po reprodukcji niż u samic przed reprodukcją.
2. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych u samic z pokolenia wiosennego przed reprodukcją jest wyższy niż u samic z generacji jesiennej przed reprodukcją (efekt tempa wzrostu tych pierwszych).
3. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych u samic z pokolenia jesiennego jest wyższy u osobników po reprodukcji niż u samic po reprodukcji, ale z pokolenia wiosennego (efekt starzenia się i starszego wieku tych pierwszych).
4. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych jest odwrotnie proporcjonalny do poziomu obrony antyoksydacyjnej (stężenia i aktywności antyoksydantów) we wszystkich badanych grupach.

5.2. Materiały i metody

5.2.3. Schemat badań

Samice nornicy rudej odłowiono w Puszczy Knyszyńskiej, w pobliżu miejscowości Czarna Białostocka (płn.-wsch. Polska) w latach 2012 (październik) i 2013 (przełom kwietnia i maja oraz przełom czerwca i lipca). Do odłowu zostały użyte drewniane pułapki żywołowne typu „dziekanówka” sprawdzane co dwie godziny, w celu zminimalizowania stresu spowodowanego uwięzieniem. Bezpośrednio po odłowieniu samice były ważone i po wizualnym sprawdzeniu, czy nie są w zaawansowanej ciąży, trafiały do terenowego laboratorium. Samce nornic, oraz przedstawiciele innych gatunków zostały wypuszczone w miejscu złowienia. W laboratorium samice zostały zważone z dokładnością do 0,1 g, wątroba, nerki, serce (po usunięciu krwi) i mięśnie szkieletowe uda zostały wypreparowane, zważone z dokładnością do 0,001 g i zamrożone w ciekłym azocie. Zamrożone próbki, zostały następnie przewiezione do Instytutu Biologii i przeniesione do zamrażarki, gdzie w temperaturze -80°C czekały na analizy uszkodzeń oksydacyjnych i poziomu antyoksydantów. Wszystkie odłowione samice (43 osobniki) z trzech terminów odłowów (jesień, wiosna, lato) podzieliłem na pięć grup różniących się wiekiem oraz statusem reprodukcyjnym. Dokładny opis tych grup przedstawia Tabela 5.1 (patrz też Ryc. 5.1.)

Status reprodukcyjny samic (przed reprodukcją, po reprodukcji) określiłem na podstawie obecności lub braku blizn po łożyskach w macicy (Bray et al., 2003; Nyholm i Meurling, 1979). Klasy wiekowe zostały określone w oparciu o pomiar długości korzenia zębowego pierwszego dolnego trzonowca (Wasilewski, 1952; Tupikova et al., 1968), przy czym masa ciała i okresu odłowu były dodatkową informacją. Zęby zostały delikatnie usunięte z żuchwy za pomocą roztworu papainy (Searle, 1954; Pankakoski i Hanski, 1989) i zmierzone z dokładnością do 0,1 mm pod binokulem z podziałką metryczną.

Oznaczenia stężenia TBARS i grup karbonylowych wykonałem we wszystkich zebranych tkankach: wątrobie, nerkach, sercu i mięśniach szkieletowych. Z uwagi na niewielkie rozmiary narządów i mięśni, oznaczenia całkowitego glutationu wykonałem tylko w wątrobie, a aktywności katalazy w wątrobie i nerkach. Powtarzalność analiz uszkodzeń przekraczała, zwykle znacznie, wartość 0,90.

5.2.2. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadziłem w programie SAS 9.3. Różnice w poziomie uszkodzeń oksydacyjnych i w obronie antyoksydacyjnej (poziomie katalazy i glutationu) między pięcioma grupami wiekowo-reprodukcyjnymi były testowane przy pomocy jednoczynnikowej ANOVA. Aby sprawdzić statystyczną istotność różnic pomiędzy wyznaczonymi grupami użyłem analizy zaplanowanych kontrastów. Dla testowania korelacji pomiędzy uszkodzeniami oksydacyjnymi lipidów i białek a poziomem obrony antyoksydacyjnej został obliczony współczynnik korelacji Pearsona. Wartości średnie podano z ich błędem standardowym (SE).

5.3. Wyniki

W obrębie pięciu grup nornic, które odłowilem, testowałem istotność różnic w następujących, z góry zaplanowanych porównaniach par:

- (i) osobniki przed reprodukcją i osobniki po reprodukcji (W-PR i W-R, J-PR i JP-R, JP-PR i JP-R) (symbole grup podane są w Tabeli 5.1);
- (ii) pokolenie wiosenne i pokolenie jesienne przed reprodukcją (W-PR i J-PR);
- (iii) pokolenie wiosenne i pokolenie jesienne po reprodukcji (W-R i JP-R).

Analiza wariancji wykazała istotne statystycznie różnice w masie ciała samic pomiędzy grupami ($F_{4,38} = 33,6$; $P < 0,0001$) (Ryc. 5.2). Samice po reprodukcji były cięższe od samic przed reprodukcją, natomiast osobniki przed reprodukcją z różnych pokoleń nie różniły się statystycznie między sobą (Ryc. 5.2). Wyniki modelu ANOVA dla porównań poszczególnych markerów uszkodzeń oksydacyjnych i antyoksydantów w badanych narządach przedstawia Tabela 5.2. Poniżej natomiast podane są wyniki porównań dla par.

Samice przed reprodukcją a samice po reprodukcji

Poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów w wątrobie u samic z pokolenia wiosennego był po reprodukcji wyższy niż u samic z tego samego pokolenia przed reprodukcją (Ryc. 5.3 A). Podobną sytuację, tylko że w poziomie uszkodzeń białek w wątrobie odnotowałem w pokoleniu jesiennym (Ryc. 5.4 A). Natomiast kierunek zmian w poziomie uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek w nerkach, sercu, mięśniach szkieletowych oraz częściowo w wątrobie miał odmienny przebieg w czasie. Samice po okresie reprodukcji miały istotnie statystycznie niższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych od samic przed reprodukcją, lub się od nich nie różniły (Ryc. 5.3 i 5.4).

Poziom całkowitego glutationu w wątrobie był wyższy u osobników z pokolenia jesiennego po reprodukcji (JP-R) w stosunku do osobników z tego pokolenia przed rozmnażaniem (J-PR i JP-PR) (Ryc. 5.5). W przypadku pozostałych par, różnice pomiędzy nimi nie były istotne statystycznie. Poziom aktywności katalazy, zarówno w wątrobie, jak i w nerkach, nie różnił się statystycznie pomiędzy żadnymi parami przed reprodukcją i po reprodukcji.

Samice przed reprodukcją, pokolenie wiosenne a pokolenie jesienne

Samice pokolenia wiosennego przed reprodukcją miały istotnie niższy poziom uszkodzeń lipidów w wątrobie i wyższy poziom uszkodzeń białek w mięśniach szkieletowych w stosunku do samic z pokolenia jesiennego przed reprodukcją (Ryc. 5.3

A i 5.4 D). W pozostałych narządach i markerach stresu oksydacyjnego różnice pomiędzy tymi grupami były nieistotne statystycznie (Ryc. 5.3 – 5.5).

Samice po reprodukcji, pokolenie wiosenne a pokolenie jesienne

Przezimki z generacji jesiennej po reprodukcji (JP-R) miały istotnie niższy poziom TBARS w wątrobie i grup karbonylowych w nerkach w stosunku do samic po reprodukcji z pokolenia wiosennego (Ryc. 5.3 A i 5.4 B). Poziom ich grup karbonylowych w mięśniach szkieletowych był jednak wyższy (Ryc. 5.4 D). Miały one także istotne, statystycznie wyższe stężenie całkowitego glutationu w wątrobie (Ryc. 5.5). W pozostałych narządach i markerach stresu oksydacyjnego różnice pomiędzy tymi grupami nie były istotne statystycznie (Ryc. 5.3 – 5.5).

Uszkodzenia oksydacyjne a obrona antyoksydacyjna

W wątrobie i nerkach sprawdziłem, czy poziom uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek zależy od poziomu obrony antyoksydacyjnej. Istotną statystycznie dodatnią korelację otrzymałem tylko pomiędzy stężeniem markera uszkodzeń białek i stężeniem glutationu w wątrobie. Pozostałe współczynniki korelacji były nieistotne (Tabela 5.3).

5.4. Dyskusja

Samice przed reprodukcją a samice po reprodukcji

Hipoteza dotycząca roli stresu oksydacyjnego podczas reprodukcji głosi, że osobniki o wyższym wysiłku reprodukcyjnym, w związku z podwyższonym tempem metabolizmu, powinny posiadać wyższy poziom stresu oksydacyjnego w porównaniu do osobników nie rozmnażających się (Halliwell i Gutteridge, 1999; Metcalfe i Monaghan, 2013; Speakman i Garratt, 2014). Z kolei hipoteza dotycząca starzenia się, również upatruje mechanizm tego procesu w stresie oksydacyjnym (Kirkwood i Austad, 2000; Barja, 2013). Tak więc, w przypadku porównywania osobników sprzed reprodukcji i po niej, mamy do czynienia z dwoma procesami sprzyjającymi powstawaniu uszkodzeń oksydacyjnych w organizmie (różnica czasowa między odłowami przed i po sezonie rozrodu wynosiła powyżej 5 miesięcy). Uzyskane przeze mnie wyniki nie potwierdzają

jednak tych hipotez. U nornic odłowionych w terenie, zarówno u osobników z generacji wiosennej jak i jesiennej, reprodukcja zwykle nie wpływała na poziom stresu oksydacyjnego, a dla sześciu kombinacji markerów i narządów, poziom ten był niższy u osobników po reprodukcji. Tylko w dwóch przypadkach (poziom uszkodzeń lipidów w wątrobie w generacji wiosennej i białek w wątrobie w generacji jesiennej), osobniki po reprodukcji miały wyższy poziom uszkodzeń oksydacyjnych.

Wyniki te są ogólnie spójne z rezultatami moich dwóch wyżej opisanych eksperymentów, gdzie również osobniki o różnym wysiłku reprodukcyjnym nie różniły się pod względem uszkodzeń oksydacyjnych od osobników nie rozmnażających się, lub poziom uszkodzeń był u nich niższy. Moje wyniki stoją natomiast w sprzeczności z nielicznymi pracami dotyczącymi stresu oksydacyjnego wolno żyjących ssaków (Bergeron et al., 2011; Fletcher et al., 2013; Sharick et al., 2015). We wszystkich tych badaniach osobniki rozmnażające się miały podwyższony poziom stresu oksydacyjnego w stosunku do osobników nie rozmnażających się, przy czym u wiewiórek, po wyłożeniu w miejscu ich pobytu karmy z dodatkiem antyoksydantów, poziom uszkodzeń oksydacyjnych zmniejszył się (Fletcher et al., 2013). W częściowej zgodzie z moimi wynikami są badania nad populacją dziko żyjących owiec rasy Soay (Nussey et al., 2009). Rozmnażające się owce nie różniły się pod kątem uszkodzeń oksydacyjnych lipidów od osobników przed reprodukcją. Jednak samice, które w poprzednim roku urodziły i wychowały dwójkę młodych, charakteryzowały się niższym poziomem uszkodzeń lipidów w porównaniu z samicami z tylko jednym młodym lub bez żadnego potomstwa. Wszystkie oznaczenia uszkodzeń oksydacyjnych w tych pracach, w przeciwieństwie do moich badań, były przeprowadzone w osoczu. Jak wspomniałem w dyskusji poprzedniego rozdziału, badania przeprowadzone na tych samych osobnikach, zarówno w osoczu, jak i w narządach wewnętrznych, dawały odmienne wyniki (Yang et al., 2013; Garratt et al., 2014; Xu et al., 2014). Nie jest wiadomo, które uszkodzenia, we krwi, czy w narządach, mogą mieć większe znaczenie dla sukcesu reprodukcyjnego i przeżywalności.

Samice przed reprodukcją: pokolenie wiosenne a pokolenie jesienne

Obie grupy samic przed reprodukcją miały bardzo podobną masę ciała (W-PR i J-PR; Ryc. 5.2) oraz podobny wiek 2 – 4 miesięcy. Według literatury osobniki urodzone wiosną rosną szybciej (Schwarz et al., 1964; Zejda, 1971), między innymi po to, aby jak

najszybciej przystąpić do reprodukcji (Bujalska, 1983). Wyższe tempo wzrostu podwyższa tempo metabolizmu, co może powodować wzrost produkcji wolnych rodników (Monaghan et al., 2009). Powyższe wyniki nie potwierdzają tej hipotezy. W znacznej większości przypadków różnice pomiędzy generacjami nie były istotne statystycznie, a w przypadku uszkodzeń lipidów w wątrobie i białek w mięśniach, u szybciej rosnących osobników wiosennych, uszkodzenia te były nawet niższe. W przeciwieństwie do moich wyników, pisklęta zeberek, które rosły szybciej, miały większą podatność na uszkodzenia oksydacyjne w stosunku do wolniej rosnących osobników (Alonso-Alvarez et al., 2007). Jagnięta owiec o szybszym tempie wzrostu również charakteryzowały się większymi uszkodzeniami lipidów w osoczu (Nussey et al., 2009). Być może różnice w tempie wzrostu dwóch grup nornic i wynikające z nich różnice w tempie metabolizmu nie były na tyle duże, aby spowodować większe uszkodzenia.

Samice po reprodukcji: pokolenie wiosenne a pokolenie jesienne

Zgodnie z hipotezą dotyczącą roli stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się, u starszych osobników akumulują się uszkodzenia oksydacyjne, które w konsekwencji mogą prowadzić do śmierci osobnika (Fukagawa, 1999; Kirkwood i Austad, 2000; Muller et al., 2007; Barja, 2013). Moje wyniki nie potwierdzają tej hipotezy. Starsze samice nornicy (przezimki po reprodukcji) miały podobne lub niższe poziomy uszkodzeń lipidów i białek w stosunku do młodszych osobników, które rozmnażały się w tym samym roku, w którym się urodziły. Część badań z ostatnich lat wskazuje, że zależność pomiędzy starzeniem się a stresem oksydacyjnym nie zawsze jest zgodna z powyższą hipotezą (Speakman i Selman, 2011). W przypadku muchołówki białoszyjej, młodsze samice charakteryzują się wyższym poziomem stresu oksydacyjnego w stosunku do starszych osobników, natomiast trend ten nie jest widoczny u samców (Markó et al., 2011). Dwa gatunki północnoamerykańskich ryjówek (*Sorex palustris* i *Blarina brevicauda*) przejawiają zależny od wieku wzrost poziom enzymów antyoksydacyjnych w mięśniach szkieletowych. Mogą być one odpowiedzialne za poziom wybranych markerów uszkodzeń oksydacyjnych, które oprócz uszkodzeń lipidów w mięśniach, były albo niższe, albo niezależne od wieku (Hindle et al., 2010).

Nornice z pokolenia jesiennego były około pół roku starsze od osobników z pokolenia wiosennego. Z drugiej jednak strony były cięższe i najprawdopodobniej osiągnęły już swoją maksymalną masę (Zejda, 1971) i nie musiały wydatkować

dodatkowej energii na wzrost, w przeciwieństwie do młodszych osobników wiosennych, które ciągle rosły. Jest prawdopodobne, że to właśnie skumulowany efekt reprodukcji i tempa wzrostu mógł być odpowiedzialny za wyższy poziom stresu oksydacyjnego u szybciej rosnących samic z generacji wiosennej.

Stres oksydacyjny a obrona antyoksydacyjna

Tylko w jednym przypadku znalazłem statystycznie istotną zależność pomiędzy obroną antyoksydacyjną a poziomem uszkodzeń oksydacyjnych, natomiast kierunek tych zmian był odwrotny do oczekiwanego. W wątrobie, wraz ze wzrostem stężenia całkowitego glutationu, wzrastał również poziomu uszkodzeń białek (Tabela 5.3). Według hipotezy stresu oksydacyjnego, poziom uszkodzeń powinien być odwrotnie proporcjonalny do poziomu antyoksydantów (Monaghan et al., 2009), gdyż uszkodzenia powstają przy niedostatecznej obronie antyoksydacyjnej. Taką sytuację stwierdzono w wielu pracach (Garratt et al., 2011; Fletcher et al., 2013; Yang et al., 2013; Xu et al., 2014). Nie można jednak wykluczyć, że nawet wzrost stężenia całkowitego glutationu nie mógł zapobiec uszkodzeniom oksydacyjnym białek u samic nornicy rudej.

Podsumowując, wyniki badań, przeprowadzonych na wolno żyjącej populacji nornicy rudej, nie potwierdziły żadnej z czterech hipotez przedstawionych na początku tego rozdziału. Nie potwierdził się wpływ tempa wzrostu i starzenia na stopień uszkodzeń oksydacyjnych. Co najważniejsze, przeprowadzone analizy dają niewielką podstawę, by móc przyjąć hipotezę o wyższym poziomie stresu oksydacyjnego u rozmnażających się samic. Otrzymane wyniki znacznie częściej wskazują na brak różnic w uszkodzeniach oksydacyjnych przed i po sezonie rozrodczym, a nawet obniżenie poziomu uszkodzeń po sezonie.

5.5. Tabele i ryciny

Tabela 5.1. Grupy wiekowo-reprodukcyjne normicy rudej. N = liczba osobników.

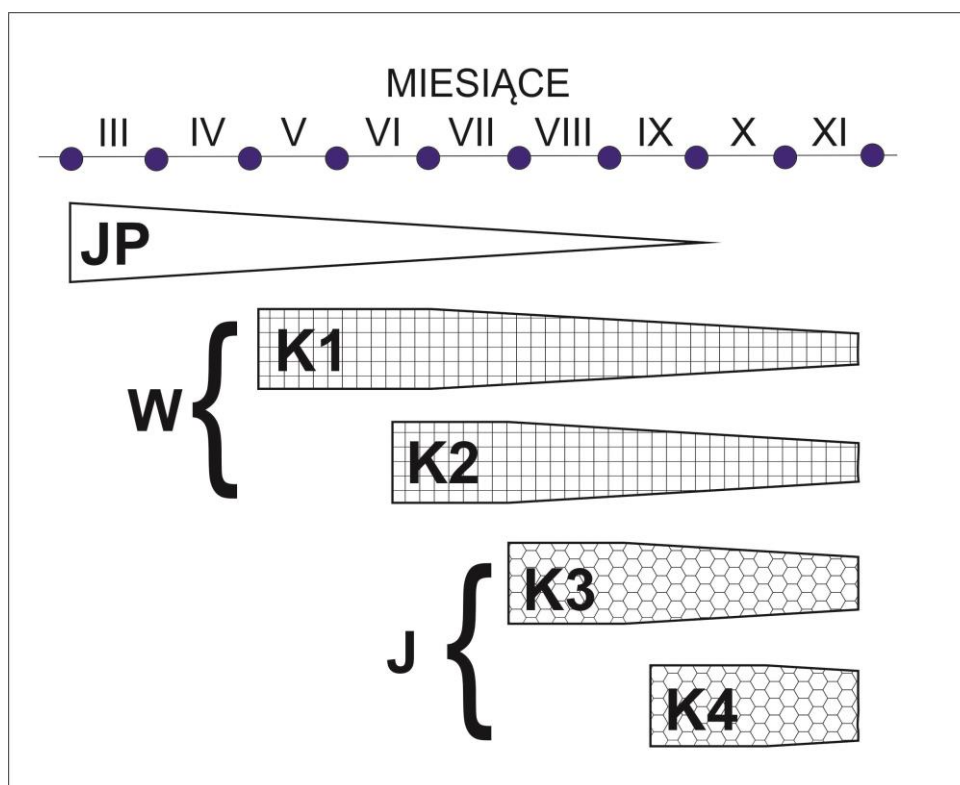
Grupa	N	Pokolenie	Status reprodukcyjny	Wiek	Okres odłowu
W-PR	10	Wiosenne	Przed reprodukcją	Młody, tegoroczny	Wczesne lato
W-R	6	Wiosenne	Po reprodukcji	Młody, tegoroczny	Jesień
J-PR	11	Jesienne	Przed reprodukcją	Młody, tegoroczny	Jesień
JP-PR	10	Jesienne	Przed reprodukcją	Dorosły, przezimek	Wczesna wiosna
JP-R	6	Jesienne	Po reprodukcji	Dorosły, przezimek	Wczesne lato

Tabela 5.2. Istotność różnic w stężeniu TBARS (markerów uszkodzeń oksydacyjnych lipidów) i grup karbonylowych (markera uszkodzeń białek) oraz antyoksydantów (stężeniu całkowitego glutationu i aktywności katalazy) w badanych tkankach pomiędzy pięcioma grupami wiekowo-rozrodczymi nornicy rudej. Wyniki z modelu ANOVA. Wartości *P* dla istotnych różnic wyróżniono pogrubioną czcionką.

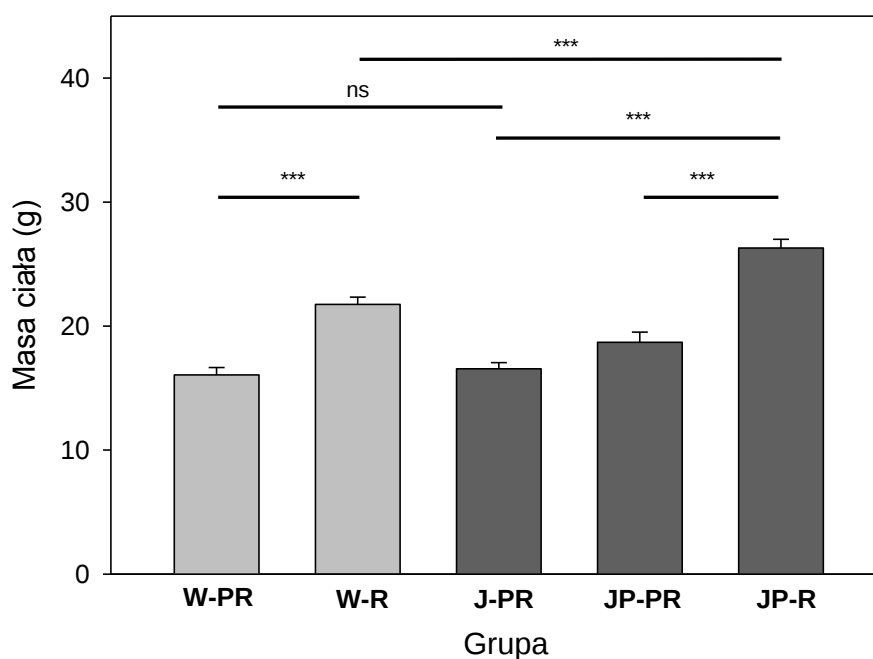
	Narząd	$F_{4,38}$	<i>P</i>
TBARS	Wątroba	6,91	0,0003
	Nerki	2,36	0,070
	Serce	1,34	0,274
	Mięśnie	1,50	0,222
Grupy karbonylowe	Wątroba	4,87	0,003
	Nerki	3,21	0,023
	Serce	3,67	0,013
	Mięśnie	3,96	0,009
Glutation	Wątroba	6,12	0,0007
Katalaza	Wątroba	2,60	0,051
	Nerki	0,91	0,437

Tabela 5.3. Analiza korelacji (współczynnik korelacji Pearsona r i jego istotność statystyczna) pomiędzy obroną antyoksydacyjną (stężeniem całkowitego glutationu i aktywnością katalazy) a markerami uszkodzeń oksydacyjnych w wątrobie i nerkach nornic rudych. Wartości P dla istotnych korelacji wyróżniono pogrubioną czcionką.

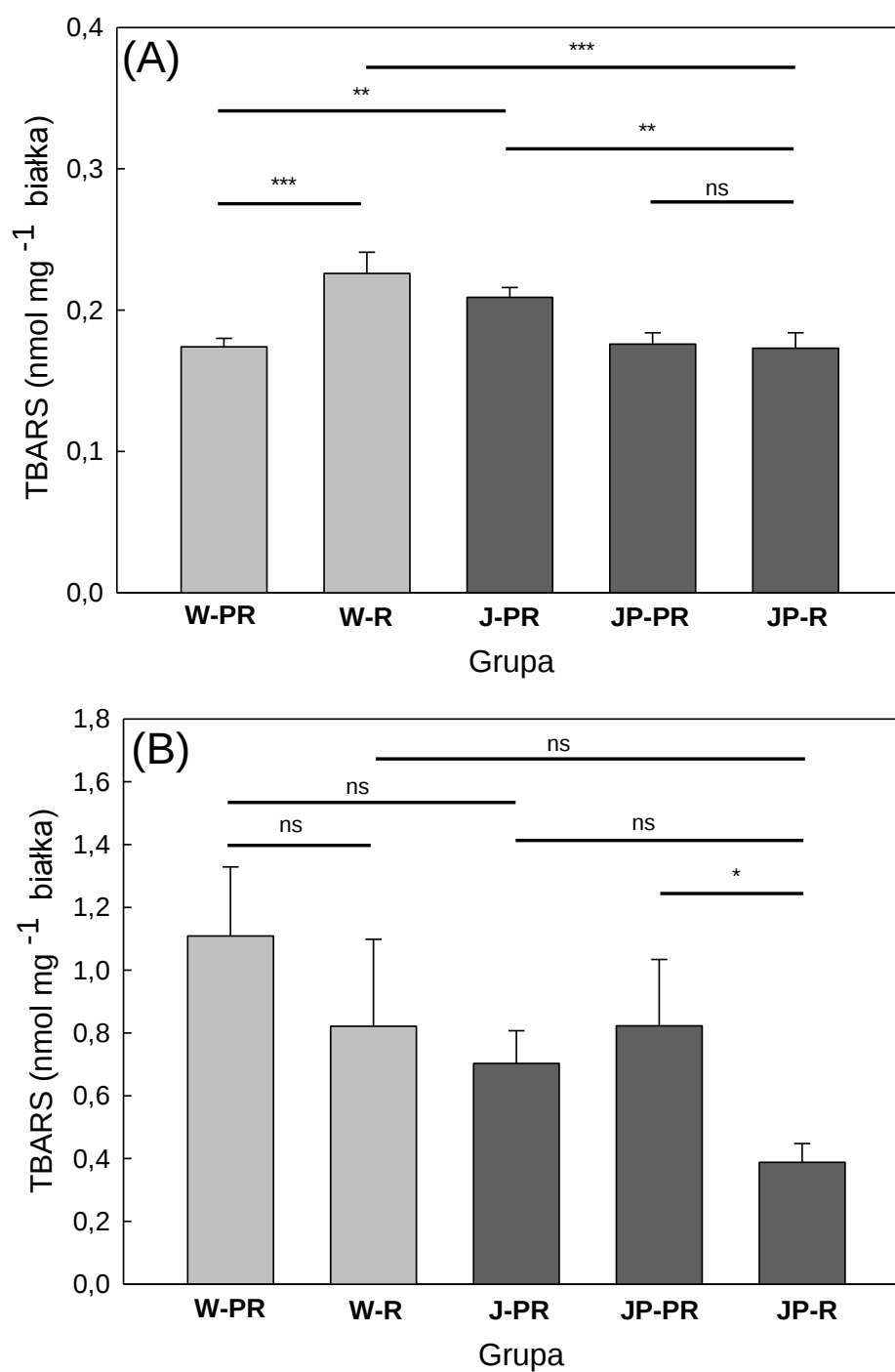
		TBARS		Grupy karbonylowe	
	Narząd	r	P	r	P
Glutation	Wątroba	0,115	0,462	0,332	0,029
Katalaza	Wątroba	-0,197	0,206	-0,070	0,657
	Nerki	-0,279	0,070	-0,088	0,575



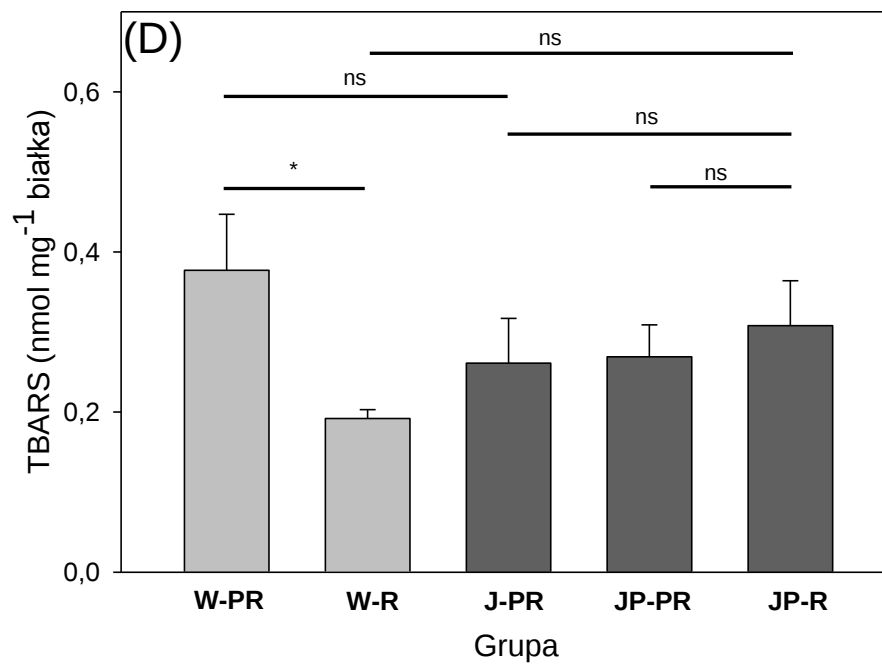
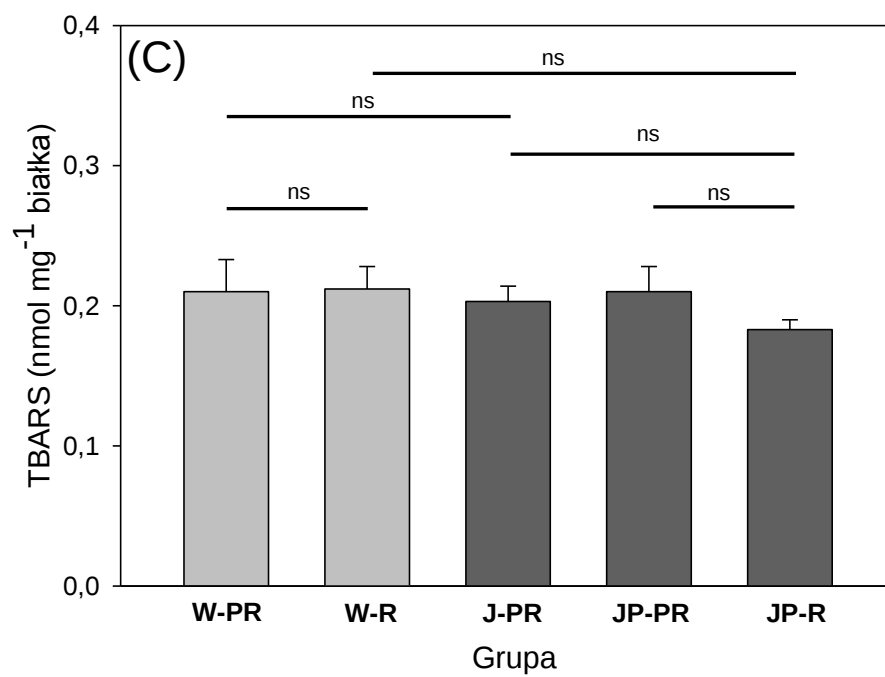
Ryc. 5.1. Struktura wiekowa populacji nornicy rudej w ciągu sezonu reprodukcyjnego. JP – przezimki, składające się głównie z osobników z pokolenia jesiennego poprzedniego roku; W – pokolenie wiosenne, składające się z kohort K1 i K2, osobniki te rozmnażają się tego samego roku, w którym się urodziły; J – pokolenie jesienne, składające się z kohort K3 i K4, osobniki będące potomstwem zarówno przezimków, jak i pokolenia wiosennego, rozmnażają się w kolejnym roku po przezimowaniu (Gliwicz, 1983; ze zmianami).



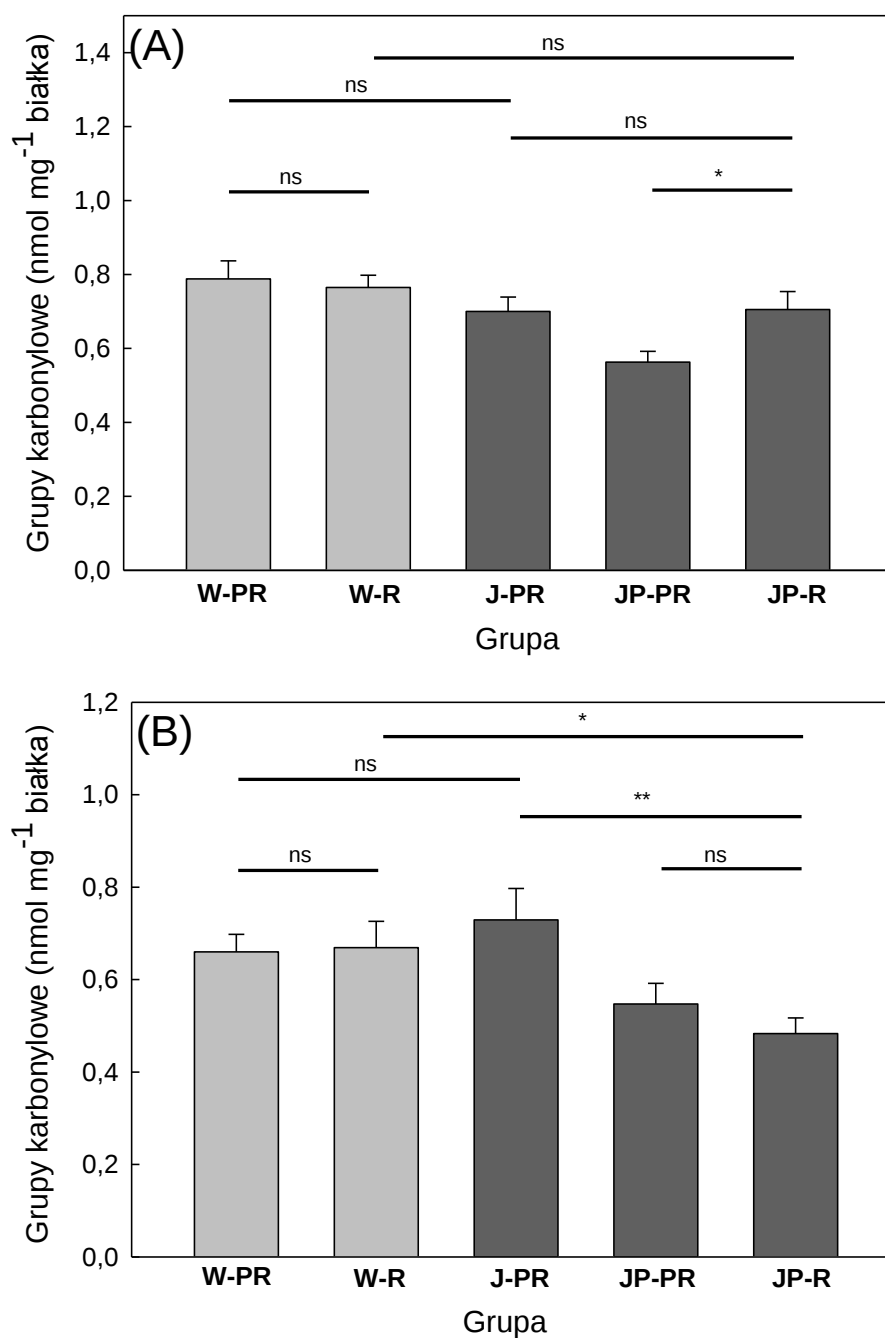
Ryc. 5.2. Średnie masy ciała (g, + SE) samic nornicy rudej pochodzących z różnych grup wiekowo-reprodukcyjnych. W-PR – pokolenie wiosenne, przed reprodukcją; W-R – pokolenie wiosenne, po reprodukcji; J-PR – pokolenie jesienne, przed reprodukcją; JP-PR – przezimki z pokolenia jesienno, przed reprodukcją; JP-R – przezimki z pokolenia jesienno, po reprodukcji. Dwoma kolorami słupków zróżnicowano pokolenie wiosenne i jesienne. Dokładniejsze informacje o grupach – w Tabeli 5.1. Gwiazdki nad liniami oznaczają poziom istotności statystycznej dla różnic pomiędzy danymi grupami, otrzymanej z analizy niezależnych kontrastów w ANOVA: ns – brak istotności statystycznej; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.



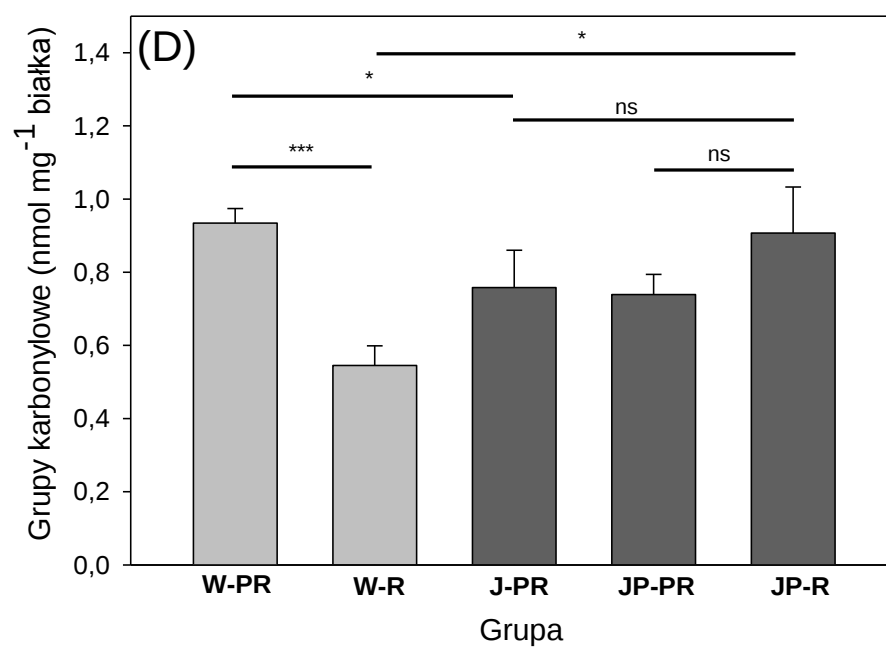
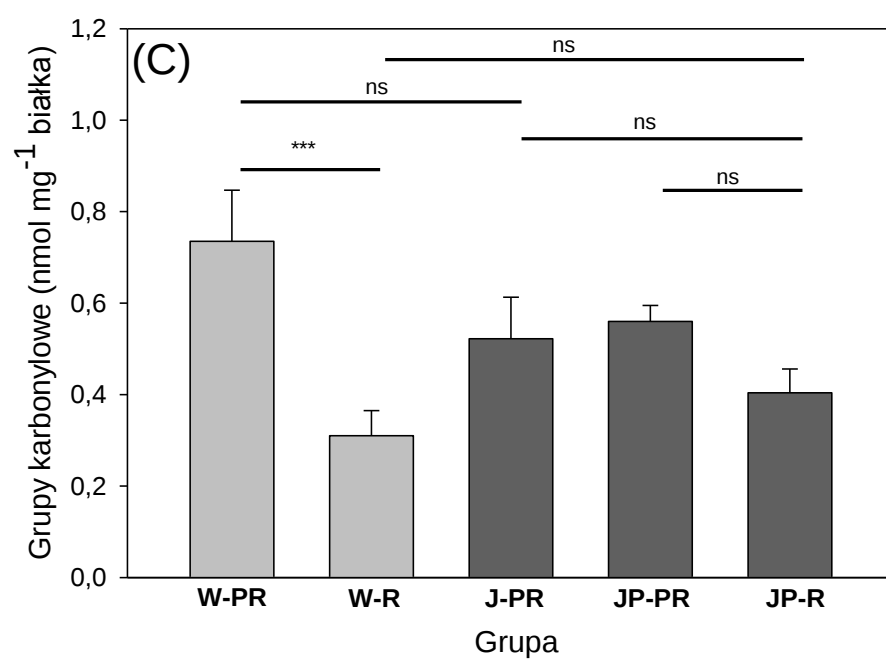
Ryc. 5.3 (część 1/2). Średnie stężenie (+ SE) substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, marker uszkodzeń lipidów) w wątrobie (A), nerkach (B), sercu (C) oraz mięśniach szkieletowych (D) normicy rudej w poszczególnych grupach wiekowo-rozrodczych. Pozostałe objaśnienia – patrz Ryc. 5.2.



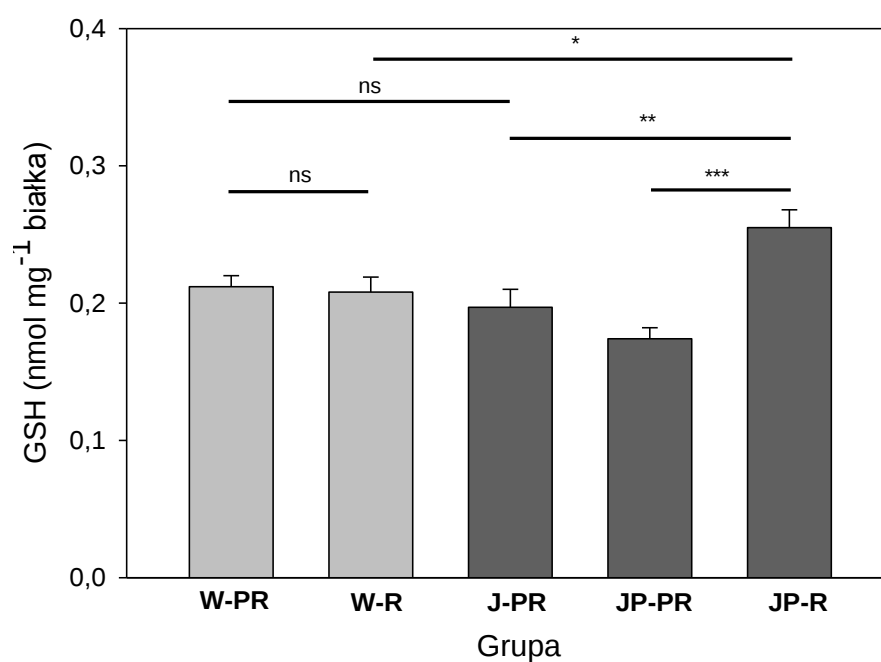
Ryc. 5.3 (część 2/2).



Ryc. 5.4 (część 1/2). Średnie stężenie (+ SE) grup karbonylowych (marker uszkodzeń białek) w wątrobie (A), nerkach (B), sercu (C) oraz mięśniach szkieletowych (D) normic rudych w poszczególnych grupach wiekowo-rozrodczych. Pozostałe oznaczenia – patrz Ryc.5.2.



Ryc. 5.4 (część 2/2).



Ryc. 5.5. Średnie stężenie (+ SE) całkowitego glutationu (GSH) w wątrobie nornic rudych w poszczególnych grupach wiekowo-rozrodczych. Pozostałe oznaczenia – patrz Ryc. 5.2.

6. Podsumowanie

Literatura z zakresu ekologii ewolucyjnej obfituje w przykłady kompromisów (*trade-offs*) w podziale energii i zasobów pomiędzy bieżące nakłady rodzicielskie a przyszłą reprodukcję. Inwestowanie w aktualne potomstwo powoduje obniżenie sukcesu reprodukcyjnego w przyszłości i obniża przeżywalność rodziców. Natomiast bezpośredni, fizjologiczny mechanizm tych kosztów nie jest dotąd wyjaśniony.

Celem pracy było przetestowanie hipotezy, że stres oksydacyjny, a konkretnie uszkodzenia oksydacyjne spowodowane przez wzrost tempa metabolizmu w okresie rozrodu są tym poszukiwanym mechanizmem. Obiektem badań była nornica ruda. Przeprowadziłem dwa eksperymenty, w których dla zwiększenia zróżnicowania wydatków energetycznych, użyłem nornic selekcyjowanych na wysokie tempo metabolizmu i zwierząt kontrolnych. W eksperymentach tych różnicowałem nakłady rodzicielskie, kontrolując liczbę miotów oraz manipulowałem wielkością miotów, maksymalizując wydatki u części nornic. Pomiary uszkodzeń oksydacyjnych lipidów i białek przeprowadziłem u zwierząt w eksperymentach oraz u nornic chwytyanych w ich naturalnym środowisku, przed i po okresie rozrodu. Podsumowując otrzymane wyniki należy stwierdzić, że:

1. Poziom uszkodzeń oksydacyjnych u nornic, które w eksperymentach wychowywały jeden lub dwa mioty, albo nie różnił się od samic nie rozmnażających się, albo był niższy. Takie same wyniki uzyskałem w eksperymencie, w którym część samic wychowywała powiększone mioty, a część pomniejszone – przez cztery kolejne ciąży i laktacje. Samice, które się rozmnażały, miały takie same lub mniejsze uszkodzenia tkanek niż samice nie rozmnażające się. [Było to drugie stwierdzenie obniżenia uszkodzeń w czasie reprodukcji u dzikiego gatunku zwierzęcia; pierwsze (Garratt et al., 2011) zostało opublikowane w trakcie opracowywania wyników niniejszych badań].

2. Samice, które wychowały jeden miot, nie różniły się uszkodzeniami od samic, które wychowały dwa mioty. Podobnie w drugim eksperymencie, samice o czterech kolejnych powiększonych miotach nie różniły się pod względem uszkodzeń od samic z miotami zredukowanymi. Brak też było istotnej korelacji między liczbą wychowanych młodych lub ich całkowitą masą a stopniem uszkodzeń oksydacyjnych.

3. Samice z linii selekcionowanych na wysokie maksymalne tempo metabolizmu nie różniły się stopniem uszkodzeń od samic z linii nie selekcionowanych (kontrolnych) w żadnym z dwóch eksperymentów laboratoryjnych.

4. W badaniach nad aktywnością katalazy i stężeniem całkowitego glutationu w wątrobie i nerkach u eksperymentalnych samic, jedynie w nerkach stwierdziłem istotną ujemną zależność między uszkodzeniami lipidów i białek a aktywnością katalazy.

5. U nornic pochodzących bezpośrednio z terenu, odławianych przed i po okresie rozrodu, obraz uszkodzeń oksydacyjnych był mniej jednoznaczny, lecz w zdecydowanej większości kombinacji markerów i narządów, poziom po rozrodzie nie różnił się lub był niższy niż przed nim. Porównując samice z dwóch pokoleń, wiosennego i jesienno, nie znalazłem zależności między uszkodzeniami a tempem wzrostu i wiekiem (starzeniem się).

Powyższe wyniki nie potwierdzają hipotezy, że stres oksydacyjny jest fizjologicznym mechanizmem leżącym u podstaw kompromisów między obecnymi a przyszłymi inwestycjami w potomstwo. Wniosek ten jest tym silniejszy, że w drugim eksperymencie nałożono na samice najwyższe obciążenie związane z wykarmieniem młodych spośród wszystkich dotychczasowych prac zajmujących się stresem oksydacyjnym u ssaków. Ponadto, w niektórych kombinacjach markerów i narządów, wyniki były przeciwne do przewidywań – uszkodzenia były mniejsze u samic rozmnażających się niż u nie rozmnażających. Wyniki przedstawione w punktach 1 i 2 wskazują na to, że sam fakt ciąży czy laktacji może obniżyć poziom uszkodzeń, co poparte jest brakiem zależności między wielkością nakładów rodzicielskich a uszkodzeniami. Wskazuje to wyraźnie na istotną rolę antyoksydacyjną hormonów płciowych. Uzyskane wyniki dostarczają też pewnego wsparcia hipotezie, że za obronę przed stresem oksydacyjnym w czasie rozrodu odpowiadają antyoksydanty (punkt 4), choć trudno jest wytłumaczyć wprost proporcjonalną zależność między stężeniem glutationu a uszkodzeniami białek u dziko żyjących nornic. Podsumowując, niniejsza praca dostarcza silnych argumentów przeciwko stresowi oksydacyjnemu jako mechanizmowi jednego z najbardziej podstawowych kompromisów historii życia.

7. Bibliografia

- Aebi, H. E.** (1986). Catalase. In, Bergmeyer, H. U. (ed), *Methods of enzymatic analysis*, 3.Edition. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp. 273–286.
- Aloise King, E. D., Garratt, M., and Brooks, R.** (2013). Manipulating reproductive effort leads to changes in female reproductive scheduling but not oxidative stress. *Ecol. Evol.*, **3**, 4161–4171.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., and Sorci, G.** (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, **60**, 1913–1924.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., and Sorci, G.** (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Lett.*, **7**, 363–368.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., and Sorci, G.** (2007). Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Funct. Ecol.*, **21**, 873–879.
- Alonso-Alvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., García, J. T., Viñuela, J., and Mateo, R.** (2010). Age and breeding effort as sources of individual variability in oxidative stress markers in a bird species. *Physiol. Biochem. Zool.*, **83**, 110–118.
- Alonso-Alvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., Mateo, R., Chastel, O., and Viñuela, J.** (2008). The oxidation handicap hypothesis and the carotenoid allocation trade-off. *J. Evol. Biol.*, **21**, 1789–1797.
- Anderson, M. E.** (1996). Measurement of antioxidants: glutathione. In, Punchard, N. A. and Kelly, F. J. (eds), *Free radicals, a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 213–226.
- Antinuchi, C. D. and Busch, C.** (2001). Reproductive energetics and thermoregulatory status of nestlings in pampas mice *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Physiol. Biochem. Zool.*, **74**, 319–324.
- Askenmo, C.** (1979). Reproductive effort and return rate of male pied flycatchers. *Am. Nat.*, **114**, 748–753.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and ageing. *Cell*, **120**, 483–495.
- Barja, G.** (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci.*, **27**, 595–600.

- Barja, G.** (2013). Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1420–1445.
- Bergeron, P., Careau, V., Humphries, M. M., Réale, D., Speakman, J. R., and Garant, D.** (2011). The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Funct. Ecol.*, **25**, 1063–1071.
- Bertrand, S., Alonso-Alvarez, C., Devevey, G., Faivre, B., Prost, J., and Sorci, G.** (2006). Carotenoids modulate the trade-off between egg production and resistance to oxidative stress in zebra finches. *Oecologia*, **147**, 576–584.
- Bonnet, X., Lourdais, O., Shine, R., and Naulleau, G.** (2002). Reproduction in a typical capital breeder: Costs, currencies, and complications in the asp viper. *Ecology*, **83**, 2124–2135.
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F. V., and Viña, J.** (2010). Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**, 205–211.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F. V., and Viña, J.** (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 546–552.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.*, **35**, 811–820.
- Bray, Y., Mlarboutin, E., Peroux, R., and Ferron, J.** (2003). Reliability of stained placental-scar counts in European hares. *Wildl. Soc. Bull.*, **31**, 237–246.
- Brzęk, P., Książek, A., Oldakowski, Ł., and Konarzewski, M.** (2014). High basal metabolic rate does not elevate oxidative stress during reproduction in laboratory mice. *J. Exp. Biol.*, **217**, 1504–1509.
- Bujalska, G.** (1983). Reproduction. In: “Ecology of the bank vole.” *Acta Theriol.*, **28**, 148–161.
- Castellano, S. and Cadeddu, G.** (2011). Does quality affect growth rate and age at maturity in species with indeterminate growth? *Evol. Ecol. Res.*, **13**, 797–812.
- Chrzęścik, K. M., Sadowska, E. T., Rudolf, A., and Koteja, P.** (2014). Learning ability in bank voles selected for high aerobic metabolism, predatory behaviour and herbivorous capability. *Physiol. Behav.*, **135**, 143–151.

- Clutton-Brock, T. H., Guinness, F. E., and Albon, S. D.** (1982). Red Deer: Behavior and Ecology of Two Sexes. Chicago Press, Chicago, IL.
- Costantini, D., Casasole, G., and Eens, M.** (2014). Does reproduction protect against oxidative stress? *J. Exp. Biol.*, **217**, 4237–4243.
- Costantini, D., Dell’ariccia, G., and Lipp, H.-P.** (2008). Long flights and age affect oxidative status of homing pigeons (*Columba livia*). *J. Exp. Biol.*, **211**, 377–81.
- Cretegny, C. and Genoud, M.** (2006). Rate of metabolism during lactation in small terrestrial mammals (*Crocidura russula*, *Mus domesticus* and *Microtus arvalis*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, **144**, 125–134.
- Crisp, D. J., and Patel, B.** (1961). The interaction between breeding and growth rate in the barnacle *Elminius modestus* Darwin. *Limnol. Oceanogr.*, **6**, 105–115.
- Cushing, B. S., Marhenke, S., and McClure, P. A.** (1995). Estradiol concentration and the regulation of locomotor activity. *Physiol. Behav.*, **58**, 953–957.
- Dijkstra, C., Bult, A., Bijlsma, S., Daan, S., Meijer, T., and Zijstra, M.** (1990). Brood size manipulations in the kestrel (*Falco tinnunculus*): effects on offspring and parent survival. *J. Anim. Ecol.*, **59**, 269–285.
- Dowling, D. K. and Simmons, L. W.** (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. Biol. Sci.*, **276**, 1737–1745.
- Drent, R. and Daan, S.** (1980). The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea*, **68**, 225–252.
- Ernsting, G., Zonneveld, C., and Isaaks, J. A.** (1993). Size at maturity and patterns of growth and reproduction in an insect with indeterminate growth. *Oikos*, **66**, 17–26.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239–247.
- Fletcher, Q. E., Selman, C., Boutin, S., McAdam, A. G., Woods, S. B., Seo, A. Y., Leeuwenburgh, C., Speakman, J. R., and Humphries, M. M.** (2013). Oxidative damage increases with reproductive energy expenditure and is reduced by food-supplementation. *Evolution*, **67**, 1527–1536.
- Fukagawa, N. K.** (1999). Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **222**, 293–298.

- Garratt, M., Pichaud, N., Glaros, E. N., Kee, A. J., and Brooks, R. C.** (2014). Superoxide dismutase deficiency impairs olfactory sexual signaling and alters bioenergetic function in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 8119–8124.
- Garratt, M., Pichaud, N., King, E. D. A., and Brooks, R. C.** (2013). Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. *J. Exp. Biol.*, **216**, 2879–2888.
- Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., McArdle, F., Jackson, M., and Hurst, J. L.** (2011). Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc. R. Soc. B*, **278**, 1098–1106.
- Gliwicz, J.** (1983). Age structure in “Ecology of the bank vole.” *Acta Theriol.*, **28**, 111–117.
- Gunderson, D. R.** (19978). Trade-off between reproductive effort and adult survival in oviparous and viviparous fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **54**, 990–998.
- Gündüz, F., Şentürk, Ü. K., Kuru, O., Aktekin, B., and Aktekin, M. R.** (2004). The effect of one year’s swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol. Res.*, **53**, 171–176.
- Gustafsson, L. and Part, T.** (1990). Acceleration of senescence in the collared flycatcher *Ficedula albicollis* by reproductive costs. *Nature*, **347**, 279–281.
- Gustafsson, L. and Sutherland, W. J.** (1988). The costs of reproduction in the collared flycatcher *Ficedula albicollis*. *Nature*, **335**, 813–815.
- Gustafsson, T., Andersson, B., and Westlin, L. M.** (1980). Reproduction in laboratory colony of bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Can. J. Zool.*, **58**, 1016–1021.
- Hall, M.E., Blount, J.D., Forbes, S., Royle, N.J.** (2010). Does oxidative stress mediate the trade-off between growth and self-maintenance in structured families? *Funct. Ecol.*, **24**, 365–373.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.** (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Harman, D.** (1957). Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, **11**, 198–300.

- Hindle, A. G., Lawler, J. M., Campbell, K. L., and Horning, M.** (2010). Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **155**, 427–434.
- Hirshfield, M. F.** (1980). An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Ecology*, **61**, 282–292.
- Huh, K., Shin, U. S., Choi, J. W., and Lee, S. I.** (1994). Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 109–114.
- Isaksson, C., Sheldon, B. C., and Uller, T.** (2011). The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *Bioscience*, **61**, 194–202.
- Johnson, M. S., Thomson, S. C., and Speakman, J. R.** (2001). Limits to sustained energy intake. III. Effects of concurrent pregnancy and lactation in *Mus musculus*. *J. Exp. Biol.*, **204**, 1947–1956.
- Kaczmariski, F.** (1966). Bioenergetics of pregnancy and lactation in the bank vole. *Acta Theriol.*, **11**, 409–417.
- Kireev, R. A., Tresguerres, A. F., Vara, E., Ariznavarreta, C., and Tresguerres, J. A. F.** (2007). Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. *Biogerontology*, **8**, 469–482.
- Kirkwood, T. B. and Austad, S. N.** (2000). Why do we age? *Nature*, **408**, 233–238.
- Koivula, M., Koskela, E., Mappes, T., and Oksanen, T. A.** (2003). Cost of reproduction in the wild: manipulation of reproductive effort in the bank vole. *Ecology*, **84**, 398–405.
- Konarzewski, M. and Diamond, J.** (1995). Evolution of basal metabolic rate and organ masses in laboratory mice. *Evolution*, **49**, 1239–1248.
- Konczal, M., Babik, W., Radwan, J., T., Sadowska, E. T., and Koteja, P.** (2015). Initial molecular-level response to artificial selection for increased aerobic metabolism occurs primarily through changes in gene expression. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/msv038
- Koskela, E.** (1998). Offspring growth, survival and reproductive success in the bank vole: a litter size manipulation experiment. *Oecologia*, **115**, 379–384.

- Koskela, E., Mappes, T., Niskanen, T., and Rutkowska, J.** (2009). Maternal investment in relation to sex ratio and offspring number in a small mammal - a case for Trivers and Willard theory? *J. Anim. Ecol.*, **78**, 1007–1014.
- Książek, A., Konarzewski, M., and Łapo, I. B.** (2004). Anatomic and energetic correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiol. Biochem. Zool.*, **77**, 890–899.
- Larcombe, S. D., Coffey, J. S., Bann, D., Alexander, L., and Arnold, K. E.** (2010). Impacts of dietary antioxidants and flight training on post-exercise oxidative damage in adult parrots. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **155**, 49–53.
- Larcombe, S. D., Tregaskes, C. A., Coffey, J. S., Stevenson, A. E., Alexander, L., and Arnold, K. E.** (2008). The effects of short-term antioxidant supplementation on oxidative stress and flight performance in adult budgerigars *Melopsittacus undulatus*. *J. Exp. Biol.*, **211**, 2859–2864.
- Lessels, C. M., and Boag, P.T.** (1987). Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk*, **104**, 116–121.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., and Shacter, E.** (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **233**, 347–357.
- Lindén, M.** (1988). Reproductive trade-off between first and second clutches in the great tit *Parus major*: an experimental study. *Oikos*, **51**, 285–290.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Mailloux, R. J. and Harper, M.-E.** (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 1106–1115.
- Mappes, T. and Koskela, E.** (2004). Genetic basis of the trade-off between offspring number and quality in the bank vole. *Evolution*, **58**, 645–650.
- Mappes, T., Koskela, E., and Ylonen, H.** (1995). Reproductive costs and litter size in the bank vole. *Proc. Biol. Sci.*, **261**, 19–24.
- Markó, G., Costantini, D., Michl, G., and Török, J.** (2011). Oxidative damage and plasma antioxidant capacity in relation to body size, age, male sexual traits and female reproductive performance in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*). *J. Comp. Physiol. B*, **181**, 73–81.

- McCormack, J. T. and Greenwald, G. S.** (1974). Progesterone and oestradiol-17 β concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J. Endocrinol.*, **62**, 101–107.
- Meister, A. and Anderson, M. E.** (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711–760.
- Metcalf, N. B. and Alonso-Alvarez, C.** (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Funct. Ecol.*, **24**, 984–996.
- Metcalf, N. B. and Monaghan, P.** (2013). Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends Ecol. Evol.*, **28**, 347–350.
- Milonoff, M., Pöysä, H., Runko, P., and Ruusila, V.** (2004). Brood rearing costs affect future reproduction in the precocial common goldeneye *Bucephala clangula*. *J. Avian Biol.*, **35**, 344–351.
- Monaghan, P., Metcalf, N. B., and Torres, R.** (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.*, **12**, 75–92.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H.** (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 477–503.
- Nordling, D., Andersson, M., Zohari, S., and Gustafsson, L.** (1998). Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. London B*, **265**, 1291–1298.
- Norris, K. and Evans, M. R.** (2000). Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.*, **11**, 19–26.
- Nur, N.** (1984). The consequences of brood size for breeding blue tits. II. Nestling weight, offspring survival and optimal brood size. *J. Anim. Ecol.*, **53**, 497–517.
- Nussey, D. H., Kruuk, L. E. B., Donald, A., Fowlie, M., and Clutton-Brock, T. H.** (2006). The rate of senescence in maternal performance increases with early-life fecundity in red deer. *Ecol. Lett.*, **9**, 1342–1350.
- Nussey, D. H., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G., and Blount, J. D.** (2009). Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct. Ecol.*, **23**, 809–817.

- Nyholm, N. E. I. and Meurling, P.** (1979). Reproduction of the bank vole , *Clethrionomys glareolus* , in northern and southern Sweden during several seasons and in different phases of the vole population cycle. *Holarct. Ecol.*, **2**, 12–20.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.** (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351–358.
- Oksanen, T. A., Jokinen, I., Koskela, E., Mappes, T., and Vilpas, H.** (2003). Manipulation of offspring number and size: benefits of large body size at birth depend upon the rearing environment. *J. Anim. Ecol.*, **72**, 321–330.
- Olsson, M., Wilson, M., Uller, T., Mott, B., and Isaksson, C.** (2009). Variation in levels of reactive oxygen species is explained by maternal identity, sex and body-size-corrected clutch size in a lizard. *Naturwissenschaften*, **96**, 25–29.
- Oswald, C. and McClure, P. A.** (1990). Energetics of concurrent pregnancy and lactation in cotton rats and woodrats. *J. Mammal.*, **71**, 500–509.
- Oswald, C. and McClure, P. A.** (1987). Energy allocation during concurrent pregnancy and lactation in Norway rats. *J. Exp. Biol.*, **241**, 343–357.
- Pankakoski, E. and Hanski, I.** (1989). Metrical and non-metrical skull traits of the common shrew *Sorex araneus* and their use in population studies. *Ann. Zool. Fennici*, **26**, 433–444.
- Parejo, D. and Danchin, E.** (2006). Brood size manipulation affects frequency of second clutches in the blue tit. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **60**, 184–194.
- Pérez-Rodríguez, L.** (2009). Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *BioEssays*, **31**, 1116–1126.
- Persky, A., Green, P., Stubley, L., Howell, C., Zaulyanov, L., Brazeau, G., and Simpkins, J.** (2000). Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *P.S.E.B.M.*, **223**, 59–66.
- Peterson, G. L.** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346–356.
- Pike, T. W., Blount, J. D., Bjerkeng, B., Lindström, J., and Metcalfe, N. B.** (2007). Carotenoids, oxidative stress and female mating preference for longer lived males. *Proc. Biol. Sci.*, **274**, 1591–1596.
- Plumel, M. I., Stier, A., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Criscuolo, F., and Bertile, F.** (2014). Litter size manipulation in laboratory mice: an example of how proteomic

- analysis can uncover new mechanisms underlying the cost of reproduction. *Front. Zool.*, **11**, 41.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., and Goto, S.** (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.*, **7**, 34–42.
- Reid, W. V.** (1987). The cost of reproduction in the glaucous-winged gull. *Oecologia*, **74**, 458–467.
- Reznick, D.** (1985). Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, **44**, 257–267.
- Roff, D. A.** (1992). The evolution of life histories. Chapman and Hall, New York.
- Roskaf, E.** (1985). The effect of enlarged brood size on the future reproductive potential of the rook. *J. Anim. Ecol.*, **54**, 255–260.
- Sadowska, E. T., Baliga-Klimczyk, K., Chrzęścik, K. M., and Koteja, P.** (2008). Laboratory model of adaptive radiation: a selection experiment in the bank vole. *Physiol. Biochem. Zool.*, **81**, 627–640.
- Sadowska, E. T., Labocha, M. K., Baliga, K., Stanis, A., Wróblewska, A. K., Jagusiak, W., and Koteja, P.** (2005). Genetic correlations between basal and maximum metabolic rates in a wild rodent: consequences for evolution of endothermy. *Evolution*, **59**, 672–681.
- Sadowska, E. T., Stawski, C., Rudolf, A., Dheyongera, G., Baliga-Klimczyk, K., Koteja, P., and Chrzęścik, K. M.** (2015). Evolution of basal metabolic rate in bank voles from a multidirectional selection experiment. *Proc. R. Soc. B.* 282, DOI: 10.1098/rspb.2015.0025
- Schmidt, C. M., Blount, J. D., and Bennett, N. C.** (2014). Reproduction is associated with a tissue-dependent reduction of oxidative stress in eusocial female Damaraland mole-rats (*Fukomys damarensis*). *PLOS ONE*, **9**, 1-7.
- Schwarz, S. S., Pokrovski, A. V, Istchenko, V. G., Olenjev, V. G., Ovtschinnikova, N. A., and Pjastolova, O. A.** (1964). Biological peculiarities of seasonal generations of rodents, with special reference to the problem of senescence in mammals. *Acta Theriol.*, **8**, 11–43.
- Searle, A.** (1954). Genetical studies on the skeleton of the mouse. IX Causes of skeletal variation within pure lines. *J. Genet.*, **52**, 68–102.

- Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., and Speakman, J. R.** (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends Ecol. Evol.*, **27**, 570–577.
- Selman, C., Grune, T., Stolzing, A., Jakstadt, M., McLaren, J. S., and Speakman, J. R.** (2002b). The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis*. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 259–265.
- Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., and Speakman, J. R.** (2002a). Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch. Biochem. Biophys.*, **401**, 255–261.
- Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., and Speakman, J. R.** (2008). The impact of experimentally elevated energy expenditure on oxidative stress and lifespan in the short-tailed field vole *Microtus agrestis*. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **275**, 1907–1916.
- Sharick, J. T., Vazquez-Medina, J. P., Ortiz, R. M., and Crocker, D. E.** (2015). Oxidative stress is a potential cost of breeding in male and female northern elephant seals. *Funct. Ecol.*, **29**, 367–376.
- Sibly, R. M. and Calow, P.** (1986). *Physiological Ecology of Animals* Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Skibieli, A. L., Speakman, J. R., and Hood, W. R.** (2013). Testing the predictions of energy allocation decisions in the evolution of life-history trade-offs. *Funct. Ecol.*, **27**, 1382–1391.
- Slagsvold, T.** (1984). Clutch size variation of birds in relation to nest predation: on the cost of reproduction. *J. Anim. Ecol.*, **53**, 945–953.
- Smith, H. G., Källander, H., and Nilsson, J. A.** (1989). The trade-off between offspring number and quality in the great tit *Parus major*. *J. Anim. Ecol.*, **58**, 383–402.
- Speakman, J. and McQueenie, J.** (1996). Limits to sustained metabolic rate: the link between food intake, basal metabolic rate, and morphology in reproducing mice, *Mus musculus*. *Physiol. Zool.*, **69**, 746–769.
- Speakman, J. R.** (2003). Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging. *Adv. Cell Aging Gerontol.*, **14**, 35–68.

- Speakman, J. R.** (2008). The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **363**, 375–398.
- Speakman, J. R. and Garratt, M.** (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, **36**, 93–106.
- Speakman, J. R. and Selman, C.** (2011). The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *BioEssays*, **33**, 255–259.
- Stadtman, E. R. and Oliver, C. N.** (1991). Metal catalyzed oxidation of proteins physiological consequences. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2005–2008.
- Stearns, S. C.** (1992). *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Steven, D. M.** (1957). The bank vole in captivity. *Nature*, **179**, 33–34.
- Stier, A., Reichert, S., Massemin, S., Bize, P., and Criscuolo, F.** (2012). Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Front. Zool.*, **9**, 37.
- Tinbergen, J. M.** (1987). Costs of reproduction in the great tit: intraseasonal costs associated with brood size. *Ardea*, **75**, 111–122.
- Torres, R. and Velando, A.** (2007). Male reproductive senescence: the price of immune-induced oxidative damage on sexual attractiveness in the blue-footed booby. *J. Anim. Ecol.*, **76**, 1161–1168.
- Trebatická, L., Ketola, T., Klemme, I., Eccard, J. A., and Ylönen, H.** (2007). Is reproduction really costly? Energy metabolism of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) females through the reproductive cycle. *Ecoscience*, **14**, 306–313.
- Tupikova, N. V., Sidorova, G. A., and Konovalova, E. A.** (1968). A method of age determination in *Clethrionomys*. *Acta Theriol.*, **13**, 99–115.
- Vaanholt, L. M., Speakman, J. R., Garland, T., Loble, G. E., and Visser, G. H.** (2008). Protein synthesis and antioxidant capacity in aging mice: effects of long-term voluntary exercise. *Physiol. Biochem. Zool.*, **81**, 148–157.
- Van Remmen, H. and Richardson, A.** (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp. Gerontol.*, **36**, 957–968.

- Vasilaki, A., Mansouri, A., Van Remmen, H., van der Meulen, J. H., Larkin, L., Richardson, A. G., McArdle, A., Faulkner, J. A., and Jackson, M. J.** (2006). Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell*, **5**, 109–117.
- Von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D., and Wittzell, H.** (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc. Biol. Sci.*, **266**, 1–12.
- Warner, R. R.** (1984). Mating behavior and hermaphroditism in coral reef fishes. *Amer. Sci.*, **72**, 128–136.
- Wasilewski, W.** (1952). Badania nad morfologią *Clethrionomys glareolus* (Schreb.). *Annls Univ. M. Curie-Sklodowska, C*, 199–211.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R., and Verhulst, S.** (2004). Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proc. R. Soc. London B*, **271 Suppl**, S360–363.
- Williams, G. C.** (1966). *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Xu, Y.-C., Yang, D.-B., Speakman, J. R., and Wang, D.-H.** (2014). Oxidative stress in response to natural and experimentally elevated reproductive effort is tissue dependent. *Funct. Ecol.*, **28**, 402–410.
- Yang, D.-B., Xu, Y.-C., Wang, D.-H., and Speakman, J. R.** (2013). Effects of reproduction on immuno-suppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. *J. Exp. Biol.*, **216**, 4242–4250.
- Zejda, J.** (1971). Differential growth of three cohorts of the bank vole, *Clethrionomys glareolus* Schreb. 1780. *Zool. List.*, **20**, 229–245.