Reviewer: 1  
  
Comments to the Author  
in their ms, the authors provide experimental evidence for changes in metabolic rates and innate immune response in naïve juvenile siskins when being infected with avian malaria. The study adds important facts how resting oxygen consumption in birds is affected by haemosporidian parasites from the transmission to the chronic stage of infection. Such data are widely lacking but fundamental for the understanding how malaria in general and parasite lineages in particular can affect wildlife.

* The study is well designed, and the statistical analysis is sound. However, the ms may improve by a stronger focus and a more concise style in many sections (esp. the discussion).  
  I personally was happy to see the very similar pattern but different strength of RMR dynamics during the infection. This similarity is one of the most important outcomes of the study, and I would put more emphasis on this nice result; whereas the comparison of var. RMR between the two lineages might be more expectable due to specific virulence.

**АБ: тут, видимо, он прав и стоит подчеркнуть это в Дискуссии.**

**ME: немного подкорректировала дискуссию**

* BMR/RMR: in my opinion the authors measured RMR in all phases of the experiment, and not BMR at DPI<0. Birds were captured during autumn migration and thus in migration physiological stage, which already differs from the basal conditions needed for a BMR (migration induced elevated hemoglobin concentration, increased enzyme activity, and fat and muscle accumulation).

**АБ: можно BMR легко назвать RMR0, это вообще на сути не скажется, чистой воды терминология. Тем не менее, это его замечание несколько смешно, поскольку тогда BMR — абстракция, сферический чиж в вакууме: непонятно тогда, когда BMR вообще нужно измерять. В течение всего года у птиц есть какие-то нагрузки. Зимой они одни, осенью другие, в репродуктивный сезон — третьи. Нет у особи какого-то одного BMR, уже лет 20 как показана его фенотипическая пластичность. У нас тут осенний BMR, мало ли что там с ферментами происходит. Это некий минимальный уровень потребления кислорода в заданных условиях (внешних и внутренних). Все что он перечислил вполне укладывается в рамки того, что называют BMR. У акклимированных к холоду птиц тоже измеряют BMR, хотя он будет отличаться от BMR до акклимации. Это все равно будет BMR, но он может меняться, это не паспортная характеристика птицы (как длина цевки), а пластичная. Главное, чтобы не было продуктивных процессов (линька, рост тела и пр.). Впрочем, на это тоже забивают: львиная доля всех измерений BMR птиц сделана в репродуктивный сезон (когда их легко ловить, особенно повторно), а в это время у птиц идет гаметогенез (даже у самцов сперматогенез — вполне себе продуктивный процесс, но все равно это называют BMR).**

**МЕ:** получается, ничего менять, в связи с этим не нужно?

* 2. I would like to see some additional information about the sex and size (wing length) of the individuals and the physiological state at the beginning and at the end of the experiment, i.e. body mass, hemoglobin concentration, fat and muscle scores, and finally the **date of death** (DPI) during the infection experiment (as symbols in fig 1A).  This is not only important for the study itself but also allows to compare the experimental data with other studies of similar species and/or different stages within the annual cycle.

**АБ:** тут есть здравое зерно. Эта инфа может быть вынесена в доп. материалы.

**ВМ:** нужно описать динамику веса! Хотя она и включена в модель.

**МЕ:** дайте мне график, пожалуйста, и я его опишу. Рецензент еще предлагает отметить на графике\_1 точки, когда птица умирала. Что на счет пола? Будем ли мы про него добавлять?

* 3. RMR repeatability: the topic should be removed from the current manuscript (its already mentioned that this will be a core topic of another ms in future (l. 524).

**АБ: эх, я знал, что эта фраза лишняя про будущую статью))**

**ВМ:** согласен!

**МЕ:** но он имеет в виду именно абзац про повторяемость. Он предлагает оставить отсылку к статье, а топик с описание повторяемости убрать. Мы как поступим – уберем отсылку или уберем абзац с описанием и оставим фразу про будущую статью? Или и ее тоже уберем?

Some additional comments:

* 4.1 Abstract: I would prefer to read an abstract in its classical form covering an introduction into the topic, few words about the method and then detailed results and their embedding into the wider subject.

**АБ:** **хмм, не помню наш абстракт. Мб. я его даже не читал, поскольку он был написан в последний момент. Но если все действительно так, то я полностью согласен с рецензентом в плане дизайна абстракта.**

**МЕ:** ну, окей, я немного изменила начало абстракта, оно действительно было как в дверь с ноги, но потом все оставила прежнее, там вроде все ОК.

* 4.2 Method section: please reorder the paragraphs with experimental design before DNA sampling and PCR methods.

**МЕ:** ок

* 4.3 Fig 1 AB: please change the current arrangement in stacking A above B and allow for widening the x axis to guide the reader towards the temporal changes of parasitemia.

**АБ:** **вы поняли, что он имеет ввиду про ось Х?**

**ВМ: техническая правка!**

**МЕ:** на счет того, что рисунок\_1 надо пошире сделать – согласна. Это который с паразитемией. А то у нас паразитемия сплюснутая с боков. Видимо, он также предлагает поместить рисунки А и Б друг над другом, чтобы они не теснили друг друга.

* 4.4 Fig 2 and 3:  B the lower figures -> diff RMR/IL6 of SGS1 and GRW2 can be removed, the data can be presented in the result section only.

**ВМ: не согласен! Эта картинка нужна!**

**МЕ: оставляем**

* Why is SGS1 line in red (A)? What does the red background grid (A) symbolize? Peak parasitemia period?

**АБ: надо внимательно проверить.**

**ВМ: это же было в подписи к рисунку!**

**МЕ:** в нашем случае SGS1 красный, потому что не синий😊. Можно, конечно, сделать все кривые черными и скучными. А на счет красного облака паразитемии – мой прокол, не вставила в подписи к рисункам:(

* 4.5 References in text and reference list: please check if all statements match the results in the reference (ie l 417 Videvall 2017 did not provide parasitemia measures,

**МЕ:** как я понимаю, Элен Видевалль использовала в статьях 2015 и 2017 кровь от одних и тех же птиц, просто анализ был разный. В статье 2017го она ссылается на данные 2015го и приводит значения паразитемии. Цитата из статьи 2017 г:

«The parasitemia intensity varied substantially in infected birds, with bird 2, bird 3 and bird 4 having 24.0%, 48.0% and 71.3% of their red blood cells infected during peak parasitemia, and later 8.2%, 21.8% and 33.3%, respectively, during the decreasing parasitemia stage (Videvall et al. 2015) »

Я писала в манускрипте:

«Both *P. relictum* SGS1 and *P. ashfordi* GRW2 avian malaria parasite species are considered generalists with a wide range of potential host species. According to published papers, both exhibit high levels of parasitemia during primary infections of juvenile siskins (Palinauskas et al., 2008; Videvall et al., 2017)»

кмк, паразитемии «24.0%, 48.0% and 71.3%», помимо того, что это вообще-то значения паразитемии, это очень высокие значения. Но можно и убрать Видевалль, и оставить только Вайдаса.

* and Videvall 2015 used ‘decreasing parasitemia’ at 31dpi as end point but not chronic infection stage). The reference list needs an update.

**МЕ:** таки я и не пишу нигде про хроническую стадию в эксперименте Видевалль 2015! Но да, возможно, есть смысл в том, что 31 дпи это все-таки «снижающаяся паразитемия», в то время как у нас 54 дпи конец эксперимента и в нашем случае это действительно хроническая стадия малярии. Тут получается можно сделать акцент, так как я не нашла никого, кто бы так долго держал птиц с *P. ashfordi*, кроме одной работы Ashgar, 2012, но там были камышевки, они этим паразитом болеют в природе, в отличие от чижей.

«Apart from the longer hidden stage in this group, high levels of parasitemia remained until the end of our experiment. Similar results for the same host-parasite species were observed in another study during the late stages of decreasing parasitemia, though it was the 31 DPI in comparison to later 54 DPI in our experiment. However, whether this was due to host-parasite interactions or the peculiarities of parasite species remain unclear (Videvall et al., 2017) »

**МЕ:** или по-другому, более подробно (это внесла в текст)

«The long prepatent period of *P. ashfordi* in our experiment corresponds with the observations in other studies and is in consistent with the idea of a more extended prepatent period for most parasites of *Novyella* subgenus, to which *P. ashfordi* belongs (Garnham, 1966; Palinauskas et al., 2011; Valkiūnas, 2005). Apart from the longer hidden stage in this group, high levels of parasitemia remained until the end of our experiment on 54 DPI. In the other studies with siskins infected with *P. ashfordi* the experiments typically ended on 30-33 DPI, and authors noted that though parasitemia of GRW2 were decreasing since it`s peaked, parasitemia levels still remained high. However, whether this was due to host-parasite interactions or the peculiarities of parasite species, such as late parasitemia`s peak, remain unclear (Videvall et al., 2017) »

**МЕ:** получается, все придирки этого рецензента по поводу ссылок на Видевалль оказались несостоятельными. Мне так и не понятно, что это вообще было такое, просто невнимательно прочитал он, так что ли?

Reviewer: 2  
  
Comments to the Author  
Summary:  
The authors sought out to test for energetic costs associated with experimental Plasmodium infection, interpreted through resting metabolic rate. The authors further inquired whether this (a) differed among Plasmodium lineages that differ in coevolutionary history, (b) if RMR explained by parasitaemia during infection, and (c) if RMR is explained by immune function during infection. Although these are very informative questions to answer to understand how wild birds respond to Plasmodium infection, I have significant/major concerns with the methods and interpretation of their statistics that impede with the interpretation of the data. I do not have experience conducting respirometry experiments, so I hope the other reviewer can speak to this aspect of the methodological design.

* The use of IL-6.  
  a. Authors “assume” (line 138) that IL-6 is a marker of immune response. Please specify which immune response is assumed here. The use of IL-6 as a marker of immune investment needs to be rationalized/validated because IL-6 also stimulates the process to produce red blood cells (haematopoiesis). In a disease that targets and destroys RBCs, IL-6 concentrations could be interpreted as an index of haematopoiesis just as well as immunity. How will the authors disentangle these possibly correlated interpretations of IL-6 concentrations (immune function nor haematocrit were quantified).

**АБ: не знал про это. Если это так, конечно, нужно будет об этом упомянуть и изменить обсуждение.**

**ВМ: а что вообще известно про ИЛ у птиц? Он как у человека? Или тут что-то другое.**

**МЕ: я встречала упоминание о роли ИЛ-6 в гемопоэзе. Пожалуй, действительно стоило упомянуть и про это, однако во многих статьях по ИЛ-6 про это вообще не говорится, только про его про-воспалительные свойства. Ну а то, что это может быть index of hematopoiesis я вообще пока ничего не нашла.**

[*Interleukin-6: An Overview, 1990*](https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.08.040190.001345?journalCode=immunol)***:* недавно накопились данные, подтверждающие точку зрения, что IL-6 может быть одним из факторов, способных индуцировать вступление «примитивных» стволовых клеток в клеточный цикл. Было показано, что IL-6 синергически действует с IL-3, по-видимому, за счет уменьшения времени покоя (G0) гемопоэтических стволовых клеток (24, 132). Результаты, полученные на костном мозге мышей, получавших 5-фторурацил, подтвердили, что основной мишенью lL-6 являются примитивные *noncycling (спящие?)* стволовые клетки.**

**МЕ:** накидаю здесь вам и себе фрагменты некоторых работ по измерению ИЛ-6 во время малярии у людей и мышей.

[*Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis, 2011*](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3221949/): Два десятилетия назад был обнаружен повышенный уровень IL-6 в периферической крови больных тяжелой формой малярии, вызванной *P. falciparum*. С тех пор этот вывод был подтвержден рядом исследований, показавших повышенный уровень IL-6 у детей с тяжелой формой малярии. Исследование на габонских детях также показало, что мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) являются основным источником повышенного производства IL-6 во время острой малярии. Однако исследования на мышиных моделях показывают, что IL-6 опосредует защитный иммунитет против преэритроцитарной стадии малярии, индуцируя IL-1β и TNF-α, а также во время эритроцитарной стадии заболевания, контролируя паразитемию посредством повышения уровня специфического иммуноглобулина (Ig) G-антитела [84]. Экспериментальные инфекции *P. falciparum* у людей подтверждают эти данные, поскольку раннее производство IL-6 связано с защитным эффектом. В соответствии с защитным действием IL-6, более низкие уровни IL-6 в крови связаны с гиперпаразитемией у малийских детей, больных малярией *P. falciparum*. В совокупности эти исследования подтверждают защитную роль IL-6 на ранних стадиях заболевания путем контроля паразитемии. Однако отсутствие контроля над паразитемией и, как следствие, прогрессирование заболевания в сторону тяжелого заболевания могут объяснить связь между повышенными уровнями IL-6 и усиленной патофизиологией.

[*Low antibodies against Plasmodium falciparum and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case–control study, 2012:*](https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2875-11-181)

… severe malaria in Mozambican children under five years of age is associated with low IgM responses to blood stage antigens and low IgG responses to a rosetting DBLα domain [33], as well as with high levels of pro-inflammatory IL-6 and low levels of TGF-β1 and IL-12.

[*Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1β), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe Plasmodium falciparum Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls:*](https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.72.10.5630-5637.2004)

У людей роль воспалительных цитокинов при малярии менее четко определена (в сравнении с murine). Уровни эндогенных пирогенов, таких как IL-6, IL-1 и IL-8, повышаются при малярии (13, 34) и коррелируют с тяжестью заболевания (8, 26, 28, 48, 50).

Мы обнаружили значительно повышенные уровни провоспалительных IL-6, IL-12(p70) и, в меньшей степени, TNF-α в сыворотке крови больных тяжелой малярией по сравнению со здоровыми детьми того же возраста. Кроме того, в группе больных тяжелой малярией был повышен противовоспалительный IL-10. IL-6 является важным провоспалительным цитокином, который активируется TNF-α и действует совместно с другими медиаторами воспаления, контролируя паразитемию (18, 48). IL-10 играет важную роль в иммунорегуляции, подавляя выработку цитокинов (преимущественно TNF-α, IL-6 и IL-12), ингибируя функцию Th1 и стимулируя активность естественных клеток-киллеров (3, 7, 39). И IL-6, и IL-10, по-видимому, коррелируют с тяжестью заболевания, поскольку повышенные уровни были отмечены у пациентов с тяжелой малярией по сравнению с соответствующими случаями неосложненной малярии и, аналогичным образом, в неосложненных случаях малярии по сравнению со здоровыми людьми (таблица 3). Повышение уровня IL-10 также, по-видимому, тесно связано с выработкой IL-6, что подтверждает гипотезу о том, что он действует контррегуляторно (9, 21). Предыдущие исследования, в которых проводились серийные измерения IL-6 и IL-10, выявили увеличение соотношения IL-6/IL-10 (из-за более низких уровней IL-10) в образцах, взятых перед смертью, по сравнению с выжившими (8). Аналогичным образом мы отметили относительный дефицит IL-10, хотя и не статистически значимый, у детей, умерших от тяжелой малярии, по сравнению с детьми, которые выжили, что указывает на потерю функции подавления регуляции. Однако мы не обнаружили существенных различий в соотношениях IL-6/IL-10 между этими группами в связи с тем, что, в отличие от предыдущих данных, мы не обнаружили значимого повышения уровня цитокина IL-6 у детей, умерших от тяжелой малярии, по сравнению с теми, кто выжил (данные не показаны), а также мы не обнаружили корреляции возраста с изменениями уровня цитокинов. Небольшое количество умерших детей могло помешать этим результатам достичь статистической значимости.

Чтобы изучить связь провоспалительных цитокинов с симптомами тяжелоймалярии, детей разделили на детей с церебральной малярией (судороги, оглушение или кома), тяжелой анемией или гиперпаразитемией. Хотя считается, что церебральная малярия находится на одном конце спектра тяжести, гиперпаразитемия в месте нашего исследования (Bandiagara, Mali), по-видимому, имеет меньшую остроту заболевания, находясь между неосложненной малярией и тяжелой формой заболевания. Было отмечено, что у детей с церебральной малярией наблюдаются повышенные уровни IL-6 и IL-10 по сравнению со случаями тяжелой малярии без церебральных проявлений. Кроме того, несмотря на опубликованные сообщения о гиперпаразитемии, коррелирующей с повышенными уровнями IL-6 (8), мы обнаружили значительно более низкие средние уровни IL-6, что подтверждает наши выводы о том, что это менее острая форма тяжелой малярии в нашем месте исследования, и подтверждает наше предположение, что IL-6 коррелирует с тяжестью заболевания.

Although human immunodeficiency virus prevalence remains low (<2%) in this area, we were unable to rule out or diagnose concomitant bacterial infection, potentially altering the results.

(понравилась фраза, можно использовать похожее для оправдания смертности в контроле)

b. Method of IL-6 ELISA with respect to blood sampling of siskins and validation.

* A validation for use of this assay in wild siskins is not provided. This is important because the structure of the IL-6 protein may differ in selectively bred domestic poultry vs wild birds that are under selection against pathogen, so sensitivity of the assay may differ in these species. Please provide a validation with evidence of parallelism.

**ВМ:** нужен анализ литературы про ИЛ и прочий иммунитет у птиц.

**МЕ: попробую здесь накидать кусками информацию, которую я смогла нарыть**

[*Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties, 2001*](https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2001.02334.x)***:* IL-6 является исключительным цитокином, поскольку он демонстрирует удивительно низкую видовую специфичность. Предыдущие эксперименты с сырыми супернатантами (crude supernatants) индуцированных соответствующим образом куриных клеток показали, что гомолог IL-6 цыплят может проявлять активность в отношении мышиных клеток. Наши эксперименты с очищенным бактериально экспрессируемым ChIL-6 и супернатантами клеток, трансфицированных экспрессирующей ChIL-6 конструкцией, подтвердили эти данные. Тем не менее, мы были удивлены, обнаружив, что куриный IL-6 отличается от человеческого IL-6 примерно в той же степени, что и крысиный IL-6. Все три цистеиновых остатка ChIL-6, единственный остаток триптофана и несколько мотивов последовательности в центральной части молекулы консервативны в IL-6 млекопитающих, что указывает на сходную третичную структуру.**

[*Interleukin-6 is produced during both murine and avian Eimeria infections, 2000*](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242700002038)***:* Выработку активности куриного IL-6-подобного фактора исследовали с использованием “murine IL-6 7TD1 bioassay” \*. Присутствие значительных количеств IL-6-подобного фактора было обнаружено в сыворотке, взятой у некоторых цыплят, инфицированных *Eimeria tenella* в ходе первичного заражения и, в отдельном эксперименте, в течение первых нескольких часов после заражения – времени, когда провоспалительная способность IL-6 будет влиять на развивающийся иммунный ответ. Эти результаты позволяют предположить, что IL-6 также важен для индукции иммунных эффекторных ответов на инфекции *Eimeria* у кур.**

**\* 7TD1 это индикаторная клеточная линия для IL-6. В его присутствии клеточная культура растет.**

[*Brood size moderates associations between relative size, telomere length, and immune development in European starling nestlings, 2016*](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.2551)***: (интересная для нас)***

**Образцы плазмы, полученные из крови с ЭДТА, оценивали на содержание IL-6 и высокочувствительного СРБ с помощью последовательных протоколов твердофазного иммуносорбентного анализа сэндвич-типа (ELISA). Оба анализа валидированы для использования с плазмой, полученной из крови с ЭДТА. Для IL-6 образцы доводили до конечного объема 100 мкл и наносили на набор ELISA для куриного IL-6 (MyBiosource, Сан-Диего, Калифорния, США). Средний коэффициент разведения плазмы составил 1,79. Поскольку измерения проводились на разбавленной плазме, метод производителя был адаптирован для оптимального выявления низких уровней IL-6, а стандартная кривая сдвинута в сторону более низких значений (6-точечная стандартная кривая от 125 до 3,9 пг/мл). Подход стандартной кривой сохранялся. При этих изменениях в одном образце уровни IL-6 превышали стандартную кривую. У некоторых птенцов объем извлеченной плазмы был очень низким, и поэтому разведение плазмы для достижения желаемого объема образца для анализа (до коэффициента разведения 3,6) оказалось слишком высоким для уверенного определения уровней IL-6 (нижний предел обнаружения 1,5647 пг/мл). Вкратце, в лунки планшета загружали по 100 мкл либо разбавленных стандартов образцов плазмы скворцов, либо холостых образцов (разбавитель образцов) и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Содержимое лунок откладывали, а лунки с комплексами антитело-антиген обрабатывали 100 мкл биотинилированного детектирующего антитела в течение 1 часа при 37°C и трижды промывали перед инкубацией со 100 мкл коньюгата пероксидазы хрена (HRP) в течение 30 минут при 37°С. После трех дальнейших промывок лунки обрабатывали 90 мкл субстрата в течение 15 мин при 37°С, защищая от света, а затем добавляли 50 мкл стоп-раствора для остановки колориметрической реакции. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на микропланшетном считывателе FLUOstar Omega (BMG Labtech, Эйлсбери, Великобритания) с применением холостой коррекции с последующим построением четырехпараметрической логистической кривой (4-PL), подходящей к стандартной кривой. Стандарты обрабатывались в двух экземплярах, а образцы из-за ограниченного объема плазмы анализировались как одно измерение. Внутренний контроль известной концентрации IL-6 (15,6 пг/мл) был включен в каждый планшет для корректировки изменений от планшета к планшету. Коэффициент вариации между анализами по данным внутреннего контроля составил 8,6%. Конечные значения концентрации IL-6 после применения соответствующего коэффициента разведения для каждого образца выражали в пг/мл.**

[*A vertebrate cytokine primer for eco-immunologists, 2014*](https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2435.12273)***:***

**IL-6 может представлять особый интерес для экоиммунологов, поскольку данные свидетельствуют о том, что система IL-6 высоко консервативна. Куриный IL-6 может индуцировать пролиферацию в некоторых клеточных линиях мышей, и эта функция нейтрализуется антителом против человеческого IL-6 (Staeheli et al. 2001). Сообщалось также, что антитела к IL-6 к млекопитающим обнаруживают IL-6 в тимусе кур (Ottaviani, Franchini & Franceschi 1997). Рекомбинантный IL-6 человека также индуцировал продукцию APP гепатоцитами атлантического лосося (Salmo salar L.) (Jorgensen et al. 2000). Кроме того, сохранение IL-6-зависимого механизма, участвующего в транспортировке лейкоцитов во время лихорадки, было продемонстрировано как у эндотермических, так и у экзотермических таксонов (Appenheimer et al. 2007).**

**Обратной стороной методов ELISA, … является то, что требуются антитела, специфичные к интересующему цитокину. В некоторых случаях специфические антитела перекрестно реагируют с цитокинами других видов, что повышает практичность ИФА для некоторых немодельных систем. Однако важно отметить, что, хотя биологическая активность цитокинов высоко консервативна, перекрестная реактивность моноклональных антител между видами ограничена из-за тонких различий в белковых последовательностях (Scapigliati, Buonocore & Mazzini 2006).**

**МЕ: думаю, тут достаточно ссылок чтобы обосновать использование куриного ИФА на чижах.**

ii. Report the intra-and inter-variation of the ELISA plates.  
iii.    Sample replicates: were samples run in replicate as the manufacturer recommends? Please state as such.

**ВМ:** А как вообще устроен анализ на ИЛ? Если там действительно должны быть замеры у одной птицы по несколько раз, то это важно! Если в файле с данными приведены средние по нескольким повторностям замеров в один DPI, то лучше бы использовать первичку и сделать nested random effect. Да и вообще рецензент прав, если тест-система предназанчена для цыплят, то почему она годится для чижей. Кроме того, что известно про аллельный полиморфизм у ИЛ? Антитела из тест-системы могут не работать или работать плохо на других аллелях.

**МЕ:** здесь, если я правильно поняла Газатову, рецензент спрашивает, ставили ли мы разные наборы ИФА с одной и той же плазмой чтобы узнать ошибку между наборами и делали ли дубли плазмы внутри одного набора чтобы оценить ошибку внутри одного набора. Нет, мы ничего этого не делали, тк у нас ограниченное количество наборов ИФА было. Есть тут еще такой скользкий момент. Ладно там с ошибкой внутри набора, хуже если она разная между ними. Так как мы не делали дубли (проб/наборов), то мы не знаем величину ошибки между наборами. Возможно, она достаточно сильная и тогда, например, мы можем видеть низкие значения ИЛ-6 для всех проб, которые были этим набором проанализированы. У меня есть информация о том, в каком порядке тестировались пробы. То есть я могу прислать информацию о том,какие пробы были протестированыодновременно, одним набором. Но я не знаю, можно ли как-то оценить занижает ли конкретный набор значения или нет зная только это…

iv.     Volume of blood required to run the ELISA: 200ul of plasma is required to meet the 100ul per well per manufacturer’s instructions (found here: <https://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Chicken-Interleukin-6IL-6-ELISA-Kit-84590.html#a01>; no dilution of plasma is called for in this manual). 400ul of blood would be required to get 200ul of plasma to run this assay in duplicate (based on 50% haematocrit). This is a lot to take every 6 days from a small songbird, which leads to concern #2.

2.      Ethical concerns of blood sampling.

a.      IL-6 ELISA plasma requires 400ul of blood to get 200ul of plasma (see concern 1biv), and that is 20-58% of a siskin’s entire blood volume (based on 12-18g masses and 6-12% of their mass as blood). Authors state they followed the “current laws of Russia”, but no reference was provided. I consulted the The Ornithological Council’s “Guidelines to the Use of Wild Birds in Research” (see  
<https://www.research.ucsb.edu/sites/default/files/policies/iacuc/SS_WildBirds.pdf>), that states no more than 1% of a bird’s body mass may be collected at any one time; no more than 2% in 14 days. Authors sampled every 6 days, so the 2% rule applies. Siskins range 12-18g, so 120-180ul of blood can be collected at the 2% limit, which equals 60-90ul of plasma. This is not enough plasma to run a single well of the IL-6 ELISA and does not include the volume of blood that was used to make blood smears to assess parasitaemia. Thus, as the manuscript is written, the authors have violated the Guidelines for using wild birds in research.

**ВМ:** Сильный ход! Тут не очень ясно чем крыть.

**МЕ:** оказалось, что первоначально мне дали неверную ссылку на набор ИФА. На самом деле мы использовали другой, который предназначен для работ с небольшим количеством плазмы. Возможно, если бы не эта ошибка, этот рецензент не смог бы нагородить столько чуши про обескровленных чижей. Да и в статье черным по белому написано, 150 мкл раз в 6 дней…

b.      Interpretation of data. If excessive volumes of blood were collected, this is a concern for how to interpret the results of this experiment. Excessive losses of RBCs are an insult to injury for a malaria infection that destroys RBCs; the applicability of the results from birds that experience this volume of blood loss during malaria infection might not be applicable to any other bird with a malaria infection. Moreover, considering the predictions of this study state that RBC loss by the parasite could affect BMR & RMR, I worry that the blood draws may also bias the respirometry results.

**АБ:** **про потерю крови добавить в обсуждение.**

**ВМ: тоже справедливо! НО! Можно попробовать в качестве ковариаты вставить суммарную потерю крови. Она правда будет коллинеарна с DPI. Ну или нужны какие-то внешние данные, согласно которым потеря крови не является причиной изменения ИЛ и RMR.**

**МЕ: мы брали около 150 мкл раз в 6 дней. Есть работа по потере крови и бмр –** [***Does blood loss explain higher resting metabolic rates in nestling birds with hematophagous ectoparasites?***](https://nsojournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jav.02264)**Можно ею немного прикрыться. А вот на счет ИЛ6 бегло поискала и нашла две статьи где повышение ИЛ6 в сыворотке крови коррелировало с количеством потери крови при операциях, но это все человеческие статьи:** [***Serum Interleukin-6 levels after Urologic Operations***](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1442-2042.1996.tb00550.x)**и** [***Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: Factors influencing the serum level***](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/104346669490040X)

3.      Concerns with interpretations of statistical analyses.

a.      The number of models and how they are structured was not clear to me. I could not identify the dependent and independent variables for each model. Line 299 states “For each response variable…”, but the response variables have not explicitly been stated. Ideally, the link between each model and how it tests the hypothesis would be clear, i.e., “In order to test the hypothesis/prediction that … we used a … model with … as the independent variable and … as dependent variables.”

**АБ:** **тут, конечно, он прав. Модели должны быть эксплицитно описаны.**

**ВМ:** согласен! Это несложно сделать. Надо вставить формальное описание моделей. НО! Для человека, который понимает почему для анализа паразитемии используется, негативный бином это выглядит как подколка**.**

**МЕ:**

b.      The authors state “statistical significance” beyond its restrictions.

i. Lineages GRW2 & SGS1 are not explicitly contrasted for RMR and IL-6 (Tables 2 & 3), but there are multiple instances of inferring differences between these groups. The models for these tables contrast controls to GRW2 and controls to SGS1, but not GRW2 and SGS1.

**ВМ:** это не так! Таблицы 2 и 3 показывают лишь формальное описание моделей, то есть оценки значимости коэффициентов и смузеров. Это не таблицы, которые позволяют формально сравнить тритменты друг с другом. Теоретически это можно сделать, но это будет не корректно, так как смузеры для DPI для разных тритментов разные (грубо говоря для одного DPI различия между тритментами одни, а для другого DPI они другие). Это аналог проблемы сравнения тритментов при взаимодействии факторов. Если бы не было взаимодействия между DPI и Линией, то мы могли бы сравнить линии друг с другом и с контролем. А в нашей ситуации нет! Вместо этого мы приводим рисунки, где рассматривается смузер РАЗНИЦЫ между всеми парами тритментов. Мы принимаем за значимые те различия, где 0 выходит за пределы CI разницы в соответствующий DPI. Это надо описать не только в материалах и методах, но и в обсуждении тоже. В обсуждении надо сказать, что прямое статистическое сравнение RMR (и ИЛ) между линиями невозможно из-за наличия взаимодействия.

ii. The authors repeatedly state ‘significantly higher/lower’ for specific timepoints when they describe the trends in the data for parasitaemia, RMR, and IL-6, but the terms in the model do not allow for these specific interpretations. E.g., parasitaemia was not statistically different for parasitaemia between lineages, but authors state significantly higher/lower parasite loads on line 343. This is further interpreted in the discussion as such lines 407 onward yet the authors present no evidence that the long prepatent period is significantly longer for one lineage or the other – these are subjective interpretations by the authors. Statistically test for these differences if such statements are to be made.

**ВМ:** это все про то же! Как и в случае с взаимодействиями мы НЕ МОЖЕМ сравнивать main effects. Возможны лишь «локальные» сравнения. В случае с GAM это делается вот так, как мы сделали**.**

“The highest point” or “the biggest differences between X & Y occurred during DPIs”, but stating significantly different means for specific timepoints is beyond the statistical analysis completed.

**ВМ:** на основе построенной модели мы построили модель, описывающую поведение РАЗНИЦЫ смузеров. Если она выходит в минус, то то, из чего вычитают, оказывается меньше, чем то, что вычитают. Короче, дядя не въехал. Значить надо более подробно расписать метод.

To reconcile this, I recommend that the authors split their data by biologically relevant timepoints of infection: acute and recovery. This can be done by including ‘timepoint’ as a factor in the analysis or having separate models for each infection stage.

**ВМ:** Он предлагает построить более дорогую и более произвольную модель. Разделение на три фазы будет достаточно произвольным. Кроме того, в модели точно будет взаимодействие факторов Линия и Период. Это возможный ход! НО! Зачем? GAM для того и придумали, чтобы решать подобные задачи. По-моему, дядя знает про линейные модели достаточно, но не знает ничего про GAM.И уж тем более не надо делать «separate models for each infection stage» это уж совсем неправильно.

Additional Comments

Line 187 – Were these 5 birds ‘amplifiers’ of infection (their blood to be used in a subsequent passage) or are these experimental birds? This is not clear as written.

**ВМ:** А действительно, это как? Не надо ли источник инфекции, если птиц было несколько, рассматривать, как фактор в модели.

**МЕ:** а по-моему, очень странное замечание. Конечно, они не были использованы в эксперименте, а были только донорами для экспериментальных птиц. Расписала поподробнее, чтобы и слону было понятно:

«To multiply the parasites, a number of juvenile siskins (2 for SGS1, 3 for GRW2) were inoculated with infected blood obtained from SGS1 and GRW2 initial donors. These five birds served as amplifiers of parasites and were used in subsequent passages into experimental birds. For each experimental group, a mixture from infected donors’ blood (from each parasite donors to the specific experimental group), 3.7% sodium citrate (used as an anticoagulant) and 0.9% saline (all at a ratio of 4:1:5) was prepared as described by (Iezhova, Valkiūnas, & Bairlein\*, 2005). Forty experimental birds, twenty within each group, received an injection of 150 μl of this mixture into their pectoral muscle. The average parasitemia within the inoculum was … All twenty control birds underwent the same procedure, with the exception that the inoculated blood originated from an uninfected donor»

Please specify the number of days post-inoculation that amplifier blood was used for experimental inoculations, whether or not blood was pooled from amplifiers of the same lineage, and what the average parasitaemia was in the inoculum for each lineage.

**ВМ:** это хороший вопрос! Надо бы убедить всех, что кровь от разных птиц, но с одной линией — это одно и то же. Хотя бы надо проверить связь остатков с этим фактором. Или кровь пулировали?

**МЕ:** кровь от доноров пуллировали. Надо чтобы Лена посчитала, сколько паразитов в инъекции было.

Explicitly state the number of experimental birds that received inoculation with SGS1, with GRW2, and the number of controls.

**ВМ:** да!

**МЕ:** см. выше измененный текст из статьи, там указала

Line 195 – Explicitly state whether this blood collection occurred for amplifiers, or only the experimental birds.

**ВМ:** Согласен! **МЕ:** так ведь так и написано:

«Starting with the inoculation procedure and continuing every sixth day after, two capillaries (approximately 150 μl) of blood were collected from the wing vein (ulnar) of each **experimental** bird»

не уверена, что нужно еще как-то разжевывать чью кровь, брали, тут все вроде понятно.

Line 231 – ‘Each day’ is vague. State when measurements began as ‘days pre-inoculation’ and clarify whether this occurred every day post-inoculation for each bird.  
Were birds acclimated to the respirometry chambers prior to the measurement of BMR? Was BMR an average of multiple nights of this acclimation? Without acclimation, how can the authors rationalize that this baseline isn't affected by aversion to the respirometry chambers?

**АБ:** Никак. Это как с дикими птицами, которых ловят и сажают в ближайшую же ночь в respirometry chambers. Понятно, что все они испытывают стресс. Конечно, этот стресс может оказать влияние на BMR. Если птиц держать неделями в клеточных условиях и раз в пару дней измерять их BMR, то он постепенно снижается до некоего плато через полгода — год. Но не факт, то это снижение вызвано снижением стресса, а не (например) массы грудной мускулатуры (которая у птиц в неволе очень быстро уменьшается), других внутренних органов и в целом отражает меньшую необходимость в энергии при содержании в постоянных условиях и еде ad libitum. Поэтому считают, что стрессовое воздействие на птиц в первый день примерно одинаковое для всех особей (то есть достаточная выборка преодолевает эту проблему), и на его фоне оценивают BMR. Понятно, что можно приручить чижей настолько, что они уже сами начнут заходить в респирационные камеры без стресса, но не факт, что это уровень будет больше отражать их естественное состояние потребления кислорода.

**ВМ: ???** Не понял про что это он...

**МЕ:** правильно понимаю, по этому пункту никаких исправлений мы не делаем?

Rationale for placing 4 birds at once into the chambers? Was there a separate chamber for each bird? This isn't clear as written.

**ВМ: надо дописать, чтобы неспециалисты поняли!**

**МЕ:** ну что, неужели из этого текста не понятно, что сажали птиц отдельно? Не думаю, что нужно тут что-то менять

«Each day, at about 21:00, we placed up to four birds **into the individual polypropylene chambers** with a volume of 1.3 liters. These chambers, with birds inside them, were then placed within a thermostat to maintain the ambient temperature of 27 °C, which is within the thermoneutral zone of siskins»

Line 335 – As confirmation of the experimental design, please state the parasite load of the control group during the peaks for the other experimental groups (day 18). Why did 5 control birds die? How does this limit the interpretation of mortality for the experimental groups?

**АБ:** **да, смерть контроля очень сложно объяснить. Если написать про возможность заражения кокцидиями, то сразу зарубят всю интерпретацию (и справедливо).**

**МЕ: я тоже хочу умереть…**

Line 337 – ‘Species’ can be the host or the parasite; please clarify.

**МЕ:** Ок

Positive Feedback

Predictions were all well rationalized and the authors provided sufficient background information of the question, the study system, and rationale for the lineages in this study. I liked that the authors defined BMR & RMR for their study becuase I am not an expert here. Good choice of negative binomial models for parasite count data.  
  
Articles of Interest to Authors

Cytokines & Plasmodium in wild birds: Kelly et al. 2024 "Changes in HPA axis function, immunity, and glucose during acute P. relictum infection in house sparrows"

**МЕ:** этой статьи нет в доступе

Inoculation with Plasmodium that contrasts coevolutionary history with Plasmodium lineages:

Sarquis-Adamson & MacDougall-Shackleton 2016 "Song sparrows Melospiza melodia have a home-field advantage in defending against sympatric malarial parasites"

**МЕ:** может быть