



Posudek oponenta na magisterskou práci Bc. Kateřiny Rýpalové:

Light or temperature; That is the question. The circadian rhythm of the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*)

Magisterská diplomová práce obsahuje 22 stran textu, který se opírá o rozsáhlý soubor 74 zdrojů citovaných údajů, a dále 15 stránek obrazových a tabulkových příloh. Předložená práce se zabývá formou synchronizačního podnětu pro cirkadiánní aktivitu rypošů, která „trápí“ rypošologickou skupinu již delší dobu. Tato studie měla přinést nové impulzy pro podporu teplotní hypotézy.

Magisterská práce má víceméně formát rozšířeného manuskriptu s jasným záměrem dosažené výsledky co nejrychleji opublikovat. Vlastní studii předchází velmi rozsáhlý literární přehled, ze kterého je možno vytušit, že autorku práce bavila a že jí rozuměla. Metodika práce je promyšleně sestavena z 10 fází - možná mohlo být použito termínu částí, se kterým autorka na straně 10 začala, v chronobiologických studiích může termín fáze v nestandardních kontextech vést k určitému ztížení srozumitelnosti. Tyto části (případně moduly) zahrnují kombinace faktorů, ze kterých by mělo být jasné, zdali teplota převzala u podzemních savců roli „zeitgeberu“.

Data byla sbírána automaticky pomocí podkožních čipů a čteček, režimy podmínek prostředí byly řízeny počítačovými programy, zvířata byla habituována na provozní ruch v budově, krmení probíhalo náhodně, takže metodice není prakticky co vytknout. Ke konceptu práce mám nicméně jednu poznámku s dotazem. Podle Zelové et al. 2007 je termoneutrální zóna v rozsahu od 25 do 33 °C. Použité teploty byly od 17,5 do 29,5 ve vzduchu a od 19 do 27 v substrátu, tedy v oblasti, kdy nízké teploty získávají charakter silného signálu pro termoregulaci (termogenezi), což nepochybně muselo interferovat se synchronizačními procesy a chováním, což sama autorka také zvažuje. K tomu se tedy poji dotaz, co by se stalo, kdyby použitý rozsah hodnot pro synchronizaci byl transponován do vyšších hodnot a termoneutrální zónu by nepřesahoval?

Ke studii mám několik dalších konkrétních dotazů a poznámek:

Str. 1 - z citací by mělo být zřejmé, jestli autor publikoval poznatek jako jeden z prvních nebo jestli jsou určité poznatky v publikaci jen uvedeny. Biologické rytmy určitě neobjevil Gattermann et al. (2008), ale je možno citovat (viz např. Gattermann et al. 2008).

Str. 7 dole – rešerše autorky zde vedla k odlišení termoneutrálních teplot a teplot pod spodní kritickou hodnotou a autorka mohla právě zde navrhnout aspoň jeden experimentální modul toto zohledňující.

Str. 9 nahoře – když materiál čítá 5 jedinců, měla by být každému jedinci věnována náležitá pozornost a nemělo by to být vyřízeno konstatováním, že „zvířata byla chycena 2005 a 2009 nebo se narodila v zajetí“. I jejich konkrétní osud by mohl být diskutován.

Str. 19, diskuse nahoře – není jasná věta začínající „Although the results ...“

Shrnutí: Kolegyně Kateřina Rýpalová předkládá diplomovou práci, která se opírá o jedinečný materiál a jasný experimentální design. Magistrantka odvedla velké množství práce a výsledky zpracovala do kultivované podoby, přičemž školiteli přinesla cenná data, která se stanou důležitou součástí poznatků získávaných na katedře z afrických rypošů. Oponentovi tedy nezbyvá nic jiného než konstatovat, že tuto magisterskou práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 15. 5. 2015

Doc. RNDr. F. Sedláček, CSc.

Posudek na magisterskou práci Bc. Kateřiny Rýpalové s názvem: Light or temperature; That is the question. The circadian rhythm of the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*)

Předkládaná diplomová práce popisuje velice zajímavou sérii experimentů, kterými se autorka snažila porovnat synchronizační účinky světelného a teplotního cyklu na cirkadiánní systém (CS) rypose stříbřitého. Řada parametrů popisujících vlastnosti CS, jako např. endogenní perioda, akrofáze a doba resynchronizace, byla sledována na rytmu pohybové aktivity – všeobecně respektovaném markeru CS pohybujících se živočichů. Výsledky shrnuté do obrázku 4 na stránce 17 dle mého názoru ukazují, že světlo je dominantní synchronizátor CS rypose, a naznačují, že teplotní cyklus by mohl modulovat fázi rytmu u zvířat držných dlouhodobě ve stálé tmě.

K výsledkům mám tento komentář:

a) Označením *tau* se popisuje endogenní perioda „volného běhu“, tj. délka subjektivního dne a noci, která se obvykle liší od přesných 24 h solárního cyklu. Neoznačuje se jí obvykle délka periody synchronizovaná s vnějším cyklem. Ve výsledkové části se toto označení používá i pro periodu zvířat chovaných na světelném režimu LD 12:12, což není správně.

b) Nejsem si jistá, jestli dobře rozumím procesu průměrování záznamů za posledních deset dnů monitorování pohybové aktivity, ale chci upozornit, že v případě pokusů ve stálé tmě by měla autorka počítat s volným během, který prodlužuje, dle experimentu 2, vnitřní periodu o cca 38 minut denně. Desetidenní záznam je vhodný pro výpočet *tau*, ale ne pro tvorbu grafů uvedených v obrázku 4. Průměr za posledních 10 dnů způsobí, že časový rozdíl mezi první a desátou fází, která se průměruje do stejného čísla v grafu, je více než tři hodiny.

c) V souvislosti s délkou periody vidím jako velmi zajímavý výsledek zkrácenou periodu v pokusu IV. Pokud jsem dobře pochopila metodiku analýzy dat, tak toto zkrácení je patrné ještě 16 – 26 dní po posunu světelného režimu. (Mimo jiné, v textu by mělo být vysvětleno, proč se světelný režim o šest hodin předsazoval před obvyklý čas rozsvícení a neprodlužoval za obvyklou dobu zhasnutí. Z hlediska očekávaných výsledků je toto důležité.) V tomto případě došlo k očekávanému fázovému předběhnutí rytmu, který se projevil posunem akrofáze a mohl vyvolat v několika cyklech také zkrácení periody, které by však mělo být pouze přechodné. Zkrácení periody o 12 minut ještě po dvou týdnech po posunu může znamenat nedostatečnou adaptaci ranní nebo večerní složky cirkadiánního pacemakeru a/nebo má vysvětlení v integraci dat z period, kdy ještě docházelo k aktivní re-synchronizaci.

d) Maskující účinek zeitgeberu se od jeho synchronizačních účinků rozezná nejlépe testováním fáze cirkadiánních oscilací nastavené zeitgeberem v jeho nepřítomnosti. Z profilu rytmu v pokusu II je patrné, že synchronizační účinek světla přetrvává i ve stálé tmě a toto je patrné také z profilu rytmu v pokusu VI, kdy si rytmus v pohybové aktivitě zachovává fázi, ke které byl adaptován po posunu světla. K posouzení synchronizačních účinků teplotních cyklů slouží profil rytmu v pokusu VIII, kdy měla ideálně akrofáze pohybového rytmu zůstat ve fázi nastavené teplotou v pokusu VII. Profil rytmu v tomto pokusu, ale nevypadá příliš přesvědčivě. V tabulce 1 chybí údaje o akrofázi, a zejména tam chybí údaj, který prozrazuje, jak dlouho trval „re-entrainment“. U obrázku 3 je uvedeno, že tento pokus trval 69 dní. Pokud byl tedy zpracován záznam z posledních deseti dnů, je možné, že během předchozí doby mohlo dojít k „vyhasínání“, rytmus ztratil silnou amplitudu, vtištěná fáze teplotou se ztratila v rozptylu a naopak teplotou zamaskovaná fáze nastavená světlem se znovu vynořila. Bylo by

možná dobré změřit fázi rytmu hned po odmaskování teplotního zeitgeberu, což zcela postačí k prokázání jeho synchronizačních účinků.

Formální úroveň textu nutí oponenta uvažovat o tom, do jaké míry je vhodné chytat defendenta za slovo. Je bezpochyby bonus, že se autorka snažila napsat svojí práci v angličtině, domnívám se však, že magisterská práce si svým významem zaslouží odbornou jazykovou editaci. Nemám v úmyslu zamýšlet se dlouze nad chybějícími členy nebo jinými gramatickými útvary, užíváním "ich formy" a termínů jako je "animal kingdom", které nejsou obvyklé při psaní odborného textu, či opakovaným vysvětlením stejných zkratk (1. stránka – *tau*). Avšak kompozice celého textu, stylistika a syntax některých vět nedovolují zcela rozlišit, co je výrazem autorčiny neobratnosti ve vyjadřování a co je dáno chybami v chápání fungování cirkadiálního systému.

Uvádím výčet několika nejvýznamnějších nesrozumitelností:

1) kapitola 1 – členění do odstavců je nelogické – informace o synchronizaci CS předbíhá informaci o volném běhu. Zcela na závěr je informace o zeitgeberech, která z logiky věci musí předcházet informaci o synchronizaci CS.

Otázka k první větě pátého odstavce kapitoly 1: Jak si autorka představuje, že se CS aktivuje a deaktivuje v podmínkách střídání světla a tmy ve vnějším prostředí?

2) kapitola 2 – zde chybí vysvětlení hierarchie synchronizačních mechanismů mezi hlavním pacemakerem a periferními hodinami. Je zde ne zcela srozumitelně vysvětlená teplotní synchronizace a v seznamu literatury není dopsána citace Ruoff a Rensing, 2004. Z druhé věty posledního odstavce se může zdát, že autorka myslí, že cirkadiální pacemaker v suprachiasmatickém jádře (SCN) není teplotně kompenzován u teplokrevných živočichů, ale reaguje na měnící se teplotu okolí. To je sice částečně pravda, ale pouze v případě, že je SCN v *in vitro* podmínkách. Vnější teplota moduluje spíše výstupní rytmy SCN a přispívá k urychlení fyziologických změn souvisejících se sezónními změnami u fotoperiodických živočichů. U teplokrevných savců působí nejspíše sekundárně modulací aktivity, která může zpětně fázově posouvat oscilace cirkadiálního pacemakeru.

3) kapitola 3 – Jak spolu souvisí energetická náročnost života v podzemí, ochrana před predátory a špatným počasím, absence světla, a vhodnost rypošů jako modelu ke studiu CS? Toto srovnání je vyjádřeno v předposlední a poslední větě této kapitoly, které zjevně uvozují další kapitolu, specializovanou na výklad o CS podzemních hlodavců?

Otázka k předposlednímu odstavci kapitoly 3: Jak si autorka představuje světelnou synchronizaci nočních savců, jakými jsou např. netopýři.

4) kapitola 4 – druhý odstavec a první odstavec podkapitoly 4.1 mají stejný obsah.

5) kapitola 8 – Věta 2. odstavce diskuse na str. 19: "*Although the results of statistic show difference between the phase angles of the previous phase (Phase III) and this phase (Phase IV, appendix Fig. 10), this result is probably caused by early change of the phase when the activity rhythm of the individuals was not fully stable, whereas when visually inspected, the shift of the activity is evident and gradual (see Appendix, Fig.12), which indicates entrainment,*" je nesrozumitelná. Vyjádření: "... *early change of the phase when the activity rhythm was not fully stable...*" dohromady s předposlední větou odstavce možná znamená, že si autorka uvědomuje to, co jsem vyjádřila výše v bodě C.

Poslední větě odstavce: "*If the cue works as zeitgeber, phase angles should not be different between phases, and should be different between the beginning and the end of one phase*", však nerozumím vůbec.

- Konec stránky 19 a téměř celá stránka 20 poskytuje celkem srozumitelný výklad maskujícího působení teplotních cyklů. Problém nastává v části textu, kde se autorka snaží vysvětlit možné synchronizační působení teplotních cyklů. Všimá si volného běhu v DD i přítomnosti teplotního cyklu a vidí "*...gradual shift of the activity toward temperature cycle...*" bezpochyby v pokusu VII, který ale neukazuje nic jiného než maskující účinky teplotního cyklu na pohybovou aktivitu. Výsledky pokusu VIII, které jsou ty, jež popisují synchronizační sílu teplotního cyklu, diskutovány nejsou.

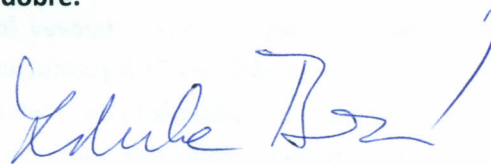
- Předposlední odstavec velmi opatrně shrnuje výsledky do závěru, že světlo je přeci jenom dominantní zeitgeber a konečně si všimá experimentu X, který jasně ukazuje, že rytmus pohybové aktivity rypoše je fázově spjat s cyklem světla a nikoliv s cyklem teploty, podobně jak to ukazuje také graf z experimentu V. Přesto však autorka v posledním odstavci tvrdí že: "*When repeatedly faced to external cue (light or temperature), all silvery mole-rats adjusted their activity pattern to particular factor.*"

Otázky k předposlednímu odstavci kapitoly 8: Jaký je rozdíl mezi designem experimentu X a tvrzením uvedeným na konci předposledního odstavce: "*In this context, something like anti-phase of temperature and light i.e. shift of both factors in opposite direction could be employed. In fact, we did not apply such design, because the risk of breakdown of the circadian clock was too high.*" Jak si autorka představuje, že vypadá "breakdown of the circadian clock"?

6) V práci chybí statistika a vysvětlivky, minimálně pro tabulky v apendixu.

Závěrem: Předkládaná diplomová práce popisuje velmi zajímavé a časově náročné experimenty, jejichž výsledky mohou být s nadšením přijaty odbornou chronobiologickou komunitou. Formální úroveň práce je však na takové úrovni, že značně znesnadňuje pochopení textu. Z těchto důvodů navrhuji klasifikovat předloženou magisterskou práci známkou dobře.

V Praze, dne 18. 5. 2016



RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.