

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Terezy Dikošové
Vliv handlingu na osobnostní rysy hraboše polního (*Microtus arvalis*)

Předložená diplomová práce testuje nakolik míra fyzického kontaktu (manipulace) ze strany člověka s dospělými hraboši polními ovlivňuje jeho výkonnost v testech, které hodnotí variabilitu v osobnostních projevech.

Práce je poněkud nestandardně členěna, protože není definována kapitola Úvod, i když čtenář si domyslí, že úvodem jsou první tři kapitoly. Pozice kapitoly Hraboš polní pak není úplně jasná. Práce má celkem 67 stran, využívající 163 literárních podkladů.

Otázky a připomínky, na které bych prosil při obhajobě reagovat jsou vyznačeny tučně.

Úvod

- Úvod je psán čtivě obsahuje přijatelné množství typografických chyb a i literatura je užívána adekvátně.
- První kapitola začíná seznámením s problematikou osobnosti u zvířat a definováním jednotlivých termínů, což je v tomto vědním odvětví poměrně nelehký, ale nezbytný úkol. Myslím, že autorka se ho zhostila obstojně a i nepoučený čtenář, dokáže z těchto kapitol pochopit poměrně složitou problematiku studia personality zvířat.
- Při popisu jednotlivých dimenzí velké pětky na straně 2 bych zmínil také anglické názvy, aby si čtenář mohl učinit sám jasnější představu, co přesně jednotlivé dimenze zahrnují. Nevím nakolik jsou české ekvivalenty zavedené. Celkově by si možná používání českých a anglických termínů zasloužilo sjednotit, především v případě pojmenování behaviorálních testů. Open field test by asi také bylo možno přeložit do češtiny, nicméně si nejsem jist nakolik se tak činí. Nicméně, stejně tak si nejsem jist ani v případě dalších, přeložených názvů testů.
- Kapitola 2, pojednávající o různých faktorech ovlivňujících osobnostní rysy, na mě působila poněkud stručně. Autorka se zde dotýká mnoha témat, ale všech pouze povrchně. Celkově na mě tato kapitola působí spíše, jako úvod ke kapitole následující, pojednávající o handlingu, coby faktoru ovlivňující osobnost, což je právě to, co autorku zajímá.
- V kapitole o handlingu bych na úvod uvítal zmínku o tom, že se týká výhradně savců, pro které je taktilní stimulace příjemná a uklidňující. V úvodu této kapitoly se mluví i o ptácích a jejich navykání na experimentátora, což může zavádět k myšlence, že i pro ně je handling metodou uklidnění, což pro velkou část ptactva neplatí. **Neexistují nějaké práce, které pojednávají o handlingu u ptáků (plazů...) a to nejen za účelem snazší manipulace s nimi, ale právě i pro zmírnění stresu z chovu a experimentů a snížení habituace a senzitivace?**
- V kapitole 3.1.1 se navzdory titulku o handlingu dospělců příliš nedozvíme, zatímco o handlingu neonatálním se píše mnoho, dokonce se píše o jeho vlivu na zvířata, což by mělo být náplní další kapitoly. Osobně bych nedělil kapitoly takto, ale rovnou bych se zmínil, jak se liší efekt neonatálního a dospělého handlingu na různé fyziologické a behaviorální projevy. Celkově by měly tyto kapitoly vyústit tím, co je zájmem této diplomové práce, proto bych vliv neonatálního handlingu zmínil na závěr.
- Kapitola pojednávající o pozitivním a negativním handlingu, by měla být umístěna dříve v textu. Na mnoha místech kapitoly 3.1 se na tuto problematiku již naráží a není vysvětlena. Celá práce i velká část této kapitoly pojednává pouze o handlingu pozitivním, proto bych se na úvod vypořádal s negativním handlingem a dále bych to s ním již nekomplikoval.
- V kapitole o neurofyziologických změnách po handlingu by stálo za to sjednotit užívání názvů morfologických struktur mozku. Obzvlášť druhý pád od Locus

coeruleus mě trošku tahal za uši. V ostatních případech je užíván první pád psaný kurzívou, tak proč ne zde.

- **Opravdu zvířata při swimming testu projevují obyčejně imobilitu? Nepřijde mi to jako příliš št'astná reakce na vhození do vody. Jak tento experiment přesně vypadá?**
- **Co značí, že solitérní samice hrabošů mají větší reprodukční úspěch? Je tedy pro hraboše vůbec významná pomoc mezi samicemi při výchově mlád'at, potažmo vyšší handling (např. lízání více samicemi)? Je to vůbec vhodný druh pro studium vlivu handlingu, když samice zjevně čelící velkému nedostatku handlingu, produkují nejvíce mlád'at? Jak je možné tyto závěry dát do kontextu zjištění, že mlád'ata narozená ve větších societách vykazují vyšší míru explorační a menší míru úzkosti?**
- Kapitola letmo popisující všechny možné typy laboratorních pokusů, v nichž byl použit hraboš polní bych buďto umístil dříve v textu nebo bych ji raději úplně vynechal. Zbytečně odvádí čtenářovu pozornost od tématu této práce.
- Celkově na mě kapitola o handlingu působila dojmem, že jeho efekt na osobnostní projevy zvířat je velmi dobře popsán a na mnoha druzích prokázán. Čekal jsem tedy, že v následující kapitole o hrabošovi bude zdůvodněno, proč je potřeba zhodnotit tento efekt i na tomto druhu. Zda autorka očekává nějaké odchylky od výsledků získaných např. na laboratorních myších, či jiných v přírodě se vyskytujících hlodavcích a čím by měly tyto odchylky být způsobeny. To se ovšem nestalo. Následující cíle práce tedy pouze konstatují, že je třeba tuto závislost zjistit, aniž by zde byla zmíněna autorčina očekávání. **Měla tedy autorka nějaký předpoklad, proč by právě hraboš polní měl vykazovat odlišný efekt handlingu na osobnostní charakteristiky, než jaký byl již dříve prokázán? Budou tyto případné odchylky způsobené tím, že se nejedná o laboratorní zvíře? V metodice se čtenář dozví, že autorka prováděla handling na dospělých zvířatech. Není tedy toto ten novátorský přístup, protože v úvodu se píše, že na dospělých zvířatech je efekt handlingu testován zřídka. Pokud ano mělo by to být zdůrazněno.**
- **Nejsem si úplně jist co znamenají některé hypotézy. Handling není ovlivněn pohlavím čtu jako, že to jak moc autorka zvíře handlovala nebylo závislé na tom, zda se jednalo o samce nebo samici (podobně u příslušnosti k rodině). Předpokládám, že se jedná o efekt handlingu na behaviorální výkony v testech, který není závislý na pohlaví (rodině).**
- **U hypotézy g není zjevné, proč by změna v hmotnosti měla být ovlivněna tím, zda je zvíře handlováno. Má to být měřítko stresu, fitness?**

Metodika

- **Proč bylo ze 60ti vytvořených párů F0 generace získáno pouze 53 mlád'at, není to na hraboše nějak málo?**
- Možná by stálo za to prezentovat tabulku, v níž by bylo shrnuto, kolik zvířat podstoupilo, kterou fází testování. Na začátku jich bylo 53, všechny testy podstoupilo 35, ale na začátku handlingu jich bylo dvakrát 19 (protože dva skákali pořád z EPM dolů a jeden zemřel – chápu to správně?). Předpokládám, že do analýz byla zahrnuta data pouze pro zvířata, která prodělala kompletní sadu testů.
- **Byly ve věku 19 týdnů prováděny behaviorální testy vždy ve stejném pořadí (startle2-OFT-EPM)? V rozestupu kolika dní, jeden test denně? Obr 1 by mohl být v tomto směru detailnější.**
- Obrázky se číslují podle pořadí výskytu v textu. Proto je Obr. 4 ve skutečnosti Obr.2. Nicméně on to není obrázek, ale příloha, proto by měl být referován jako Příloha 1.

- Předpokládám, že čištění boxů probíhalo u handlovaných i kontrolních zvířat vždy stejně (ve stejnou dobu, stejněkrát). **Byla i v případě kontrolních zvířat zachována přítomnost experimentátora v chovech v době kdy byla handlovaná zvířata handlována (v patřičné dny mezi 14. a 16. hod). Odfiltroval by se tím efekt vyrušení zvířat prostou přítomností experimentátora v chovném zařízení.**
- **Jak dlouho před startle testem (i ostatními testy) byl přenesen box s testovaným zvířetem do experimentální místnosti? Opravdu nemohla ostatní zvířata v chovné místnosti slyšet ultrazvukovou píšťalku?**
- Obr 2 - aréna OFT naznačuje, že $30 + 30 + 45 = 75$. S tím bych si dovolil nesouhlasit.
- Tab 2 – od začátku bych zavedl zkratku ST pro úlekový test a i v legendě této tabulky bych jí použil.
- Obávám se, že jsem vůbec nepochopil jak byla data analyzována. Z toho, co je napsáno v metodice a výsledcích vyplývá, že autorka vysvětlovala to zda bylo zvíře handlováno nebo ne (binomická data, GLM) pomocí šesti spojitých (výkony v behaviorálních testech a změna hmotnosti) a dvou kategoriálních proměnných (pohlaví a rodina). To vypadá, že došlo k záměně pojmů vysvětlující a vysvětlovaná proměnná, nicméně, ve výsledcích jsou opravdu pro všechny tyto vysvětlované proměnné ukazovány efekty. Naopak není nikde vidět efekt proměnné handling na jednotlivé měřené behaviorální proměnné, který by měl být analyzován šesti modely. Osobně bych navrhol vytvořit syntetickou behaviorální proměnnou pomocí PCA vytvořenou z výkonů v jednotlivých behaviorálních testech, která bude definovat pozici zvířete v n-rozměrném prostoru. Tato proměnná by pak byla vysvětlována tím, zda zvíře bylo handlováno, jeho pohlavím a příslušností k rodině pomocí GLM. Ve stávající podobě nelze nic říct o efektu handlingu na jednotlivé výkony zvířat. Pouze říká, že jejich výkony nemají žádný vliv na to, zda bylo zvíře handlováno, či nikoliv. **Doufám, že jsem to jen špatně pochopil a autorka mi vše vysvětlí.**
- **Proč je používán podíl výkonů v obou startle testech? Co říká, že zvíře v průběhu času přestane reagovat na děsivý stimul? Není zajímavá taká prostá reakce na takový stimulus? U ostatních testů nemohlo být porovnání prováděno aby nedošlo k handlingu, ale já bych přinejmenším do analýz zahrnul i výkon v druhém startle testu sám o sobě.**
- **Nechápu proč byl vytvořen zvlášť model pro efekt handlingu na výkon ve startle testu, když tatáž data jsou poté zahrnuta i do druhého modelu (se stejným výsledkem).**
- **Proč byly podíly vzdáleností ušlých ve středu OFT a v otevřených ramenech EPM počítány z logaritmu celkové vzdálenosti? Proč nebyl transformován až celý podíl (spíše arcsinově než logaritmičtí)? Obávám se, že takové číslo nemá reálně žádný smysl.**
- Proč není v metodice napsáno, že byla prováděna i RDA s popisem jejího nastavení?
- **Nikde není napsáno, co to je změna hmotnosti, kdy byly hmotnosti měřeny a proč.**

Výsledky

- Není třeba znovu popisovat model, který je už popsán v metodice.
- **Chápu to tedy správně, že byl vytvořen pouze model zahrnující efekt rodiny na handling (protože měl nejnižší AIC). Proč tedy tabulka 4 ukazuje efekty (předpokládám, že likelihood ratio testy) pro všechny proměnné? Jaký byl AIC estimatu?**
- Analýza RDA je, jak obrázek naznačuje, už provedena správně. Autorka ovšem neukazuje efekt handlingu, který RDA vypočítává a proto se ani zde nedozvíme, zda

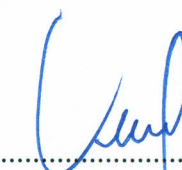
opravdu handling náhodou nějaký efekt nemá. **Mohla by tento efekt autorka ukázat/vypočíst?** V každém případě graf ukazuje, že behaviorální projevy tvoří v podstatě jednu osu, která je v záporných hodnotách určena vysokou mírou exploračního nového prostředí a v kladných vysokou schopností přestat se bát ve startle testu. Toto je i diskutováno. Poněkud zarážející je slabý efekt projevů odvahy (OFTcentral a EPMopen). Trochu bych se obával, že to může být způsobeno nesprávnou transformací dat (viz výše).

Diskuze

- V úvodu diskuze se částečně rýsuje záměr, s kterým tato práce vznikla, a sice otestovat vliv handlingu na nelaboratorním zvířeti. Chybí mi zde proto diskuze s pracemi, které jsou v úvodu zmiňovány, a pojednávají o handlingu divokých zvířat (hraboši – Wei et al. 2013, svišti – Ferrari et al. 2013, makiové – Hamalainen et al. 2014). Tyto práce nejsou relevantní?
- Pokud bylo cílem zjistit jak se liší divoká a laboratorní zvířata, proč nebyl handling prováděn ve věku, odpovídajícím věku, v němž je nejčastěji prováděn u potkanů a myši. Autorka sama zmiňuje, že práce testující vliv handlingu prováděného na dospělých jedincích jsou poměrně vzácné. Přinesla by práce jiné výsledky, kdyby autorka prováděla handling na juvenilních hraboších?
- Poměrně velká část diskuze pojednává o vlivu handlingu na přivyknutí na experimentátora a laboratorní prostředí/aparaturu. Vzhledem k tomu, že tyto parametry nebyly v práci nijak kvantifikovány a testovány, nevidím důvod se jim tolik věnovat.
- Také si nejsem jist nakolik lze z vizualizace RDA soudit na význam vzdálenosti ušlé v centrální části OFT a otevřených ramenech EPM. Oba tyto efekty jsou poměrně slabé, pravda orientované na jiné osy. Demonstrace velikosti efektu těchto proměnných by případně podpořila autorčina tvrzení.

Celkově mohu tedy shrnout, že autorka dobře pochopila problematiku personality u zvířat, zvládla práci s literaturou a byla schopna studovanou problematiku srozumitelně vysvětlit čtenáři své diplomové práce. Autorka nashromáždila dostatečné množství dat pro testování vytčených hypotéz. Hypotézy by nicméně mohly být formulovány jasněji, aby bylo zřejmé proč je celá práce prováděna a jaké má autorka očekávání. Obávám se, že při analýze dat došlo k významné chybě, což částečně omezuje vytvoření závěrů. Naštěstí byly provedeny dvě nezávislé analýzy (GLM a RDA) a druhá byla provedena správně a alespoň na základě vizualizace efektů lze tedy závěry formulovat. Diskuze by také profitovala z jasnějšího definování testovaných hypotéz a záměrů této práce. Práce nicméně splňuje požadavky na ni kladené na PřF JU a věřím, že po správné analýze dat by mohla být i převedena do podoby publikovatelného manuskriptu. Doufám, že mé připomínky tomu také napomohou. Práci tedy doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnotit známkou velmi dobře až dobře s přihlédnutím na průběh obhajoby.

V Českých Budějovicích 6.1.2017



.....
RNDr. Petr Veselý, Ph.D.



Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.
Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika
IČO: 67985904 DIČ: CZ67985904
tel.: 315 639 532; fax: 315 639 510
ID Datové schránky: tw6hm2a
E-mail: uzfg@iapg.cas.cz; URL <http://www.iapg.cas.cz>

Posudek na diplomovou práci Bc. Terezy Dikošové: „Vliv handlingu na osobnostní rysy hraboše polního (*Microtus arvalis*).“

Předložená diplomová práce se zabývá vlivem handlingu na osobnostní rysy a chování hraboše polního ve standardních behaviorálních testech. Jako metoda handlingu byla v práci testována habituace na osobu experimentátora a zacházení s experimentálním zvířetem v podobě taktilní stimulace po dobu 6 týdnů. Samotná problematika vlivu manipulace s experimentálními zvířaty v chovných zařízeních a v průběhu experimentů je atraktivní téma jak z hlediska stále více diskutované otázky etiky a welfare zvířat, tak vzhledem k potenciálnímu vlivu stresové reakce z laboratorního prostředí a samotné osoby experimentátora na fyziologii a výsledné chování sledovaných jedinců. V práci nebyl prokázán vliv handlingu na behaviorální projevy dospělých hrabošů ani v jednom ze tří sledovaných behaviorálních testů. Autorka tyto negativní výsledky diskutuje ve vztahu k použitému modelovému druhu, ontogenetickému načasování handlingu či samotné délce habituční periody. Osobně bych se přiklápěla také k diskusi samotné metodiky habituční fáze (viz dotazy níže) a dostatečného počtu testovaných zvířat v experimentech. Síla testu a použité N, nezávislost vzorků a opakování testů není v práci testováno ani příliš diskutováno. Na druhou stranu autorka v diskusi popisuje jakousi pozitivní změnu chování u handlovaných jedinců, avšak tato není konkrétně popsána v metodice. Můžete tyto změny a jejich testování blíže specifikovat? Neuvažovali jste o sledování dalších fyziologických parametrů, např. neinvazivní sledování stresových hormonů (kortikosteron), které by mohly představovat přímý důkaz snížení stresu testovaného zvířete v průběhu handlingu?

Celkově je práce zajímavá, je sepsána srozumitelně, bez výrazných formálních chyb, s odkazem na rozsáhlou literaturu k danému tématu zpracovanou v podobě spíše rešeršní úvodní části. Tato forma úvodu je na můj vkus místy příliš deskriptivní a rozsáhlá, bez jasného spojení popisovaných poznatků s cílem práce a testovanými hypotézami. Např. kapitola změny fyziologické a neurologické poměrně podrobně popisuje, co vše handling může ovlivňovat, ale jedná se spíše o výčet, v němž postrádám konkrétní vazbu či význam pro danou práci. Podobně si nemyslím, že je nutné podrobně popisovat veškeré studie, kde byli hraboši použiti jako modelové druhy od výzkumu fyziologie cirkadiálních rytmů přes schopnost samic alokovat energii v nedostatku tepla po význam hrabošů jako škůdců zemědělských plodin. Celá kapitola o hraboši polním tak mohla být zkrácena více než o polovinu, nebo jsem jen nepochopila význam a vztah těchto studií k osobnostním rysům hrabošů? Takto rešeršní úvod bych čekala spíše u bakalářské práce, přestože může sloužit jako poměrně detailní náhled do studované problematiky. Naopak cíle práce a testované hypotézy jsou popsány velmi minimalisticky, zdůvodnění, testované a očekávané předpoklady téměř chybí. Má-li být tato práce převedena v publikaci, myslím, že v této části je třeba výrazná úprava. Metodika a výsledky práce jsou sepsány stručně a jednoznačně, přesto mám několik dotazů, které myslím mohou být významné pro celkovou diskusi výsledků.

Str. 20 – 3.2.1. Pozitivní versus negativní handling: kapitola popisuje pozitivní a negativní handling a jejich význam na následný vývoj osobnosti jedince. Mezi negativní handling je dle mého zahrnuta běžná

manipulace se zvířaty v chovech (např. uchopení za ocas či přední část těla) a autorka cituje práce, jež prokazují negativní vliv takovéto manipulace na testované zvíře. Kapitola následně končí tím, že práce pojednává výhradně o pozitivním handlingu a negativnímu nebude nadále věnována pozornost. Jak jste běžně manipulovali se zvířaty v chovech? Nemohlo dojít k netestovanému negativnímu handlingu, který by mohl ovlivnit výsledky experimentu?

Str. 33 – v pokusu bylo získáno 53 mláďat a z nich celkově pokusy prošlo a do statistiky bylo zahrnuto jen 35. Jak byli tito jedinci vybráni? Jednalo se o sourozence ze stejného vrhu? Byl testován vliv vrhu jako faktor podílející se na osobnostním rysu ať už složení, velikost vrhu, popř. současné použití sourozenců ve vrhu? V kapitole 7.2. (výsledky) autorka uvádí, že nejlepší hodnoty AIC kritéria dosáhl faktor rodina: co tento faktor přesně znamená?

Str. 34: co konkrétně znamená fokální snímkování, a jak přesně probíhalo a co sledovalo? Nemohlo opět ovlivnit experiment jako další typ handlingu?

Str. 34: opakování více experimentů na jednom jedinci s sebou přináší úskalí učení a získané zkušenosti testovaného jedince z předchozích experimentů. Při každém pokusu je zvíře opět bráno do rukou a tedy navíc oproti plánovanému (a testovanému) designu dále handlováno. Navíc lze očekávat, že výsledky jednotlivých pokusů nebudou nezávislé, což je myslím případ korelace celkové aktivity jedince v OFT a EPM testu (kapitola 8.2.). Testovali jste opakování mezi jednotlivými testy? V jakých časových rozestupech byly testy realizovány? Termín „několik dní“ není úplně jednoznačný.... Proč jste volili danou posloupnost behaviorálních testů a nikoli např. náhodné střídání testů v rámci jedné skupiny?

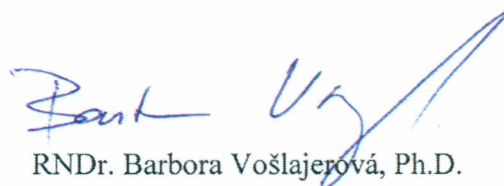
Str. 35: samotný proces handlingu: Z důvodu zachování stejných podmínek testování jedinci byli postupně habituováni na jednoho experimentátora, který měl při celé proceduře stejný plášť i vlněné rukavice, v nichž konkrétně habituace probíhala. Předpokládám, že na daný interval byli do stejných rukavic po sobě bráni všichni jedinci, jež prošli testem a tito patrně ve stresu do rukavic defekovali, popřípadě na rukavicích zanechali jakékoli jiné pachové stopy. Těm byli ale nestejněměrně vystaveni následující jedinci procházející habituací. Na druhou stranu, patrně z důvodu odstranění faktoru sociální zkušenosti byly v práci potenciální vlivy pachové komunikace s ostatními jedinci cíleně odstraňovány: všichni jedinci byli chováni izolovaně v průběhu celého pokusu, experimentální aparatury byly mezi pokusy vymývány lihem atd. Jak jste řešili potenciální vliv pachu ostatních jedinců v průběhu habituace? Patrně docházelo k nestejnému kontaktu s různými pachovými a často stres signalizujícími stopami po předchozích habituovaných jedincích. Je možné, že jedinci habituovaní na konci habituovací sekvence každého dne získali zcela jinou zkušenost a tedy jiný vliv handlingu. Navíc, je třeba zmínit, že samotná izolace testovaných jedinců po celou dobu může mít vliv na vývoj osobnostních profilů (tzv. sociální deprivace izolací), což je v práci zela opominuto.

Z formálního hlediska je práce dobře sepsaná, je zde minimum překlepů a chyb. Na začátku doporučuji sjednotit používání anglických názvů jednotlivých testů, metodik a jejich českých překladů. Statistické zpracování dat by mohlo být podrobnější (např. popis RDA analýzy), doplněné o příslušné citace. Literatura je citována dobře, neodpustím si drobnou poznámku: Jane L. Hurst je světově uznávanou odbornicí na behaviorální ekologii drobných savců a jedná se o velmi milou dámu, nikoli muže, jak je citováno v textu☺.

Ačkoliv práce nepřináší pozitivní signifikantní výsledky, což je mimochodem situace nepříznivá spíše pro autorku, jež je vystavena obtížnější prezentaci a diskusi negativních výsledků, a s tím se kolegyně Dikošová vypořádala v předkládané práci relativně dobře, práce přináší celkově pozitivní odpověď pro většinu etologů a experimentátorů. Lze říci, že negativní výsledky této práce potvrzují, že manipulace se

zvířaty v chovných zařízeních a v průběhu experimentu nemá výrazný vliv na chování v jednotlivých testech. Upřímně mne to těší, neboť jsem ráda, že v rámci dalších pokusů nemusíme trávit hodiny a týdny hlazením a chováním myší, ale ušetřený čas můžeme věnovat jiné bohužel činnosti či hlazení jiných objektů zájmu.

Práci jsem si se zájmem přečetla a i přes drobné nedostatky doporučuji k úspěšné obhajobě.



RNDr. Barbora Vošlajerová, Ph.D.

V Liběchově 13.1.2017