



V Praze dne 2.7.2020

Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomová práce Bc. Terezie Černíkové „Vliv bisfenolu S na vybrané markery meiotického zrání prasečích oocytů je předložena na 72 stranách. Cílem práce bylo potvrdit či vyvrátit negativní vliv endogenního disruptoru bisfenol S na průběh *in vitro* maturace prasečích oocytů, na stavbu děličího vřeténka, rozmístění a integritu mitochondrií a množství dvouvláknových DNA zlomů metodou TUNEL.

Diplomová práce je členěna podle pravidel. V literárním přehledu autorka velmi dobře shrnuje vznik a vývoj samičích pohlavních buněk, převážně na modelu prasete a člověka. Konkrétně se zabývá vznikem primordiálních zárodečných buněk, jejich vstupem do meiozy včetně folikulogeneze a dále pak klíčovými aspekty jaderného a cytoplasmatického zrání oocytů a vývojové kompetence. Další část literárního přehledu je zaměřena na charakteristiku vybraných endogenních disruptorů, jmenovitě bisfenolu A a zkoumaného bisfenolu S.

Kapitola Materiál a metody je sepsána podrobně a obsahuje popis většiny použitých technik a pracovních postupů. K této části diplomové práce mám pár připomínek a dotazů. Autorka zde zmiňuje metodiku barvení mitochondrií pomocí protilátky proti MFN1 bez toho, aniž by toto barvení nějak zdůvodnila, či ho porovnála s detekcí živých mitochondrií Mitotrackerem. Dále pak jsem se chtěl zeptat na řádově rozdílné ředění sekundární kozí anti-králičí protilátky, kdy v jednom případě bylo ředění 1:40 000 a v druhém 1:200. Pokud se jednalo opravdu o stejnou protilátku nerozumím této diskrepanci. V kapitole 5.1.5.1. autorka uvádí, že Mitotracker barví živé buňky. Jedná se o překlep (normálně barví živé mitochondrie) nebo má pro dané tvrzení vysvětlení? V přehledu metodik mi chybí způsob detekce jednotlivých maturačních stádií prasečích oocytů včetně způsobu fixace a přípravy vzorku pro mikroskopické pozorování. Jednalo o klasické barvení

Přírodovědecká fakulta UK

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.



chromatinu acetorceinem, či fluorescenční značení barvičkou Hoechst či DAPI? Za jakých podmínek byla hodnocena struktura dělicího vřeténka? Byly barveny všechny oocyty v rámci experimentální skupiny nebo byly vybrány pouze ty, které zdárně dokončily maturaci (MII)?

Kapitola výsledky je rozdělena do čtyř oddílů, které odpovídají stanoveným cílům. V první části se autorka zabývala vlivem různých koncentrací bisfenolu S (3 μ M, 30nM a 300 pM) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů izolovaných z prepubertálních vaječníků. Sledovala rozpad zárodečného váčku, stádium metafáze I a metafáze II 48 hodin od izolace. Výsledky z této studie jsou velmi překvapivé, zvláště v rámci nejnižší koncentrace BPS (300pM), kde podíl nematurovaných oocytů dosáhl více než 50%. Další výzkum byl zaměřen na vliv BPS na formování dělicího vřeténka u maturujících prasečích oocytů 48 hodin po izolaci. Zde autorka popisuje závislost obráceného písmene U, kdy kontrolní oocyty a oocyty s nejnižší koncentrací BPS (300pM) vykazovaly nesignifikantní rozdíly a statisticky významné jsou až skupiny s 3 μ M a 30nM koncentrací BPS. V komentáři ke kapitole Materiál a metody jsem se ptal na způsob výběru oocytů určených k bavení tubulinu. Důvodem je fakt, že pokud by byly barveny všechny oocyty nutně by autorka do analýzy zahrnula i ty, které po 48 hodinách skončily ve stádiu MI, zvláště pak v rámci nejnižší koncentrace BPS. Tento fakt by pak zkreslil veškerá mikroskopická pozorování. Má otázka tedy zní, zda autorka při mikroskopickém pozorování detekovala taktéž pólové tělísko a brala tuto skutečnost v potaz. Stejný dotaz má i k dalším analýzám zabývajících se hodnocením integrity a rozmístění mitochondrií v ooplasmě maturovaných oocytů. Byly selektovány oocyty, které dosáhly stádia MII nebo se jednalo o souhrnný vzorek bez jakékoliv selekce? Stejně jako v případě dělicího vřeténka by rozmístění mitochondrií mohlo být závislé na aktuálním maturačním stádiu (MII nebo MI) a nemuselo by mít tak signifikantní souvislost s přidaným BPS. Dále pak je zářející rozdíl ve výsledcích distribuce a aktivity mitochondrií, které byly získány použitím dvou nezávislých metodik. Jak jsem již zmínil výše, v kapitole Materiál a metody není vysvětlená technika využívající barvení MFN1 a tudíž není jasné, zda autorka předpokládala podobný výstup z obou metodik. Pokud ano, jak si autorka tento rozdíl vysvětluje? Poslední poznámku mám k interpretaci dat na základě grafu 3 a

Přírodovědecká fakulta UK

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.



obrázku 5. Z grafu vyplývá, že rozdíl v intenzitě fluorescence u kontrolních oocytů a oocytů ošetřených 300 pM BPS je nesignifikantní. Pokud se ale podívám na obrázek 5, je právě mezi těmito skupinami rozdíl nejvíce patrný. Jak si autorka tuto diskrepanci vysvětluje? Opět se odkazují na mou poznámku výše, a to jakým způsobem byly vybírány oocyty pro barvení mitochondrií.

Kapitola diskuze je vedená na osmi stranách a autorka zde velmi dobře porovnává získané výsledky s dostupnou literaturou. V první větě je napsáno, že práce měla za cíl porovnat vliv BPS na vybrané proteiny meiotického zrání prasečích oocytů. Jaké proteiny má autorka na mysli. Na straně 47 je pak uvedeno že dalším cílem bylo zjištění exprese mitochondrií detekcí membránového potenciálu po kultivaci v různých koncentracích BPS. Jakou expresi má autorka na mysli? Závěrečná kapitola shrnuje dosažené výsledky. Po formální stránce je práce velmi kvalitní. V textu se vyskytuje minimum překlepů, a kromě obrázku 4, který není citován v textu a dvou citací s chybně uvedenými indexy a a b je práce po této stránce velmi pečlivě sepsána a důkladně zkontrolována. Jak jsem již uvedl výše, výhrady má k interpretaci některých získaných dat, zvláště pokud v práci chybí jasně definovaný postup selekce oocytů a přípravy vzorku pro barvení tubulinu a detekci viabilních mitochondrií. Přes tyto výtky se jedná o kvalitní diplomovou práci, kterou velmi rád doporučuji k obhajobě a hodnotím stupněm velmi dobře.

K práci mám následující dotazy:

- 1) Proč by mělo být důležité různé načasování GVBD u různých živočišných druhů z pohledu negativního dopadu BPS na maturaci oocytů?
- 2) Jak konkrétně může být kináza p90rsk nebo další komponenty signální dráhy cílem inhibice BPS, vezmeme-li v úvahu kompetici endogenních disruptorů se steroidními hormony?
- 3) Nemohla by se rozdílná intenzita a lokalizace signálu po barvení Mitotrackerem dát vysvětlit např. různě silným přitlačením trojrozměrného prasečího oocytu mezi podložní a krycí sklíčko,

Přírodovědecká fakulta UK

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

zvláště pokud vezmeme v úvahu velké zastoupení lipidických granulí, které znesnadňují veškeré fluorescenční experimenty na rozdíl např. od myších oocytů, které jsou téměř průhledné?

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.

Přírodovědecká fakulta UK

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.

adresa: Viničná 7, 128 43 Praha 2

telefon: 221 951 773

e-mail: vkrylov@natur.cuni.cz

ičo: 00216208, **dič:** CZ00216208
