



## Oponentský posudek

k diplomové práci Bc. Kristýny Vackové s názvem: „Využití metody interspecifické ICSI pro hodnocení kvality uchovávaného biologického materiálu genetických zdrojů“

*Irena Jeníčková, Ústav molekulární genetiky, v.v.i., České centrum pro fenogenomiku,  
irena.jenickova@img.cas.cz*

### Zhodnocení splnění cílů a odborného přínosu

Diplomová práce Kristýny Vackové si klade za cíl zhodnotit kvalitu zamraženého spermatu u ohroženého chovatelského druhu (kozy bílé krátkosrsté) pomocí metody interspecifické intracytoplasmatické injekce (ilCSI). Práce dobře ukazuje jednu z možných variant, jak hodnotit kvalitu uchovávaného genetického materiálu. Téma práce je aktuální a odborně přínosné. Navíc metoda ICSI je technicky náročná a dle získaných dat ji studenta dobře zvládla. Cíle práce byly bez pochyby splněny.

### Obecné zhodnocení práce s literaturou, užitých metod a interpretace výsledků

Práce je vhodně strukturovaná a psána odborným jazykem na vysoké úrovni. Text je srozumitelný, pro čtenáře pochopitelný a je zřejmé, že autorka se v problematice dobře orientuje. To ostatně potvrzuje i množství citované literatury, ze které autorka čerpala. Použité metody jsou velice dobře popsány, doplněné ilustrativními obrázky. Výsledky jsou srozumitelně interpretovány, doplněny tabulkami a reprezentativními obrázky. V diskuzi autorka popisuje výhody a nevýhody zvolené metody analýzy genetického materiálu. Své výsledky porovnává s výsledky jiných autorů a snaží se o vysvětlení rozdílů. V závěru diskuze stručně navrhuje, jak by bylo vhodné analýzu kvality genetického materiálu spermie ještě doplnit. Diskuze svým rozsahem a obsahem vypovídá o schopnosti autorky zamýšlet se nad řešenou problematikou a analyzovat ji ve vztahu k odborné literatuře.

### Odborné a formální připomínky

- Metoda intracytoplasmatické injekce spermie (tzv. ICSI) u myší je technicky náročná metoda, vyžadující praktický „trénink“ a je to metoda náročná i na přípravu používaného materiálu (manipulační kapiláry). Autorka tuto techniku zvládla v rámci magisterského studia, což je nepochybně hodnotné a svědčí to o zručnosti a pracovitosti studentky. Náročnost metody však limituje studentku v tom, aby práce byla metodicky bohatší a umožnila tak problematiku analyzovat v širším kontextu. Pro lepší zhodnocení výsledků by bylo dobré použít více přístupů k hodnocení kvality zamraženého materiálu (např. změřit motilitu spermií, kvalitu kapacity apod.).
- Jak autorka sama v textu uvádí, u metody ICSI, především s použitím pieza, nelze vyloučit negativní vliv na poškození DNA spermie – jako kontrola by zde bylo vhodné mít k dispozici materiál metodou nedotčený (např. zygoty kozy) nebo spermie dekonzenzované in vitro.



- Poznámka k citaci na str. 28, odstavec 4.2.2 – zde není vhodně zvolena citace na hormonální stimulaci myši. Bylo by vhodné např. zmínit, že je to rutinně využívaná metoda v laboratoři s citací na primární zdroj (může být protokol z vydané publikace „Manipulating the Mouse Embryo“, či publikace skutečně prvních autorů stimulačního protokolu). Uvedená citace Rychtářová a spol. hormonální stimulaci pouze využívá ve své práci jako jednu z metod, samotná stimulace není předmětem publikace.
- Kvalita spermatu se může lišit i mezi jedinci. Pro lepší zhodnocení a závěr ohledně toho, který ze způsobů mražení kozlího spermatu má větší či menší vliv na poškození DNA spermie by bylo vhodné mít k dispozici sperma jednotlivých samců ve všech kategoriích (čerstvé, zamražené v AndroMed a BullXCell). V případě malého počtu samců k dispozici pak hodnotit každého jedince zvlášť.
- Pokud porovnávám intenzitu fluorescence mezi snímky, je potřeba všechny snímky fotit na stejný expoziční čas – autorka tento parametr nezmiňuje, bylo by vhodné ho zmínit a uvést použitý expoziční čas.

## Dotazy

- Uvedené způsoby zamražení kozlího spermatu jsou způsoby v biotechnologii kozy běžně využívané, anebo sperma bylo zamrazeno za výzkumnými účely? Pokud jsou běžné, je nějaký rozdíl v úspěšnosti inseminace?
- Jak je na tom technologie asistované reprodukce koz – lze získat viabilní embrya koz pomocí oplození „*in vitro*“ či přímo metodou ICSI?
- Kde jsou hranice použití interspecifického ICSI – u kterých druhů (v rámci např. zoologické třídy) se předpokládá, že lze kvalitu analyzovat obdobně jako kozlí sperma (tzn. spermie dekondují v myším oocyty), a u kterých již ne? Jak jsou na tom např. ptáci?
- Metoda interspecifického ICSI využívá myši oocyty, které se získávají ze stimulovaných zvířat po usmrcení. V rámci koncepce „3R“ na ochranu laboratorních zvířat se vědecká komunita snaží minimalizovat spotřebu laboratorních zvířat. Napadá autorku jiný zdroj biologického materiálu, který by mohl nahradit oocyty myši? Jaké jsou jeho výhody a nevýhody?
- Zygota je do nějaké míry schopna poškozenou DNA opravit. Napadá autorku příklad, kde poškození DNA v zygotě cíleně vyvoláváme a reparační schopnosti zygoty využíváme k dalším účelům?

## Shrnutí a závěr

Práci Kristýny Vackové hodnotím jako velmi kvalitní a dobře zpracovanou. Autorka zvládla velice náročnou techniku iICSI a podařilo se jí získat dostatek dat k základnímu vyhodnocení kvality zamraženého materiálu. Výsledky jsou v práci srozumitelně popsány a interpretovány, proto práci doporučuji k obhajobě.