



UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra buněčné biologie

Ing. RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.  
Viničná 7  
128 44 Praha 2

tel: 420 2 21951773  
fax: 420 2 21951758  
e – mail: vkrylov@natur.cuni.cz

**Školitelský posudek na diplomovou práci Martiny Černé "Chemická enukleace savčích oocytů"**

Martina Černá svou diplomovou práci vypracovala ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v.v.i., na oddělení Biologie reprodukce. Cílem bylo nalézt optimální podmínky v rámci chemické enukleace prasečích oocytů. Příprava takto vzniklých cytoplastů je klíčová pro následný přenos somatického jádra a produkci buď klonovaných jedinců nebo embryonálních kmenových buněk 'šitých na míru' dárci somatické buňky. Vzhledem k tomu, že prase je po fyziologické stránce velmi podobné člověku, je tento modelový organismus nanejvýš zajímavý z pohledu xenotransplantací či získání obecných poznatků uplatnitelných v transplantační medicíně. Získávání cytoplastů je v současné době převážně prováděno obarvením genetického materiálu oocytu pomocí fluorescenčních barviček (např. Hoechst) s následným odsátím chromozómů a prvního pólového tělíška. Další možností je tzv. chemická enukleace, kdy pomocí drog působících na mikrotubulární a aktinový cytoskelet je genetický materiál vytlačen na okraj oocytu a takto vzniklý výstupek je po té buď odříznut tenkou skleněnou kapilárou nebo odsat pomocí mikromanipulátoru. Výhodou je vynechání barvení Hoechstem, který může způsobit poškození DNA. Na druhou stranu je poměrně drasticky ovlivněn cytoskelet a potencionálně další vývoj embrya po nukleotransferu. Úkolem Martiny bylo nalézt vhodnou kombinaci výše zmíněných drog, včetně jejich koncentrací, získat cytoplasty a ověřit distribuci obou typů cytoskeletálního aparátu. V neposlední řadě bylo cílem také zjistit rozložení mitochondrií po fúzi enukleovaného a normálního oocytu.

Martina se svého úkolu zhostila velmi dobře. Je nutné si uvědomit, že veškeré techniky, které vedou k přípravě cytoplastů jsou náročné jak na čas, tak i na zručnost. Jejich výčet sahá od izolace prasečích oocytů, přes imunofluorescence až po mikromanipulace umožňující odstranění oocytárního genetického materiálu. Z pohledu vlastní chemické

enukleace pak stanovila optimální koncentrace a doby působení demecolcinu a cytochalasinu B a připravila celou řadu cytoplastů a následně i fúzantů s normálními oocyty, u kterých zjišťovala distribuci mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu. Navíc se věnovala i distribuci mitochondrií. Poznatky zjištěné v rámci této diplomové práce pak posloužily pro přípravu klonovaného prasečího embrya do stádia blastocysty. Tento fakt jasně ukazuje, že postup přípravy cytoplastů, jak jej Martina navrhla, je kompatibilní s následným embryonálním vývojem. Na tomto místě bych velmi rád poděkoval mé kolegyni Mgr. Ireně Barnetové z VÚŽV, v.v.i., která se Martině věnovala v rámci přípravy experimentů a bez jejíž pomoci by řada pokusů nebyla vůbec provedena.

Asi největším nedostatkem diplomové práce, který si myslím byl nakonec odstraněn, byl způsob jejího psaní, který vyžadoval poměrně značné korekce. Tento fakt však nic nemění na tom, že předkládaná práce je podle mého názoru na vysoké úrovni a Martina jasně prokázala, že je schopná provádět i ty nejnáročnější experimenty a získaná data utřídit a kriticky zhodnotit. Co se hodnocení týče, navrhuji známku výborně.

V Praze dne 11.9.2009

Ing. RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.

