



**KATEDRA ZOOLOGIE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Viničná 7, 128 44 Praha 2

---

---

**Posudek školitelky na diplomovou práci Magdy Tejnické na téma:**

**„Vliv estrogenních hormonů na kapacitaci a akrozomální reakci myších spermií *in vitro*“**

Cílem diplomové práce Magdy Tejnické bylo sledovat vliv estrogenních hormonů 17-beta-estradiolu, estronu, estriolu a syntetického 17-alfa-ethynylestradiolu na kapacitaci a akrozomální reakci myších spermií kmene BALB/c *in vitro*. Estrogeny byly ředěny etanolem do pěti různých koncentrací, a to 0.02; 0.2; 2; 20 a 200 ng/ml (0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1μM). Z čehož nejnižší dvě koncentrace estrogenů 0,02 ng/ml a 0,2 ng/ml jsou fyziologické koncentrace těchto hormonů v plazmě či rete testis dospělých myší, následující dvě koncentrace 2 ng/ml a 20 ng/ml jsou fyziologické u myši v místě ovulace a poslední námi použitá koncentrace 200 ng/ml je tudíž 10-ti násobek fyziologické ovulační koncentrace a sloužila jako referenční hodnota, v případě, že by koncentrace fyziologické nenastolily žádnou odpověď.

Estrogeny jsou zásadní pro správný průběh spermatogeneze, jakož i pro získání fertilizační schopnosti epididymálních spermií. Spermatické buňky ve stádiích spermatogeneze, jakož i somatické buňky testikulární tkáně obsahují na svém povrchu estrogenní receptory, tyto receptory jsou detekovány i na spermiích po dokončené spermatelióze. Je prokázáno, že estrogenní receptory alfa i beta, které se dříve věřilo, že patří pouze do rodiny jaderných receptorů, jsou translokovány do plazmatické membrány a tudíž jsou schopny reagovat negenomovou rychlou odpovědí na koncentrace jednotlivých estrogenních hormonů. Samozřejmě je možná účast i na receptory nezávislé cesty vstupu estrogenních hormonu do spermatické buňky. Pouze správná hladina je schopna navodit fyziologický průběh spermatogeneze a rovněž správnou maturaci epididymálních spermií jakož i následnou kapacitaci. Z mnohých důvodů je nejzajímavější 17-beta-estradiol. Tento hormon je schopný exkluzivně regulovat průnik jednotlivých iontů dovnitř či vně spermatické buňky a tím stimulovat či inhibovat kapacitační dráhu cAMP a PKA. Bohužel jeho koncentrace, jakož i koncentrace ostatních estrogenních hormonů v životním prostředí vzrůstá a tyto hormony jsou přítomny v pitné vodě v desítkách až stovkách nano molů a nejsou odstraňovány při čištění

vodních zdrojů. Tímto mohou estrogény působit na mnohé organizmy na různých úrovních regulace, včetně spermatogeneze a kapacitace savců.

Kapacitace je aktivním stádiem přípravy spermie na oplození, předchází akrozomální reakci a je pro získání schopnosti splnutí gamet zásadní. Mezi kapacitační procesy se mimo jiné řadí nárůst tyrozinové fosforylace proteinů v hlavičce spermie a s tím související změny cytoskeletu, které jsou nezbytné pro následnou *zona pellucida* indukovanou akrozomální reakci. Právě na základě tyrozinové fosforylace je možné posoudit průběh kapacitace a připravenost spermie k oplození za experimentálních podmínek *in vitro*.

Úkolem studentky v této diplomové práci bylo hodnotit vliv daných estrogenních hormonů na míru tyrozinové fosforylace v hlavičce spermií resp. v lyzátu celé spermie při stěžejních časech kapacitace *in vitro*, a to jak pod fluorescenčním mikroskopem, tak pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Paralelně byl rovněž hodnocen pomocí imunofluorescenčního značení stav akrozómu po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci u kapacitovaných spermií v jednotlivých časech. Studentka se v rámci svojí DP měla možnost seznámit s problematikou stavby a funkce savčí spermie, molekulárními mechanismy kapacitace a akrozomální reakce, hormonální regulací spermatogeneze, jakož i funkcí a mechanismem působení estrogenních hormonů v samčí reprodukci, s jejich transportním systémem a funkcí jejich specifických receptorů.

Studentka Magda Tejnická předkládá přepracovanou verzi svojí diplomové práce, do které zapracovala vznesené připomínky a kriticky se snažila zhodnotit svoje získané výsledky.

Původní značně rozsáhlý úvod byl zkrácen ze 40 na 28 stran a je nyní výhradně zaměřen na problematiku vztahující se k tématu DP. Kapitola materiál a metody kromě malých detailů zůstala v původní podobě a odráží širokou paletu metod, spojených s metodikou *in vitro* kapacitace spermií a následnou indukci akrozomální reakce, včetně jejich izolace z distálního regionu *cauda epididymis*. Kapitola je doplněna fotodokumentací některých postupů.

Kapitola výsledky byla studentkou přepracována od základu, původní získaná data byla zpřehledněna a rozsáhlé popisy byly nahrazeny tabulkami, které mají vypovídací hodnotu. Výsledky byly rovněž propojeny a logicky seřazeny. Rovněž byly vynechány nesmyslně se opakující statě popisující metodiku přípravy, která je popsána v příslušné kapitole materiál a metody. Samozřejmě stále platí můj původní názor, že by bylo třeba mnohé experimenty opakovat, data doplnit a případně expandovat dále při výběru detekčních metod a hodnocení. Nicméně bylo dohodnuto s předsedou zkušební komise, Doc. RNDr. Petrem Folkem, CSc., že pro přepracování DP nepřistoupíme k získávání nových primárních dat, ale výsledky budou přepracovány za použití dat původních.

Kapitola diskuse byla rovněž napsaná zcela nově, nyní z původních nástřelových 3 stran vzniklo 9 plných stran textu. Domnívám se, že v diskusi se Magda překonala a upřímně se snažila o kvalitní diskusi tématu, kritické zhodnocení a diskusi získaných výsledku včetně propojení jednotlivých částí v jeden celek, který působí uceleně. Dle mého názoru diskuse odráží hlubší pochopení problematiky a schopnost studentky dát věci do souvislostí.

V rámci celého projektu byla ve skupině práce zopakována a byla získána nová data, z jejichž statistického zpracování ve stručnosti vyplývá, že estrogenní hormony při kapacitaci *in vitro* mají na myši spermie prokapacitační vliv, tudíž urychlují oproti kontrole tyrozinovou fosforylaci specifických proteinů. Tento efekt byl nejvíce patrný při čase kapacitace 30 a 60 min, téměř u všech experimentálních koncentrací přirozených estrogenních hormonů a přetrvával po dobu celé kapacitace u syntetického 17-alfa-ethynylestradiolu. U kontrolních vzorků dosahuje fyziologicky tyrozinová fosforylace maxima v čase 90 min, kdy i myší spermie získávají lineární hyperaktivační trajektorii pohybu a jsou připraveny k oplození. Naopak právě u spermií kapacitovaných s estrogenními hormony dochází k nárůstu tyrozinové fosforylaci o hodinu dříve. Zajímavé je, že opakované hodnocení akrozomální reakce ovšem potvrzuje, že spermie experimentálních skupin mají statisticky významně snížené procento spermií schopných projít kalcium ionoforem indukovanou AR. Z toho se dá usuzovat, že správné načasování jednotlivých po sobě jdoucích dějů, jako je tyrozinová fosforylace a na ní závislá aktinová polymerizace s následnou prudkou depolymerací při akrozomální reakci neběží shodně, pokud jsou tyto děje urychleny např. přítomností vyššího množství estrogenních hormonů. V budoucnu se bude pokračovat v experimentech zahrnujících *in vitro* oplození oocytů a případně *in vivo* studií. Rovněž byla částečně zodpovězena otázka zda epididymální spermie nesou na svém povrchu vázaný estradiol při jejich vstupu do kapacitačního procesu. Bohužel získávání těchto výsledků se Magda neúčastnila.

Na závěr při hodnocení studentky by mělo zaznít, že přes úskalí čtyř let, které provázelo vypracování této DP, Magda při jejím přepracování vynaložila dle mého názoru značné úsilí, což se očividně odráží v této předložené verzi. Magda nakonec prokázala, že je schopná a dostatečně motivovaná k dokončení studia. Věřím, že Magda přepracováním práce získala dostatečný vhled do problematiky a její pochopení.

Předložená přepracovaná práce Magdy Tejnické splňuje dle mého názoru všechny formální požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Kateřina Hortová

V Praze, 31. 8. 2011