

Vliv ubiquitinace spermií v rámci časného embryonálního vývoje u prasete

Autor: Bc. Aleš Petelák

Školitel: RNDr. Ing. Vladimír Krylov Ph.D.

Předložená diplomová práce řeší velmi aktuální téma asistované reprodukce hospodářských zvířat a zároveň odpovídá na některé zajímavé otázky spojené s molekulárními mechanismy oplození a předimplantačního embryonálního vývoje savců. Jako modelový organismus je zvoleno prase. Výběr modelu na jedné straně zkomplikoval autorovi práci, protože oplození prasečího ovocytu in vitro a techniky asistované reprodukce u tohoto druhu podléhají celé řadě vlivů, které lze jen obtížně udržet pod kontrolou. Mnohé z těchto faktorů nejsou dosud důkladněji prostudovány. Prase je z hlediska reprodukční biologie v mnoha ohledech výjimečný druh, a tak je velmi problematické přijímání výsledků a zkušeností získaných studiem jiných druhů savců. Na druhé straně však volba modelu dovolila autorovi dosáhnout některých prioritních výsledků. Ty jsou významné nejen s ohledem na hospodářský význam prasete, ale také s ohledem na rostoucí význam prasete jako modelu v biomedicině.

V literárním přehledu autor shrnul velmi přehledně stávající stav poznání role proteasomu v oplození a raném embryonálním vývoji savců. Prokázal velmi dobrou orientaci ve vědecké literatuře a zároveň i schopnost postihnout nejdůležitější informace a utřídit je.

Po metodické stránce je třeba opravdu vyzvednout fakt, že autor zvládl metodu intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI) u prasete. Technika je sama o sobě velmi náročná. V případě prasečích ovocytů a spermií je její zvládnutí opravdu složité a vyžaduje kromě velké dávky trpělivosti a silné vůle i určitý talent. Autorovi se zjevně všech těchto vlastností dostává. Metoda ICSI byla využita pro studium role proteasomu v procesu oplození a předimplantačního vývoje embryí, což je opět zapotřebí vysoce ocenit, protože jde o přístup originální.

Kvalitu metodického přístupu nesnižují drobné překlepy, jako např. tvrzení, že pro kultivaci bylo použito 500 ml média ve čtyřjamkové destičce pro in vitro kultury (str. 38). Na téže straně je uvedeno, že na konci zrání bylo po odstranění kumulárních buněk možno pozorovat

druhé pólové tělísko, což odpovídá stádiu metafáze II meiotického dělení. To je zjevně rovněž nedopatření.

Použité statistické metody jsou uvedeny při prezentaci výsledků. Ve struktuře vědeckých studií bývá obvyklejší uvedení základních charakteristik statistického hodnocení v závěru kapitoly Materiál a metody.

Výsledky jsou prezentovány jasně, přehledně, srozumitelně a jsou adekvátně statisticky vyhodnoceny.

V kapitole Diskuse jsou výsledky konfrontovány s publikovanými studiemi, autor interpretuje svá pozorování, nabízí hypotézy pro další testování.

K autorovi práce mám následující dotazy:

- 1) Jaká je posloupnost vylučování pólových tělísek při meiotickém zrání savčího ovocyty?
- 2) V experimentech nebyl prokázán vliv inhibitoru proteasomu MG132 na časnou dekonzaci spermie po ICSI, což autor interpretuje tak, že proteasom nemá na tento časný proces vliv. Inhibitor MG132 však byl přidán do kultivačního média až po ICSI. Lze předpokládat, že penetrace inhibitoru do buňky není okamžitá a také samotná inhibice proteasomu si vyžádá nějaký čas. Proč nebyly oocyty vystaveny účinku MG132 krátce před ICSI a proč nebyl inhibitor MG132 přidán i do manipulačního média během ICSI? Nemohlo se stát, že k rozpoznání spermie došlo velmi rychle procesem závislým na funkčním proteasomu a že tento proces nebyl inhibitorem včas blokován? Autor sám na str. 53 připouští, že opožděný nástup inhibice proteasomu mohl být příčinou tvorby prvojader u některých oocytů kultivovaných po ICSI v přítomnosti inhibitoru MG132.
- 3) V kapitole 5.1.2.1 autor uvádí, že u dozrálých prasečích ovocytů pozoroval po kultivaci dalších 24 hodin rýhování u 12 % ovocytů. Spontánní aktivace ovocytů se primárně projeví tvorbou prvojader či porvojádra. Sledoval autor tento parametr a jaký podíl ovocytů vykazoval prvojádro?
- 4) V kapitole 5.2.4 je konstatován rozdíl na hranici statistické významnosti ve vývoji embryí do stádia moruly či blastocytu po předchozí časově omezené inhibici proteasomu. Autor plánuje další doplňující experimenty. Počítá i se zevrubnějším hodnocením embryí, např. s určením celkového počtu buněk embrya, počtu buněk embryblastu u blastocysty apod.?

Diplomovou práci Bc. Aleše Peteláka „Vliv ubiquitinace spermií v rámci časného embryonálního vývoje u prasete“ hodnotím známkou „výborně“.

V Uhřetěvsi 13. 9. 2011

Prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.