

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI KAROLINY BÍLKOVÉ “VLIV SUPLEMENTACE KAROTENOIDY A OXIDAČNÍHO STRESU NA MORFOLOGII, KVALITU SPERMIÍ A SPERMATOGENEZI U ZEBŘIČKY PESTRÉ“

Autorka vypracovala svou diplomovou práci pod vedením Doc. Mgr. Tomáše Albrechta, PhD a RNDr. Kateřiny Hortové, PhD na Přírodovědecké fakultě University Karlovy, na katedře zoologie a v Biotechnologickém ústavu AV ČR na oddělení reprodukční biologie.

Hypotéza „phenotype-linked fertility“ předpokládá, že jak sekundární pohlavní znaky samců, tak jejich spermie jsou fenotypově plastické a mohou být ovlivňovány prostředím. Jedním z faktorů ovlivňujících jejich fenotyp může být oxidační stres a schopnost organismu jeho vliv eliminovat. V diplomové práci Karoliny Bílkové byli samci zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) z domestikované populace blízké divokým zebřičkám dlouhodobě vystaveni působení herbicidu diquat, který má zvyšovat oxidační stres a karotenoidu luteinu, který by mohl mít antioxidační funkci.

V literární části autorka uvedla současné znalosti o mechanismech ovlivňujících reprodukci živočichů se zaměřením na ptáky. Popisuje spermatogenezi, morfologii ptačí spermie a varlat, rychlost pohybu a životnost spermie, reprodukční cyklus ptáků, tubulin, acetylaci tubulinu, spermie a oxidační stres, diquat dibromid a jeho toxicitu, charakteristiku karotenoidů a vybraný modelový druh samečka zebřičky pestré. Literární přehled je doplněn dvěma barevnými obrázky a poskytuje velmi dobrý současný pohled na danou problematiku s 214 citacemi.

Experimentální část práce je provedena současnými moderními metodami, jejichž výběr odpovídá studovanému problému. Jejich praktické zvládnutí svědčí o dobrých experimentálních schopnostech autorky. Jako příklad metodik uvádím morfometrii ptačích spermií, analýzu acetylaci α -tubulinu, přípravu histologických preparátů varlat a jejich morfometrickou analýzu i statistické metody.

V souladu s cíli přinesla diplomová práce následující nejdůležitější poznatky:

1. Oxidační stres byl zebřičkám zvyšován pomocí herbicidu diquat, k suplementaci karotenoidy byl použit lutein. Ani jedna z těchto látek, ani jejich kombinace neměly vliv na morfologii spermií, na rychlost pohybu spermií, nebo podíl abnormálních spermií v ejakulátu.
2. Působení diquat zapříčinilo ve varlatech snížení průměru semenných kanálků a nárůst výšky epitelu. V kombinaci s luteinem bylo snížení průměru semenných kanálků největší, lutein zabránil nárůstu výšky epitelu. Patologické změny ve tkáni varlete nesouvisí s produkcí morfologicky poškozených spermií. U spermií domestikovaných zebřiček nelze vyloučit poškození na molekulární úrovni.
3. Analýza acetylovaného α -tubulinu ukázala, že diquat u spermií zebřiček snižuje intenzitu signálu v bičiku, intenzita ale nesouvisí s rychlostí pohybu spermií zebřiček. Při podávání diquat v kombinaci s luteinem zebřičkám došlo k nárůstu počtu spermií se silnějším signálem a poměry spermií se slabým a silnějším signálem se vyrovnaly.
4. Karotenoidu luteinu nelze přisoudit, zda má jednoznačně pozitivní, negativní či neutrální účinek na spermatogenezi u zebřiček. Při snížení výšky semenotvorného epitelu a zvýšení počtu spermií se silnějším signálem acetylovaného α -tubulinu při podávání diquat s luteinem jde asi o pozitivní, antioxidační účinek luteinu. Karotenoidy mají na spermatogenezi zebřiček pozitivní nebo neutrální vliv, při vyšších hodnotách oxidačního stresu udržují normální průběh spermatogeneze.

Vytčené cíle byly splněny a získané výsledky uvedené v šesti tabulkách, dvou grafech a statistika výsledků v deseti přílohách jsou v práci rozebírány a diskutovány.

Diplomová práce je přehledná a logicky seřazená, s nepatrným počtem překlepů.

K diplomové práci mám dotazy:

1. Ve vaší studii nebyla koncentrace diquatů tak vysoká, aby způsobila kromě morfometrických změn ve tkáni varlat selhání spermatogeneze, ale jak uvádíte, nelze vyloučit poškození RNA a DNA spermií na molekulární úrovni. Jakým mechanismem podporuje diquat vznik superoxidu?
2. Měřili jste-ověřovali- zda diquat ve vašich experimentech opravdu zvyšoval hladinu ROS? Existuje práce, kde to bylo změřeno a potvrzeno za podmínek, které jste použili ve vašich pokusech?
3. V jakém poměru je množství diquatů podávané ptákům v experimentech k množství diquatů, které se může dostat do těla ptáků v přírodě? Jak se liší jednotlivé druhy ptáků mezi sebou v citlivosti na diquat?
4. Jak píšete důležitou transferázou u savců je tubulin acetyltransferáza TAT1. Přítomnost této acetyltransferázy u savců zásadně ovlivňuje reprodukční úspěch samců. Chcete sledovat úlohu TAT1 i u ptáků?

Diplomová práce plně prokazuje schopnost Karoliny Bílkové vyšetřit a prozkoumat předloženou problematiku, splňuje zadané úkoly. Výsledky dosažené Karolinou Bílkovou rozšiřují poznatky Tomáška et al., 2017 o účinku oxidačního stresu a karotenoidů na spermatogenezi u zebřičky pestré a přispívají k rozvoji biochemického a biologického výzkumu v oblasti zoologie.

Hodnotím ji jako výbornou.

V Praze dne 23. května 2018

Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i
Laboratoř reprodukční biologie