

## Oponentský posudek na magisterskou práci

---

### **Bc. Monika Bláhová (2019) Vývoj a optimalizace přípravy řezových preparátů pulců *X. tropicalis* pro studium migračního a diferenciačního potenciálu testikulárních kmenových buněk**

#### **Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu**

Autorka diplomové práce v první části popisuje migrační a diferenciační potenciál transplantovaných buněk, získaných *in vitro* kultivací testikulárních kmenových buněk xenopa v laboratoři vývojové biologie. U těchto buněk byl prokázán migrační potenciál a diferenciace do Sertoliho buněk pomocí specifických protilátek. V předložené práci chybí informace o expresi těchto specifických markerů v buňkách před transplantací.

Ve druhé části autorka optimalizuje a porovnává základní typy přípravy histologických preparátů. Konkrétně porovnává parafinové řezy, cryorezy a vibratomové řezy. Tato část práce je spíše praktická a výsledky této práce jsou přínosné nejen pro laboratoř vývojové biologie, kde byla práce provedena, ale i pro další pracoviště, které při svém výzkumu využijí metody histologie pulců detekující látky citlivé na degradaci. Jako nevhodnější byla vyhodnocena nejmodernější metoda přípravy preparátů pomocí vibratomu.

#### **Formální kvalita předloženého spisu**

Po formální stránce jsem nenalezl žádné závažné pochybení. Značná část práce je publikovaná v příloženém článku Tlapáková a kol 2016 a řádně odcitována. Článek Blackiston et al 2010 je v textu s překlepem Blackinston.

Podle mého názoru by pořadí cílů a výsledků mělo být opačné. Prvně se prováděla optimalizace histologické metody, která se pak následně využila pro sledování transplantovaných buněk.

Autorka střídavě využívá zkratky a plné názvy. Např. Sertoliho buňky (SeC) nebo kmenové buňky (SC), mají zkratky uvedeny v seznamu použitých zkratek, tato zkratka je rovněž vysvětlena v textu (v některých případech opakovaně). Dále jsou ovšem tyto zkratky používány náhodně.

#### **Jazyk**

Bez závažných prohřešků proti gramatice, bez formulačních problémů.

Po důkladném přezkoumání práce jsem našel pouze tyto drobné vady:

Na str. 8 navrhuji přidat text uvedený v závorce: U vyšších obratlovců je stanoveno pohlaví na základě genů, které (daný jedinec) získal od svých rodičů, jedná se tedy o genetickou determinaci (Piprek 2010, Olmstead et al. 2010).

Str. 8: (se dvěma sadami genů) navrhuji změnit na gramaticky i biologicky přesnější (se dvěma sadami chromozomů).

Str 32: překlep ihned

Str 51: překlep mesesnychymální

#### **Hodnocení částí předkládaného spisu**

##### **1) Literární přehled**

Literární přehled je nezdařilejší částí této diplomové práce. Autorka zde výstižně popisuje typy kmenových buněk, strukturu varlete, typy buněk varlete. Dále zde popisuje modelový organismus (*Xenopa*) a druhy příprav histologických preparátů.

Přestože *Xenopus* je modelový organismus a jeho biologie je dobře popsána, tak se autorka často uchyluje k popisu savčích modelů, které se v mnohém liší. Bohužel v textu často chybí informace o přechodu mezi různými živočišnými modely. Příkladem je např. část 3.2.2. kde se můžeme dočíst, že *Insl3* je klíčový pro sestup varlat, což zřejmě neplatí pro obojživelníky. Obecně mi zde chybí informace o obojživelnících. Determinace a diferenciaci u savců je zde dobře popsána, ale čtenáře této diplomové práce bude zřejmě více zajímat, jak probíhá u *Xenopa*.

V tabulce 1 není jasné podle čeho autor členil řádky.

3.2.2.4. Tvzení, že zárodečná plazma je rozeznatelná i pod světelným mikroskopem, je podle mého názoru zavádějící. Zárodečná plazma je viditelná až po specifickém barvení.

3.4. Tato kapitola mohla být rozdělena do konkrétních podkapitol (parafinové řezy, kryorezy, vibratom).

Autorka by měla rozlišovat fixaci mrazem a zamrazování (kryoprezervace), kde je vyžadováno přežití organismu po jeho rozmrazení. Hovořit o životaschopnosti buněk po rozmrazení, které jsou určené k histologickému zpracování není relevantní.

Není správné tvrzení, že se během vitrifikace nepoužívají kryoprotektanty. Ty je nutné přidávat i v tomto případě (včetně uvedené studie), neboť ke krystalizaci dochází i během rozmrazování.

3.4. str 18: „Preparáty zpracované pomocí kryosekce jsou vhodné pro rychlou diagnostiku. Výhodou je, že se odebraná tkáň nemusí fixovat.“ Toto tvrzení je zavádějící a odporuje si s vlastními výsledky (viz 6.5 a 7.2.2), kde sama autorka fixaci používá. Obecně je fixování preparátu vhodné až nutné pro každou z uvedených technik.

## 2) Materiál a metody

5.1. Zaujala mne zde věta „Pravidelná údržba nádob a krmení se uskutečňuje každý pracovní den.“ Znamená to, že o víkendech a během delšího období svátků (např. Vánoce) není o zvířata nijak postaráno?

6.2. „Spermie se za krátko navázaly na oocyty.“ Jak toto bylo pozorováno?

„Vzápětí byly oocyty převedeny na misku s agarózou, kde proběhl výběr správně se vyvíjejících zygot a časných embryí.“ Zygota je časná embryo.

Nebylo vhodné vytvoření nové samostatné podkapitoly 6.5.2.1, která by měla být součástí kapitoly 6.5.2. Současné dělení je matoucí.

6.6. Není uvedeno, jak probíhala deparafinace. Vzhledem k popisovaným problémům s vypadáváním vzorku považuji tuto informaci za důležitou.

## 3) Výsledky

Kapitoly Metody a Výsledky obsahují řadu stejných informací a některé informace jsou



umístěny nevhodně. Např. informace o stádiích při niž byla embrya fixována měla být v metodách, a nikoliv ve výsledcích.

Obrázek 6. Bylo by vhodnější použít stejnou pseudobarvu (červenou) pro složenou fotku 6c, jako je na fotce z fluorescence 6B. Takto, s použitím různého zobrazení signálu, jsou fotky nepřehledné.

Obr. 9: Konfokální mikroskop není na seznamu použitých přístrojů

#### 4) Diskuse

8.2. Autorka diskutuje vhodnost použití parafinových řezů pro lokalizaci RNA. Tato práce se ovšem zabývá imunoznačením, tedy lokalizací proteinů. Tato část diskuze je tedy podle mého názoru irelevantní.

„Matsui et al. (2015) se zaměřili ve své studii na testování 8 různých typů speciálně ošetřených podložních sklíček tak, aby tkáň při imunohistochemickém barvení nebyla odplavena, ale zároveň aby bylo možné řezy z těchto podložních sklíček po barvení přesunout do epoxidové pryskyřice.“ Chybí zde vysvětlení, jaký byl důvod přesunu řezů do epoxidové pryskyřice a jakou to má souvislost s tímto experimentem.

---

#### Celkové hodnocení

**Přestože jsem v předložené diplomové práci odhalil řadu drobných nedostatků, považuji práci za úspěšnou a přínosnou.**

**Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím jí jako velmi dobrou.**

---

#### Otázky k diskuzi:

Může autorka vysvětlit co znamená, když jsou SSC „unipotentní s totipotentním charakterem“.  
(viz str. 7)

Jaký byl důvod dehydratace a následné rehydratace vzorku pro vibratom. Byl vyzkoušen postup přípravy vzorku bez dehydratace? (viz 6.5.3.)

Jaký byl důvod použití sacharózy a želatiny při přípravě parafinových řezů? (viz 7.2.1)

Proč byla exprese vimentinu pozorována pouze u transplantovaných buněk, a nikoliv v endogenních buňkách recipienta? (viz obr. 10)

Autorka ve výsledcích zmínila, že transplantovaní pulci měli malé přežití. Mohla by autorka informaci více upřesnit a pokusit se zvýšenou mortalitu vysvětlit?

---

Ve Vodňanech dne 12.9. 2019

Doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

