



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

ZOOLOGIE

Viničná 7, 128 44 Praha 2

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

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-alpha-ethinylestradiolu 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 µg/l (0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1µM). Z čehož nejnižší dvě koncentrace estrogenů 0,02 µg/l a 0,2 µg/l jsou fyziologické koncentrace těchto hormonů v plazmě dospělých myši, následující dvě koncentrace 2 µg/l a 20 µg/l jsou fyziologické u myši v místě ovulace a poslední námi použitá koncentrace 200 µg/l je tudíž pouze 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. 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 estrogeny působit na mnohé organismy 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*.

Efekt daných estrogenních hormonů byl tudíž hodnocen mírou 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 imunofluorescence stav akrozómu po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci u kapacitovaných spermií.

Magda, se v rámci svojí DP měla detailně 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. O šíři dané problematiky svědčí rozsáhlý úvod, který čítá přes 40 stran textu z celkových více jak 100 stran rozsahu diplomové práce. Dle mého názoru, je úvod v některých úsecích až příliš rozsáhlý a šel by pojmout více stručně se zaměřením přímo na specifické cíle DP, nicméně Magda se v rámci seznamování s literaturou vyjadřovala obsírněji a méně selektivně.

Při vypracování své diplomové práce měla možnost Magda použít širokou paletu metod, spojených s metodikou *in vitro* kapacitace spermií a následnou indukci akrozomální reakce, včetně izolace spermií z distálního regionu *caudy epididymis*. Dále metody imunohistochemické a detekci proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Toto dokládá 10 stran textu Materiál a Methody, kde je i zahrnuta fotodokumentace některých postupů.

Pro získání výsledků schopnosti spermií tyrozinové fosforylace specifických proteinů v hlavičce a bičíku v průběhu kapacitace *in vitro* používala Magda rutinně imunohistochemii a SDS-PAGE elektroforézu. Bohužel získávání výsledků bylo mnohdy ztíženo nedostatkem času z důvodu dlouhodobých soukromých zahraničních pobytů Magdy a dle mého názoru, mnohé výsledky bylo nutné doplnit větším množstvím dat, či přepracovat, neboť ne vždy metodika fungovala a některé soubory to odrážejí. Z důvodu hodnocení kvanta získaných výsledků se Magda seznámila se statistickým zpracováním dat, a získané hodnoty byly statisticky analyzovány. Výsledky jsou zpracovány na základě statistických výsledků na 15 stranách textu.

Je obrovská škoda, že ač si Magda o rok prodlužovala vypracování svojí DP, daný rok bohužel v laboratoři vůbec nebyla, již po létě 2009 odletěla do zahraničí a tento čas chtěla věnovat sepsání a finalizaci svojí DP. Nicméně tomu se tak nestalo, po příletu v květnu byla napsána metodika a částečný úvod a Magda měla pocit, že za 10 dní se stihne dopsat celá práce. Samozřejmě toto se nestalo a Magda si opětovně prodloužila termín odevzdání do nynějšího podzimu. Snažila jsem se Magdu vést a radit jí co možná nejvíce, i když vše řešit přes email a vytvořit celou DP bez osobní komunikace mi přijde velice obtížné a musím říci i z mého pohledu nesmírně časově náročné. Neboť to co se dá sdělit za hodinu konzultace zabere několik hodin psaného vysvětlování a rad. Bylo mi až trapně neustále urgovat psaní DP, a upozorňovat na opětovně se blížící termín odevzdání. Věřím, že bych mohla doložit stovky emailů ohledně psaní této DP, které jsou mnohdy už vysoce apelující.

K včerejšímu datu 1. 9. 2010 jakož to řádnému termínu odevzdání DP pro katedru BB byla Diskuze DP preliminárně zpracována na pár stránkách, s mojí prvotní korekturou z předchozího dne. Závěr doposud chybí zcela. Studentka již více jak dva měsíce je seznámena s faktem, že 4.9. odjízďím do zahraničí a i tak je situace taková, že dnes 2.9. píšu školitelský posudek bez toho, že bych práci měla možnost vidět a vyjádřit se k její finální podobě. Doposud chybí zcela Závěr práce.

K tomuto momentu mohu říci, že formální stránka DP je dobrá, strukturní členění je standardní, práce obsahuje poměrně jasný abstrakt v českém i anglickém jazyce, úvod relevantní byť obsáhlejší, metodika a výsledky popisují metodiku a získaná data a literární zdroje jsou dostatečné a recentní. Práce je po sepsání, jak jsem již zmínila poměrně rozsáhlá, bohužel diskuze je velice slabou kapitolou a je vidět, že byla psána horkou jehlou a závěr prozatím zcela chybí.

Ze statisticky zpracovaných výsledků v korelaci s výsledky SDS-PAGE nicméně ve stručnosti jasně vyplývá, že estrogenní hormony při kapacitaci *in vitro* mají na myší spermie prokapacitační vliv, tudíž urychlují oproti kontrole tyrozinovou fosforylací specifických proteinů. Tento efekt byl nejvíce patrný při čase kapacitace 30 min, téměř u všech experimentálních koncentrací, kromě v některých případech těch nejnižších. U kontrolních vzorků se teprve tyrozinová fosforylace fyziologicky „rozbíhá“ a dosahuje 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 fosforylací o hodinu dříve. Zajímavé je, že hodnocení akrozomální reakce ovšem ukazuje, 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 estrogenních hormonů. Bylo by rozhodně zajímavé pokračovat v experimentech *in vitro* oplozením oocytů a případně *in vivo* studií. Rovněž např. doposud nebylo zodpovězeno „kolik vázaného estradiolu či zda vůbec nějaký si epididymální spermie přinášejí s sebou do místa kapacitace a fertilizace, nebo zda je toto zajišťováno výhradně reprodukčním traktem samice“?

Na závěr při hodnocení práce studentky by mělo být zmíněno, že Magda bohužel nevyvalovala při vypracování své diplomové práce dle mého názoru dostatečné úsilí, což se odráží v práci samotné. Magda sice prokázala, že je schopná na tématu pracovat, ale chybělo jí nadšení, snaha o poznání, aktivní přístup plánování navazujících experimentů, a analýza získávaných výsledků. Magdy postoj bych očekávala od laborantky, které jsou dávány úkoly, ona je bezmyšlenkovitě plní a na nic se neptá a nic nového neobjevuje. Tento osobitý přístup se bohužel odrazil i v celkovém přístupu k psaní DP.

Nicméně, předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou dobře.

Kateřina Hortová

V Praze, 2. 9. 2010