

# Oponentský posudek diplomové práce

Název: **Vliv triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro***

Autor: **Bc. Johana Straková**

Oponent: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

## Souhrn

Předkládaná diplomová práce studuje vliv antropogenních polutantů životního prostředí na reprodukční zdraví člověka. Autorka svůj výzkum zaměřila na látku triclosan, u které existuje předpoklad, že by mohla mít škodlivý vliv na lidské zdraví. Triclosan je využíván v kosmetických a desinfekčních prostředcích a bylo prokázáno, že je v lidském těle přítomen. Tato látka je klasifikován jako endokrinní disruptor a předkládaná práce předpokládá, že jeho přítomnost v těle savců má vliv na kvalitu jejich gamet. Na modelu prasečích oocytů autorka sleduje vliv tří vybraných koncentrací látky triclosan a dále vliv kombinace triclosanu s bisphenolem S na vybrané markery meiotického zrání. Dosažené výsledky poukazují na možný vliv triclosanu na organizaci meiotického vřetenka, naopak vliv triclosanu na epigenetické markery a počet a kvalitu mitochondrií prokázán nebyl.

## Formální úroveň práce

Práce splňuje požadavky na formální úroveň DP. Text je kvalitní, psaný čtivou formou. V práci se vyskytuje minimum překlepů. Stejně tak obrazová část dosahuje požadované úrovně, nechybí legendy a odkazy v textu. Seznam literatury je obsáhlý a citovaná literatura je relevantní k danému tématu.

## Hodnocení jednotlivých kapitol diplomové práce

### Literární přehled

Literární přehled je velmi pečlivě zpracován a je relevantním úvodem do studované problematiky, neobsahuje ovšem žádné obrázky, které by text vhodně doplnily, což je škoda. Tato část práce je rozčleněna na dvě základní části, první se zaměřuje na popis oogeneze a druhá na představení vybraných faktorů a markerů regulace meiotického zrání. Zatímco první část velmi dobře uvádí čtenáře do tématu, v druhé části bych ocenila větší propojení se studovanou problematikou, zejména pak informace o tom, jaké byly pozorovány vlivy na popisované molekuly v jiných obdobných studiích.

### Cíle

Autorka si jasně stanovila cíle své práce a v textu jsou formulovány stručně a srozumitelně.

### Materiál a metody

Ačkoli samotná experimentální práce je v kapitole popisující metody popsána jasně a dostatečně podrobně, klíčová podkapitola 6.6, která se zabývá analýzou obrazu by si zasloužila zpracovat do větších detailů. Jelikož je většina výsledků práce založena především na hodnocení intenzity fluorescence a jejím porovnání s průměrnou hodnotou v kontrolách, měla by metodika měření stejně jako design celého experimentu být velmi podrobně popsán. V práci bohužel není dostatečně vysvětleno, jak bylo zajištěno, aby vzorky byly snímány vždy za stejných podmínek, stejně jako jaké byly použity kontroly kvality barvení v jednotlivých opakováních.

## Výsledky

V rámci kapitoly výsledky jsou prezentována získaná data a jejich statistické zhodnocení pomocí grafů a obrázků. Zobrazené výsledky jsou srozumitelně a jasně popsány v textu. K této kapitole mám několik připomínek:

V celé práci jsou získaná data prezentována pomocí sloupcových grafů, tento způsob je nejméně vhodnou formou vizualizace dat tohoto typu experimentu. Výsledky měření by měly být vizualizovány nejlépe pomocí grafu zobrazujícího jednotlivé hodnoty, jejich průměr a odchylky, zároveň je ale vhodné použít i barevné odlišení hodnot jednotlivých replikátů viz publikace: Lord et al. 2020 (<https://doi.org/10.1083/jcb.202001064>) Figure 1. Tento způsob vizualizace naměřených dat umožní čtenáři se v datech lépe orientovat a sledovat různé trendy, které se v nich objevují.

- Kapitola 7.1 Vliv triclosanu na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro* - Výsledky hodnocení progresu meiotického zrání jsou zobrazeny v grafu 1, bylo by přínosné kdyby kromě grafu autorka zařadila i reprezentativní mikroskopická data zobrazující jednotlivá stadia oocytů – GV, MI, MII. Dále je předpoklad, že některé z oocytů v jednotlivých skupinách nejen, že nezačaly maturaci *in vitro*, ale během 48h inkubace došlo dokonce k jejich degradaci. Domnívám se, že by do grafu bylo vhodné zahrnout i tuto skupinu.
- Kapitola 7.2 Vliv triclosanu na utváření cytoskeletárních struktur meiotického vřeténka - V této kapitole byla cituji: „*na základě mikroskopických snímků hodnocena morfologie meiotického vřeténka. Jako normální byla vyhodnocena bipolární vřeténka se správně napojenými chromozomy seřazenými v ekvatoriální rovině. Mezi nejčastější defekty vřeténka patřilo snížení hustoty tubulinových vláken a výrazné zmenšení vřeténka. S menší četností bylo pozorováno neukotvené vlákno tubulinu, chybné napojení chromozomu a monopolární či tripolární uspořádání meiotického vřeténka.*“ Výsledky tohoto experimentu jsou opět vizualizovány pomocí grafu, oocyty jsou zde ovšem rozřazeny pouze do dvou kategorií – normální vs. abnormální. Bylo by přínosné, kdyby autorka zařadila ještě jeden graf, který by ukázal rozložení zastoupení právě na základě popsaných typů defektů. Bylo by zajímavé vidět, zda i v zastoupení jednotlivých typů defektů vřeténka nejsou mezi experimentálními skupinami rozdíly. Dále je součástí výsledků v této kapitole obrázek 2 – zde je u kontroly a jednotlivých experimentálních skupin ukázán reprezentativní obrázek pozorovaných defektů meiotického vřeténka, v legendě chybí popis o jaký z defektů se jedná. Nicméně tento způsob prezentace dat nepovažuji za správný, na jakém principu byl k jednotlivým skupinám přiřazen vyobrazený defekt? Jednalo se o nejčastější abnormalitu v dané skupině? Pak by to ale znamenalo, že různé koncentrace triclosanu vyvolávají různé defekty... vzhledem k tomu, že tento jev není v textu zmíněn, předpokládám, že obrázky byly vybrány náhodně. Pokud autorka chtěla v práci vizualizovat pozorované defekty vřeténka, což považuji za velmi žádoucí, správný postup by byl pouze ukázat obrázky jednotlivých pozorovaných abnormalit popsaných v textu bez jejich přiřazení do jednotlivých experimentálních skupin. Předpokládám totiž, že se dané defekty daly více či méně často nalézt ve všech skupinách včetně kontroly.
- Kapitoly 7.3 – 7.5 – bylo by vhodné kromě grafů v těchto kapitolách ukázat i reprezentativní obrázek, jak IF značení vypadá.
- Kapitola 7.4 Vliv triclosanu na expresi mitochondrií – zde si myslím není úplně vhodné mluvit o expresi, pokud text dobře chápu autorka na základě intenzit porovnávala počty mitochondrií, pak je vhodnější mluvit o abundanci, exprese je většinou chápána jako exprese genu.

- Kapitoly 7.6 – 7.8 hodnotí obdobným způsobem jako v předchozích kapitolách vliv triclosanu v kombinaci s bisphenolem S, z tohoto důvodu platí pro tyto kapitoly stejné připomínky, které jsem již uvedla v předchozích kapitolách.
- Obr. 4 – „Reprezentativní snímky zobrazují intenzitu fluorescence acetyl tubulinu ve skupinách oocytů ošetřených 2,5 nM, 250 nM, 25 M triclosanem v kombinaci s 3pM BPS ve všech skupinách a kontrole. Tento způsob prezentace dat nepovažuji za šťastný. Intenzitu fluorescence nelze jednoduše hodnotit okem z fotky, k tomu, aby snímky, byť reprezentativní, mohly ukázat to, co autorka zamýšlela, musely by na nich kromě obrázků být prezentovány i jednotlivé fluorescenční intenzitní křivky.

## Diskuze

Diskuzi považuji za velmi kvalitně napsanou. Autorka v této kapitole přehledně diskutuje již prezentované výsledky v kontextu dříve publikovaných informací a zamýšlí se nad možnými mechanismy působení triclosanu na studované děje.

## Hodnocení

**Autorka Bc. Johana Straková v rámci své diplomové práce Vliv triclosanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro* prokázala, že dokáže pracovat s odbornou literaturou, vyhledávat v ní relevantní informace ke svému výzkumu a dříve získané výsledky ostatních skupin konfrontovat s vlastními výsledky. Výsledky zahrnuté v práci dále potvrzují, že si Johana osvojila principy systematické laboratorní práce a rovněž experimentální metody potřebné k naplnění cílů DP a ověření stanovených vědeckých hypotéz. V rámci kapitoly popisující metody autorka prokázala, že je schopna si o provedených experimentech vést protokoly a seznámit širší vědeckou obec s postupy své práce, nicméně některé části kapitoly metody by si zasloužily více rozvést. V kapitole výsledků dále prokazuje, že dokáže své výsledky zpracovat a prezentovat, ačkoli tuto kapitolu považuji za nejslabší část práce a domnívám se, že by se dala uchopit lépe. Z výše uvedeného vyplývá, že autorka splnila všechny požadavky na vypracování DP. Jako oponentka tak práci doporučuji k obhajobě a hodnotím jako velmi dobrou.**

## Otázky:

V kapitole 6.6 popisujete metodiku měření a hodnocení intenzity fluorescence, jakou pozitivní a negativní kontrolu jste v experimentech využívajících měření intenzity fluorescence využila? Byla zavedena nějaká interní kontrola? Jaká byla variabilita hodnot intenzit fluorescence mezi jednotlivými opakováními experimentu?

V kapitole 7.2 zmiňujete kategorii anormálních vřetének „výrazně zmenšené vřeténko“. Na základě čeho bylo určeno, kdy už se jedná o abnormalitu ve velikosti a kdy ještě ne a jak toto bylo kvantifikováno? Byla velikost vřeténka nějak měřena např. pomocí segmentace ve Fiji a následného vyhodnocení plochy, nebo popřípadě měření délky vřeténka? V metodice tato informace chybí. Stejně tak informace o tom na základě čeho bylo kvantifikováno snížení hustoty tubulinových vláken.

V celé práci autorka používá sloupcové grafy, které nemají dostatečnou vypovídací hodnotu, mohla by autorka pro účely obhajoby připravit grafy ve stylu, který doporučuje zmíněná publikace?