

Vážený pan

**doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.**

**děkan**

AF MENDELU v Brně

zde

V Brně 28. 7. 2016

**Věc: Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Ing. Šárky Hanulákové**

Předložená disertační práce „Vliv folikulogeneze na efektivitu *in vitro* fertilizace prasečích oocytů“ je zpracována v rozsahu 86 stran a je členěna do kapitol: abstrakt (1 strana), seznam použitých zkratk (2 strany), úvod (1 strana), literární přehled (21 stran), cíle (1 strana), experimentální část (s podkapitolami materiál a metodika, statistické hodnocení, výsledky – celkem 26 stran), diskuze (7 stran), závěry (2 strany) a literatura (18 stran s uvedením více než 140 citací).

Řešená problematika patří k aktuálním tématům asistované reprodukce, které se autorka v posledních letech v řadě různých pracovních a vědeckých kolektivů věnuje. Konkrétní zacílení do oblasti výzkumu metod hodnocení a výběru prasečích oocytů pro *in vitro* fertilizaci je velmi vhodné, protože u tohoto živočišného druhu stále existuje množství problémů, které je zapotřebí dořešit tak, aby se úspěšnost metod asistované reprodukce v oblasti *in vitro* fertilizace zlepšila. Pro samotnou disertační práci byly stanoveny cíle a formulovány výzkumné hypotézy týkající se distribuce a migrace kortikálních granul prasečích oocytů izolovaných z malých a středních folikulů v různých fázích pohlavního cyklu a vyhodnocení vztahu těchto parametrů k následnému oplození *in vitro*.

Jako teoretické východisko disertační práce autorka zpracovala **literární přehled** zahrnující stručný popis folikulogeneze a oogeneze a podrobněji problematiku zrání oocytu, která je u prasat v podmínkách *in vitro* stále problematická a do určité míry limitující úspěšnost oplození a zdárného vývoje embryí. Dalšími kapitolami literárního přehledu jsou meiotická a vývojová kompetence oocytu, fertilizace *in vitro* a polyspermický blok. Je možno konstatovat, že autorka čerpá z širokého spektra převážně časopisecké vědecké literatury a problematiku disertační práce vhodně uvádí a vysvětluje. Kapitola má přiměřený a dostatečný rozsah.

Je škoda, že se autorka nevyvarovala určitých formálních chyb (nejen v literárním úvodu, ale v celé disertační práci), které jsou vyznačeny přímo v textu posuzované disertace – např. často chybějící tečky na konci vět, při používání řadových číslovek apod. Pro budoucí psaní si dovoluji upozornit, na dle mého názoru, ne zcela vhodné používání formulací typu – např. na str. 13: „Black a Erickson (1968) dodávají, že u plodu prasat je nejvyšší počet zárodečných buněk...“, pokud tomuto tvrzení v textu předchází věta, resp. myšlenka jejímž autorem je Van Voorhis z roku 1998, tzn., že dříve uvedená citace (Van Voorhis, 1998) je mladšího data, a tudíž k ní nemohou jiní autoři 30 let „předem“ (1968) něco „dodávat“. Informace tohoto typu je vhodnější psát chronologicky nebo se formulacím typu „doplňují“, „dodává“ apod. raději vyhnout a použít jiné – „časově neutrálnější“ sloveso. Dle mého názoru by také bylo vhodnější v řadě případů v práci používat české výrazy namísto anglicismů či dokonce jen anglických výrazů bez jakéhokoli překladu – pokud takové české výrazy existují.

- Z věcného hlediska bych chtěl autorku požádat o vysvětlení/zpřesnění první věty v kapitole 2.3.2.3. Budou mRNA kyseliny přeměněny v proteiny?

Vlastní **experimentální část** práce využívá moderní a náročné techniky umožňující vizualizovat, popisovat a hodnotit studované jevy na odpovídající úrovni. Metodické popisy laboratorních metod jsou dostatečně podrobné a zvolené metody práce odpovídají stanoveným cílům.

- Prosím pouze o doplnění údajů o počtech, příp. věku poražených prasnic, resp. počtu použitých vaječníků v jednotlivých experimentech a upřesnění/doplnění popisu tzv. „odpovídajícího morfologického statusu folikulů a žlutých tělísek“ pro rozdělení vaječníků na fáze estrálního cyklu (viz strana 35).
- Proč byly do studie zařazeny pouze oocyty z malých a středních folikulů?

**Výsledky** jsou zpracovány přehledně v tabulkách a opakují se také v grafech (což je na zvážení, zda by nestačila pouze jedna z forem prezentace výsledků). Vhodné jsou zařazené obrázky, které metody hodnocení i popisy výsledků přehledně ilustrují a problematiku čtenáři práce více zpřístupňují. Závěrečné textové pasáže výsledků mají někdy charakter diskuse a bylo by tedy vhodné přesunout je do příslušné následné kapitoly.

- Ve výsledcích experimentu 3 se uvádí, že: „Jak je dále patrné z tabulky 5, nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly v distribuci kortikálních granul po inseminaci oocytů s odlišnou meiotickou kompetencí a nebyl zaznamenán ani vliv fáze estrálního cyklu.“, ale v tabulce 5 nejsou (na rozdíl od experimentů 1 a 2) výsledky dle fází, resp. stádií cyklu uvedeny – které výsledky tedy toto vyhodnocení dokládají?
- Prosím o doplnění a vyjádření se k tomu, zda bylo zjištěno, že všechna kortikální granula podstoupila proces exocytózy, resp. u jak velké většiny? Toto je ve výsledcích uvedeno nejasně.
- Bylo v experimentu 3 provedeno vyhodnocení *in vitro* fertilizace u oocytů v různé fázi estrálního cyklu? Bylo by možno doplnit tabulku 6 o tyto výsledky?

Výsledky práce jsou přiměřeně **diskutovány** a porovnány s výsledky jiných autorů. Z vlastních výsledků i porovnání s literárními údaji autorka vyvodila odpovídající **závěry**.

- Jaké další cesty výzkumu příslušné oblasti vnímá autorka jako perspektivní, resp. kde vidí největší problémy a jaká má praktická doporučení pro to, aby se úspěšnost *in vitro* fertilizace u prasat zlepšila?

**Celkově disertační práci hodnotím kladně. Je zpracována na odpovídající úrovni a autorka v ní dokladuje potřebné znalosti, vědeckou erudici i zkušenosti naplňující předpoklady pro získání titulu Ph.D. Uvedené otázky a komentáře mají posloužit především k doplnění či dovysvětlení některých údajů a otevření diskuse při veřejné obhajobě, ke které předloženou disertační práci jednoznačně doporučuji.**

doc. MVDr. Leoš Pavlata, Ph.D.

Ústav výživy zvířat a pícninářství, AF MENDELU v Brně