

## POSUDEK OPONENTA DISERTAČNÍ PRÁCE

<b>Autor práce:</b>	Mgr. Miriama Štiavnická
<b>Název práce:</b>	Epigenetic modifications of the sperm and the application in clinical practice of human assisted reproduction therapy
<b>Oponent:</b>	Mgr. Soňa Kloudová, PhD.
<b>Pracoviště oponenta:</b>	Reprofit International, s.r.o.

Autorka se v předložené práci zaměřila na problematiku epigenetiky gamet, která v současné době začíná být na poli asistované reprodukce hojně diskutována. V klinické praxi jsme schopni na mnoha úrovních vyšetřit funkční kvalitu spermií, nicméně možnosti predikce plodnosti muže jsou stále omezené. Na základě indicií, které v současné době máme v praxi k dispozici, bývá obtížné i doporučit konkrétnímu léčenému páru vhodnou metodu asistované reprodukce. Přínosem této práce je mimo jiné i poukázání na důležitost zahrnout do hodnocení kvality gamet také epigenetické znaky. Téma práce proto považuji za aktuální a velmi vhodně zvolené.

Text práce je napsán v anglickém jazyce, srozumitelně a bez gramatických chyb. Autorka ve své práci čerpala z vysokého množství vhodně zvolených a aktuálních citací. Snad jako drobnou výtku k textu práce bych uvedla, že některé zkratky autorka vysvětluje v seznamu zkratek, jiné pouze v textu. Očekávala bych i tyto zkratky uvedené v rámci seznamu zkratek. Jako součást práce autorka přikládá publikace, které v průběhu výzkumu vznikly. V první z nich je autorka zároveň prvním autorem, práce je prozatím ve statusu „For Peer Review Only“. Následující dvě publikace jsou v současné době již publikovány. Jako čtvrté je uvedeno velmi pěkné review, jehož je autorka opět prvním autorem. Uvážíme-li vědeckou kvalitu již publikovaných částí výzkumu, není pochyb, že předložená práce obsahuje důležité závěry.

Kapitola „Introduction“ uceleně shrnuje problematiku vývoje gamet, epigenetických modifikací a jejich významu při oplození a vývoji embrya. Tuto kapitulu oceňuji, protože poskytuje souhrnný přehled znalostí o řešené problematice. V krátkosti se autorka věnuje i metodám selekce spermií, které mohou přispět k výběru spermie na základě souvislosti s epigenetickými změnami.

Cíle práce jsou výstižně formulovány v kapitole „Hypothesis and Aims“ a mohu konstatovat, že byly splněny. Zároveň je třeba vyzdvihnout, že se autorka pustila do řešení čtyř poměrně odlišných úkolů, ke kterým bylo také nutno přistoupit s použitím odlišných metodických přístupů.

Z kapitoly „Material and Methods“ je zřejmé, že autorka ovládá opravdu široké spektrum vyšetřovacích metod. Tato část práce obsahuje několik nesrovnalostí:

- V kapitole 3.1. autorka uvádí, že lidský ejakulát byl hodnocen v souladu s kritérii Světové zdravotnické organizace z roku 2010 (WHO 2010). Následně uvádí, že pro hodnocení koncentrace a motility spermií byla použita Maklerova komůrka. Komůrka o hloubce, kterou má Maklerova komůrka však pro účely vyšetření koncentrace lidského ejakulátu dle WHO 2010 doporučena není, stejně tak motilitu spermií se doporučuje vyšetřovat za použití podložního a krycího skla. Dále je v práci popsáno, že za asthenozoospermický byl považován vzorek, který má méně než 32 % progresivně motilních spermií. Správně podle kritérií světové zdravotnické organizace by však měly být do této kategorie současně zařazeny i ty vzorky, které mají celkovou pohyblivost nižší než 40 %.

Nabízí se proto dotaz na autorku: **Do které kategorie byly zařazeny vzorky, které měly méně než 40 % motilních spermií?**

- V kapitole 3.2 není zřejmé, kolik zvířat bylo pro studii použito, v kapitole 3.3 pak postrádám informaci o počtu opakování odběrů u jednotlivých kanců. Tyto informace považuji za vhodné doplnit.
- Není zcela zřejmé, pro které experimenty byla použita která zvířata. Tato informace je uvedena v příložených publikacích, nicméně v textu samotné disertační práce ji postrádám. Zcela pak postrádám informaci, pro které experimenty byly použity ejakuláty kanců. I tyto informace by měly být doplněny.
- 4. V kapitolách 3.4. a 3.6. není uvedeno, na kolika replikách bylo měření v průtokovém cytometru provedeno. V kapitole není uvedena informace o počtu hodnocených oocytů. V kapitole 3.9. není uvedeno, jakým způsobem byly ejakulované a kapacitované spermie promyty před kvantifikací H2S-releasing enzymů.

K celkové přehlednosti metodiky i výsledků práce by významně přispělo doplnit práci o experimentální schéma, které by ujasnilo původ spermií v experimentu, počty opakování a počty oocytů získaných pro jednotlivé experimenty. **Navrhuji toto schéma**

doplnit do práce formou „vloženého listu“, čímž by byly odstraněny předchozí i následující připomínky.

Výsledky práce jsou v kapitole „Results“ vždy uvedeny krátkým úvodním teoretickým textem a jsou prezentovány formou přehledných tabulek a grafů. K této kapitole mám následující připomínky.

- Z výsledků experimentů v kapitolách 4.2. a 4.3 není zřejmé, ve kterých experimentech byly použity myší nebo kančí spermie a chybí i informace o počtu vzorků. Předpokládám, že experimentu 4.1. byly použity spermie člověka.
- V tabulce 1. chybí informace o proměnné, která byla hodnocena v případě mitochondriální aktivity a časné apoptózy spermií (MitoTracker/YO PRO). Dále v případě progresivní motility u OA mužů je uveden medián pro progresivní motilitu 0.00 (s kvartily 0,00 - 10,00). **Je tento údaj správný?**
- V průběhu textu za sebou následují tabulky č. 1, 2, 3, 4 a následně až 7. Tabulky č. 5 a 6 se v textu nevyskytují a ani odkaz na ně není uveden. Předpokládám tedy, že se jedná o chybu v číslování. V textu není odkaz na obrázek č. 15, což je pouze detail, protože výsledky vztahující se k obrázku v textu popsány jsou. Některé pasáže z kapitoly 4.3. se hodí spíše do diskuze. Kapitola 4.4 ve výsledcích nebyla již jedním z vytyčených cílů práce a není zcela typickým výsledkem práce. Její náplň již byla popsána v kapitole „Introduction“ a je zřejmě míněna spíše jako odkaz na čtvrtou příloženou autorčinu publikaci.

Pěkně je napsána kapitola „Discussion“, kde jsou autorkou diskutovány výsledky práce a konfrontovány s poznatky zjištěnými v literatuře. Tato kapitola obsahuje 4 stránky textu, který je logicky navazující podle jednotlivých kapitol výsledků.

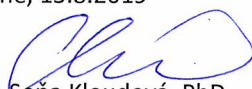
V poslední části práce („Conclusion“) autorka výstižně a stručně ucelila nejdůležitější poznatky získané v průběhu výzkumu, které korespondují s vytyčenými cíli.

Dotazy do diskuze:

- V kapitole 7.1. uvádíte výčet metod, kterými je možné provádět výběr spermií mimo jiné i bez epigenetických změn. Do těchto metod jste nezahrnula metodu PICSI, která umožňuje výběr spermií na základě schopnosti vazby k hyaluronanu, který je běžnou součástí mezibuněčné hmoty kumulárních buněk oocyty a je tedy součástí „přirozené selekce spermií“. Myslíte si, že do této kategorie nepatří? Jaký je Váš názor?
- Jedním z mnou velmi oceňovaných závěrů Vaší práce je označení H3K4me2 jako vhodného ukazatele kvality spermií. Z pohledu klinické praxe však vidím jako problematické v současné době zajistit toto specializované vyšetření. Jednou z hlavních překážek je nutnost dostat vyšetřovaný vzorek na pracoviště s průtokovým cytometrem, který běžná andrologická laboratoř nemá k dispozici. Myslíte, že je možné za tímto účelem vzorek zamrazit a k vyšetření jej odeslat? Jako praktik bych dále viděla jako přínosné vztáhnout získané poznatky také k úspěšnosti v rámci „in vitro fertilizace“. Máte to v plánu?
- Vidíte nějakou možnost praktického využití Vašich poznatků o roli H<sub>2</sub>S v regulaci kapacitace spermií?

V předložené práci autorka prokázala tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu, během vypracování práce bylo zjištěno mnoho důležitých poznatků, které jsou součástí několika publikací. Podle mého názoru práce splňuje nároky kladené na disertační práci a proto i přes výše uvedené nedostatky doporučuji práci k obhajobě.

V Brně, 15.8.2019

  
Mgr. Soňa Kloudová, PhD.