

Oponentský posudok na habilitačnú prácu

Názov práce: *Nukleogenéza v oocytoch a raných embryách cicavcov: Molekulárne a ultraštruktúrne aspekty aktivácie embryonálneho genómu.*

Autor práce: RNDr. Martin Morovič, PhD.

Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra zoológie a antropológie

Oponent: Ing. Alexander Makarevič, DrSc.

NPPC - Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra

Reprodukcia predstavuje jednu zo základných funkcií živých organizmov, pričom rozhodujúcim spôsobom ovplyvňuje novú generáciu ako aj viaceré úžitkové vlastnosti. V súčasnej dobe je v súvislosti s riešením problematiky chovu hospodárskych zvierat veľmi dôležité venovať pozornosť štúdiu mechanizmov zodpovedných za vznik reprodukčných porúch u samíc, kde kľúčové problémy spočívajú v nedostatočnej kvalite získaných oocytov, uchovávaní gamét, výskyte polyspermie pri oplodnení in vitro (ošípané), kultivácii embryí in vitro a ich následnej transplantácii. Preto experimenty zamerané na výskum molekulárnych a fyziologických procesov, prebiehajúcich v gamétach cicavcov môžu priniesť dôležité poznatky pre optimalizáciu existujúcich a vytváranie nových biotechnologických postupov v oblasti reprodukčnej biológie hospodárskych zvierat alebo humánnej asistovanej reprodukcie. Z tohto hľadiska predložená habilitačná práca rieši v súčasnej dobe veľmi aktuálnu problematiku – zistenie úlohy jadierka v maturácii oocytov cicavcov a jeho vplyv na proces aktivácie embryonálneho genómu (EGA) a ranú embryogenézu.

Na objasnenie úlohy maternálnych substancií pri tvorbe jadierka počas embryogenézy autor uskutočnil inhibičné experimenty použitím aktinomycínu D – blokátora RNA polymerázy I. Ako výsledok bol vyslovený predpoklad že aktivácia nukleogenézy a procesing rRNA sú nezávislé od RNA Pol I transkripcie, čo potvrdzuje maternálny pôvod kľúčových jadierkových proteínov (fibrilarín, B23, C23).

V experimentoch po medzidruhovej enukleolácii/re-injekcii NLB (nucleolus-like body) autor zaznamenal, že myšacie NLB po re-injekcii do prasacieho oocyту (a následnej partenogenetickej aktivácii) je schopné zabezpečiť embryonálny vývin. V práci boli použité metódy transmisnej elektrónovej mikroskopie, autorádiografie na lokalizáciu reorganizácie chromatinu a EGA v intaktných a re-injektovaných embryách. Okrem toho, autor sa zamerail na aktiváciu génovej expresie pre DNA metyltransferázy počas vývinu partenogeneticky alebo iSCNT- získaných embryí. Autor vytvoril model epigenetickej regulácie transkripcie génov pre DNA metyltransferázy: vyprodukoval embryá pomocou iSCNT s prasacou ooplazmou a bovinným somatickým jadrom a naopak. Zistil že embryá s druhovo odlišnou ooplazmou nie sú schopné prekonať štádiá po EGA, nakoľko embryogenéza bola úplne zastavená v 4-bunkovom štádiu vývoja.

Okrem iného habilitant sa zamerail taktiež na stanovenie kvality oocytov pomocou jednoduchých cytochemických techník a preukázal, že vitálne farbenie pomocou Brilliant Cresyl Blue (BCB) nemalo negatívny vplyv na kvalitu oocytov a embryí a preto je možné ho považovať za vhodnú neinvazívnu metódu stanovenia kvality oocytov ošípaných.

Habilitačná práca RNDr. Martina Moroviča, PhD predstavuje kompiláciu publikovaných prác habilitanta s patričným komentárom, kde sú interpretované a diskutované dosiahnuté výsledky. Spis obsahuje celkovo 134 strán a skladá sa z dvoch hlavných častí. Prvá časť obsahuje literárny prehľad o danej problematike, výsledky s diskusiou a záver. Druhá časť predstavuje prílohu obsahujúcu 7 najvýznamnejších pôvodných vedeckých publikácií autora. Pozitívne hodnotím fakt, že uvedené práce boli publikované v prestížnych zahraničných časopisoch s vysokým impakt-faktorom, kde habilitant vystupuje ako prvý autor (na troch článkoch) alebo spoluautor, čo je dôkazom originality a kvality dosiahnutých výsledkov.

K práci mám nasledujúce pripomienky a otázky:

Po formálnej stránke spis väčšinou zodpovedá požiadavkám kladeným na tento druh práce. Avšak nikde v texte nie je jasne definovaný cieľ (ciele) danej práce, čo predstavuje jedinou slabú stránku.

Mám nasledovnú otázku do diskusie:

Autor odporúča zavedenie jednoduchých a aplikovateľných metód stanovenia kvality oocytov za účelom zvýšenia efektivity *in vitro* produkcie embryí. Ako uvádza, jednu z takých metód môže byť vitálne farbenie, napríklad pomocou farbenia s Brilliant Cresyl Blue. Na druhej strane navrhuje ďalšie experimenty zamerané na moderné proteomické a transkriptomické techniky. Nakoľko v súčasnej dobe sú tieto metódy veľmi finančne (drahé prístrojové vybavenie) a časovo náročné, ako si autor predstavuje ich široké uplatnenie v praxi, napríklad pri asistovanej reprodukcii?

Záver:

Výsledky, dosiahnuté v práci habilitantom, významne prispievajú k rozšíreniu poznatkov o dôležitosti maturácie oocytov cicavcov a význame nukleogenézy vo vývojovej kompetencii oocytov, čo môže byť využiteľné v praxi v laboratóriách zaoberajúcich sa produkciou embryí hospodárskych zvierat *in vitro*, ako aj v centrách asistovanej reprodukcie ľudí. Použitie sofistikovaných a náročných analýz, relevantná interpretácia výsledkov a z nich logicky vyvodené závery poukazujú na vysokú odbornosť habilitanta v danej problematike výskumu. Úroveň spracovania a logická nadväznosť habilitačnej práce svedčí o vynikajúcich vedecko-výskumných, ale aj pedagogických schopnostiach habilitanta. Predloženú prácu preto hodnotím kladne. Po úspešnej obhajobe odporúčam udeliť RNDr. Martinovi Morovičovi, PhD titul docent v odbore „Biológia“.

v Nitre 27.08.2020

.....

Ing. Alexander Makarevič, DrSc.