

## Oponentský posudok

doktorandskej dizertačnej práce Mgr. Martina Sládka „**Expression of clock genes in the rat suprachiasmatic nucleus and liver: effect of photoperiod and development**“

Predkladaná dizertačná práca je venovaná ontogenéze rytmickej expresie niektorých hodinových génov u altriciálneho potkana. Cirkadiánna organizácia biologických procesov predstavuje fundamentálnu reguláciu prítomnú na všetkých úrovniach existencie živej hmoty. V posledných rokoch sa tomuto fenoménu venuje celosvetovo veľká pozornosť, čo ilustrujú aj početné štúdie publikované v najprestížnejších vedeckých časopisoch. Tejto oblasti sa venuje aj predkladaná doktorandská dizertačná práca Martina Sládka a ako vyplýva z úvodu, jej zameranie je vysoko aktuálne. Práca naväzuje na prestížnu chronobiologickú školu systematicky rozvíjanú na Fyziologickom ústave AV ČR v Prahe, ako aj dhodobú a bohatú tradíciu ontogenetického prístupu k štúdiu fyziologických procesov v českom a československom biologickom výskume.

Dizertácia je založená na 8 vedeckých prácach publikovaných v uznávaných medzinárodných vedeckých časopisoch, z ktorých viaceré predstavujú špičku v danej oblasti.

Práca prináša viaceré prioritné výsledky, z ktorých by som chcel vyzdvihnúť presné zdokumentovanie objavenia sa denného rytmu jednotlivých hodinových génov. Ďalším zaujímavým zistením je definovanie ontogenézy reakcie cirkadiálneho systému na rôznu fotoperiódou. Posledná práca prezentovanej série je zameraná na periférne oscilátory v pečeni a demonštruje dôležitosť potravného režimu mláďat pre nasynchronizovanie rytmických procesov v tomto orgáne. Väčšina výsledkov je zameraná na centrálny oscilátor lokalizovaný v suprachiasmatických jadier hypotalamu.

Metodicky je nosnou technikou “in situ“ hybridizácia kľúčových hodinových génov *per 1*, *per 2*, *cry 1*, *bmal 1* a *clock*. Táto základná technika je doplnená imunocytochemickou detekciou signálnych proteínov PER 1, PER 2 a CRY 1 a v poslednej štúdiu autor využil kvantitatívnu RT-PCR hodinových génov *per 1*, *per 2*, *cry 1*, *clock*, *rev-erba* a *Bmal 1*.

Vo všeobecnosti všetky práce indikujú postupný vývin rytmickej expresie jednotlivých hodinových génov. Hoci niektoré gény (napr. *Per 2*) sú rytmické už na 1. deň po narodení, celý súbor sa dostáva do očakávaných fázových vzťahov až po odstave, kedy mláďatá začínajú samostatný spôsob života a príjmu potravy.

Práca je napísaná inštruktívnym a prehľadným spôsobom a jej kladom je aj skutočnosť, že je prezentovaná v anglickom jazyku. Oceňujem fakt, že autor zaregistroval najnovšie trendy a hypotézy, ktoré majú v tejto oblasti zvyčajne vysoký obrat. Pozitívom je zaradenie inštruktívnych obrázkov, ktoré môžu priblížiť túto náročnú problematiku aj čitateľovi, ktorý uvedenú oblasť dlhodobo nesleduje. Z formálnej stránky je práca na vysokej úrovni, našiel som len niektoré nezrovnalosti. V poďakovaní napr. autor ďakuje prof. M. Hastingsovi, hoci v samotnej práci som nenašiel zmienku, čo bolo realizované v jeho laboratóriu. V popise obr. na s. 19 je potrebné pridať „subjektive“ day alebo night.

V rámci diskusie prosím dizertanta o stanovisko k nasledovným otázkam.

- Na základe čoho si autor vybral, ktoré hodinové gény bude analyzovať?
- Ako normalizoval získané výsledky v poslednej práci s využitím kvantitatívnej real time PCR? Ako zosúladiť dva „house keeping“ gény?
- Na štatistickú analýzu získaných výsledkov autor použil ANOVA. Nebolo by vhodné aspoň v kritických dňoch doplniť túto metódu analýzou časových radov alebo kosínorom?
- Odráža absencia rytmu hodinových génov v skorej postnatálnej ontogenéze absenciu synchronizácie alebo deficit regulačnej zložky?
- Môže interferovať rytmický príjem potravy matky, ale aj mláďat, ktorý je pravdepodobne intenzívnejší počas noci, so synchronizáciou svetlom?

Predloženú dizertačnú prácu hodnotím z hľadiska aktuálnosti témy, zvolených metód a získaných výsledkov vysoko pozitívne. Dizertant preukázal schopnosť samostatnej vedeckej práce. Práca spĺňa tie najnáročnejšie kritéria a je plne kompatibilná s úrovňou doktorandských prác na špičkových pracoviskách v Európe a preto ju doporučujem k obhajobe. Po úspešnej obhajobe doporučujem udeliť Mgr. Martinovi Sládkovi akademickú hodnosť *philosophiae doctor* (PhD) vo vednom odbore „Molekulárna a bunková biológia“.

V Bratislave, 20. 6. 2006

Prof. RNDr. Michal Zeman, DrSc.  
vedúci Katedry živočíšnej fyziológie a etológie  
PRIF UK Bratislava