

Posudek disertační práce Mgr. Anny Lábajové „Měření membránového potenciálu pomocí iontově-selektivních elektrod citlivých na tetrafenylfosfóniový kation“

Název předkládané disertační práce je neobvykle skromný, protože vytváří dojem jednoduché a relativně úzce zaměřené metodické práce. Velmi detailní popis metodiky měření $\Delta\psi_m$ mitochondrií jak izolovaných, tak zpřístupněných v permeabilizovaných buňkách způsobem vyvinutým autorkou a jejími spolupracovníky je přitom samozřejmě součástí práce, ale jen jednou její částí. Jak se lze v práci dočíst, dalšími cíli bylo využití zkonstruované aparatury pro měření potenciálu vnitřní mitochondriální membrány pro účely hodnocení funkce dýchacího řetězce a zjištění, jak vápník a prooxidanty ovlivňují tento membránový potenciál. Velmi důležitým úkolem posledního cíle bylo zjištění úlohy „mitochondrial permeability transition pore“, který podle řady údajů hraje významnou roli v apoptotických pochodech v buňce.

Práce se skládá z krátkého úvodu a velmi čtivě a dobře napsané teoretické části, která stručně, ale výstižně pokrývá témata od klasifikace iontově selektivních elektrod a matematického popisu jejich funkce po pojednání o apoptóze a úloze „mitochondrial permeability transition pore“ v ní. Další části jsou stručně popsány cíle práce, materiál a metody a posléze výsledky a diskuse zabírající zhruba 40 stran. Pokud jde o formální stránku, je práce napsána česky velmi čtivou formou, tu a tam s malými odbočkami do slovenštiny a s překmity mezi klasickými a fonetizovanými názvy sloučenin (ethyl x etyl, rhodamin x rodamin, atd.), příp. s kombinací obou (ATP syntasa). Místy se ztratil významový rozdíl mezi MPTP (pór) a MPT (proces permeabilitního přechodu). Z dalších formálních opomenutí - ve strukturním vzorci HFPB⁻ (obr. 5, str. 20) chybějí (celkem 8x) methoxy skupiny. V exempláři práce, který mám, nemají reference jednotný formát.

V práci jsem také postrádal oddělený seznam vlastních publikací předkladatelky - součástí seznamu použité literatury jsou 2 citace, v nichž je předkladatelka v jednom případě první, v druhém druhou autorkou. Bylo by užitečné znát úplný rozsah její publikační činnosti.

V kapitole Výsledky a diskuse je podán podrobný popis přípravy iontově selektivní membrány a konstrukce elektrody včetně triků, zlepšujících její vlastnosti a/nebo šetřících práci a úsilí při eliminaci chybných kroků, a popis postupů při počítačovém sběru a zobrazování měřených signálů v reálném čase (programy MATLAB/Simulink).

Měření membránového potenciálu a hodnocení funkce dýchacího řetězce bylo prováděno na izolovaných mitochondriích, a v podmínkách *in situ* na permeabilizovaných krysích hepatocytech, buněčných kulturách HeLa G, BSC-40 a transmitochondriálních cybridech odvozených z fibroblastů. Z výsledků, které jsou z valné většiny jasně a přehledně prezentovány a vzápětí diskutovány, mne zaujaly údaje o synergistickém působení *t*-BHP a Ca²⁺ na disipaci $\Delta\psi_m$. Snižování $\Delta\psi_m$ za přítomnosti *t*-BHP, které je necitlivé na inhibitor MPTP cyklosporin A, je připisováno inhibičnímu vlivu *t*-BHP na komplex I dýchacího řetězce, příp. inhibici mitochondriální akonitasy. Odpřahující vliv *t*-BHP, který je citlivý na cyklosporin A, je připisován otevírání MPTP způsobenému *t*-BHP.

K práci mám následující otázky:

- Jak omezí kalibrace elektrody před pokusem vliv driftu elektrody na prováděné měření (str. 60)?
- Proč tab. 3 na str. 61 neobsahuje hodnoty koeficientů selektivity pro Na⁺ a K⁺ získané podle Bakker et al. (1997)? Nebylo je možné určit? V textu jsem nenašel vysvětlení.
- Po přidání FCCP a úplné disipaci protonového gradientu neklesne $\Delta\psi_m$ na nulu, ale zůstane na poměrně vysoké hodnotě (~85 mV v tab. 4, str. 69). To je vysvětleno (str. 73) změnami objemu média a nespecifickou vazbou TPP⁺ na buněčné membrány. Bylo by možné tuto vazbu kvantifikovat?

- Bylo by možno – např. měřením $\Delta\psi$ u intaktních buněk s následným měřením $\Delta\psi_m$ u permeabilizovaných buněk – získat hodnotu jak membránového potenciálu na plasmatické membráně, tak potenciálu mitochondrií? Bylo by možno použít např. model 2 kompartmentů v sérii?
- Není vysvětleno, proč se v pokusech s vlivem Ca^{2+} a *t*-BHP na $\Delta\psi_m$ izolovaných mitochondrií (obr. 38) přidává do reakční směsi rotenon – účinný inhibitor MPTP. Naopak k permeabilizovaným hepatocytům, u nichž byla podle textu na str. 82 ověřována tato aktivita rotenonu, nebyla tato látka přidávána (obr. 39). Obr. 41 představuje podle textu zkoumání vlivu Ca^{2+} a *t*-BHP na koncentraci TPP^+ u permeabilizovaných hepatocytů v přítomnosti 1 mM EDTA. Její přítomnost však v legendě k obrázku není zmíněna.
- Jsou jasně popsány limitace metody, tj. značně obtížná kvantifikace membránového potenciálu mitochondrií u permeabilizovaných buněk vzhledem k neznámému objemu mitochondrií. Vhodný experimentální protokol nicméně umožňuje získat důležité informace o funkčnosti dýchacího řetězce, aniž bychom znali přesnou hodnotu $\Delta\psi_m$. Změny funkce MPTP způsobené Ca^{2+} a/nebo *t*-BHP také vedou ke změnám objemu mitochondrií. Je možno brát korekci na tyto změny u izolovaných mitochondrií?

Závěrem konstatuji, že předkládaná práce je velmi dobře koncipována, a představuje logický sled kroků od konstrukce a testování vhodného nástroje (elektrody citlivé na TPP^+) až k závěrům o důležitých pochodech ovlivňujících mitochondriální funkce (mitochondrial permeability transition) a jejich účast na apoptotických dějích v savčích buňkách. Jde o velmi důležité téma se značným dopadem na medicínu; MPTP hraje zřejmě důležitou roli v patologických stavech zahrnujících např. ischemii/reperfusní poškození myokardu, onemocnění jater, svalů, neurodegenerativní choroby, nebo stárnutí. Práci doporučuji jako podklad pro obhajobu a následné udělení titulu PhD.

Praha, 30.7.2007

Ing. K. Sigler, DrSc.
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

