

## Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Anny Lábjové

### Měření membránového potenciálu pomocí iontově-selektivních elektrod citlivých na tetrafenylfosfóniový kation.

Předložená práce sestává ze 34 stran úvodní teoretické části, která v přiměřeném rozsahu podává základní informaci o oblasti výzkumu, jemuž je disertace věnovaná, a to včetně přehledu současného stavu poznatků vztahujících se bezprostředně k vlastní práci dizertantky. Následují jasně a srozumitelně formulované cíle práce a popis použitých materiálů a metod (4 strany)

Vlastní výsledky, rozdělené do dvou hlavních kapitol zabírají i s diskusí celkem 41 stran. První kapitola je věnována konstrukci a testování iontově selektivní elektrody. Autorka úspěšně modifikovala dosavadní postupy při konstrukci TPP<sup>+</sup> iontově-selektivních elektrod (věnovala se mj. optimalizaci volby TPP<sup>+</sup> soli pro membránu) a sestrojila dobře fungující elektrodu, která se stala základem spolehlivé, počítačem řízené aparatury pro měření  $\Delta\Psi_m$ . Druhá kapitola popisuje sérii demonstračních experimentů. V průběhu obhajoby by se autorka měla vyjádřit k tomu, které z těchto experimentů jsou ideově nové a které naopak představují pouhé opakování již dříve provedených experimentů.

Po formální stránce je disertační práce Anny Lábjové dobře zpracovaná. Autorka se však nevyhnula řadě menších chyb, jejichž soupis následuje:

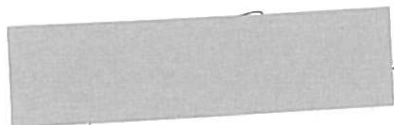
- p.6           Seznam zkratk na je heterogenní směsicí českých a anglických termínů.
- p.8           Autorka zapomněla po dokončení textu uspořádat reference; první reference v textu má číslo [90], druhá [92].
- p.8  
ř.4 zdola    TPP<sup>+</sup> elektrody jsou zde prezentovány jako nástroj měření  $\Delta\Psi_m$  nezátížený rizikem artefaktů. O nutnosti zahrnout do analýzy výsledků měření  $\Delta\Psi_m$  též vazbu na membránu se autorka zmiňuje až ve výsledkové části práce.
- p.12  
Obr. 1A      Nedostatečná legenda k obrázku. Pokud se spolehne pouze na ni, je obrázek v podstatě nesrozumitelný, a tudíž z didaktického hlediska bezcenný.
- p.12  
posl. odst.  
p.13         Text není dostatečně precizní (elektrochemický potenciál čeho?)
- p.13         Rovnice 7 budí zdání obecnosti, avšak v dané podobě platí pouze pro jeden interferující typ iontů, což mělo být explicitně řečeno. Ve výsledkové části však autorka již uvádí, za jakých podmínek můžeme takovou rovnici použít, viz p.60.
- p.13, 14     Autorka nazývá  $K_q^{pot}$  střídavě Nikolského koeficient a koeficient selektivity, aniž by kolísání mezi těmito dvěma alternativami nějak komentovala.
- p.23         Bylo by třeba podrobněji komentovat, jak výsledky měření závisí na „non-nernstian“ akumulaci sondy ve studovaných objektech. Autorka se zmiňuje o vazbě na membrány a zcela ignoruje vazbu na proteiny.
- p.23         Podle Nernstovy rovnice se při  $\Delta\Psi_m = 140$  mV a pokojové teplotě by se měla zvýšit koncentrace kationických sond v matrix oproti mediu cca 200x, a to bez ohledu na objem matrix.
- p.25         Inhibice respirace při použití velmi vysoké koncentrace sondy není specifickou nevýhodou rhodaminů!!! Takto se projeví vysoká koncentrace libovolné kationické sondy. Za výhodu rhodaminů naopak považuji to, že je lze používat při mnohem nižších koncentracích než např. TPP<sup>+</sup>, pokud ovšem opustíme tolik populární „quenching mode“
- p.27  
ř.11 zdola    Neobratná formulace textu, který v podstatě představuje negaci zamýšleného tvrzení (podobně viz p.45, ř.11)

- p.45 Ve výsledkové části chybí číslování rovnic, což komplikuje odkazování se na ně!!!
- p.50 Lze doložit, že tvorba bublin představuje skutečně vážný problém při práci s elektrodami firmy World Precision?
- p.54 Dokáže autorka odhadnout chyby měření jednotlivých kalibračních bodů v obr.19?
- p.68 **Je třeba, aby autorka vyhodnotila reálnou velikost systematické chyby stanovení velikosti  $\Delta\Psi_m$  podle rovnice prezentované na této stránce. Obávám se, že uvádění měřených hodnot  $\Delta\Psi_m$  s přesností na jednotky mV lze považovat za neopodstaněný optimismus.**
- Nicméně je škoda, že se autorka nepokusila převést výsledky prezentované v obr. 31, 33-36 na hodnoty  $\Delta\Psi_m$ .
- p.68 Mluví se zde o změnách objemu média. Není mi jasné, o jaké změny se jedná.
- p.69 Jak byly stanoveny chyby měření uváděné v Tab.4, kde jsou hodnoty  $\Delta\Psi_m$  uváděny dokonce s přesností řádu 0,1 mV!!!
- p.78 Na obr.37A,B jsou uvedeny příklady použití TPP<sup>+</sup> iontově selektivní elektrody při monitorování tranzitivních změn  $\Delta\Psi_m$ . Bylo by užitečné v budoucnosti porovnat tuto metodu s fluorescečními sondami použitými v „non-quenching“ módu (tento námět samozřejmě není výtkou k obsahu a zaměření předložené práce.

Na závěr konstatuji, že i přes výše vypsané připomínky přináší předložená dizertační práce řadu nových významných a prakticky využitelných poznatků. Nejvýznamnější z nich již byly publikovány ve třech článcích v impaktovaných časopisech. Téma práce považuji za velmi aktuální. Autorka použila ve všech fázích své práce adekvátních metod s ohledem na souvislost jejího výzkumu s hledáním nových efektivních metod studia mitochondriálních membránového potenciálu a funkce mitochondrií.

S přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem navrhuji, aby na základě předložené dizertační práce po úspěšné obhajobě byl Mgr. Anně Lábajové udělen akademický titul Ph.D.

V Praze dne 6. 9. 2007



Prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.