

Doktorská disertační práce Mgr. Anny Lábajové: "Měření membránového potenciálu pomocí iontově selektivních elektrod citlivých na tetrafenylfosfóniový kationt."

Vyjádření školitele

Cílem disertační práce byla konstrukce aparatury na měření membránových potenciálů pomocí TPP selektivních elektrod a následné otestování a využití nově zkonstruované aparatury pro měření mitochondriálního membránového potenciálu izolovaných mitochondrií a mitochondrií permeabilizovaných buněk.

Vlastní technický princip měřící aparatury byl znám již od sedmdesátých let. Vlastní měření však bylo provázáno celou řadou technických potíží, které znemožňovaly jejich širší využití v laboratorní a výzkumné praxi. Tyto potíže souvisely především s neadekvátně vysokým šumem, který snižoval citlivost měření. Dalším problémem byla enormní citlivost na způsob manipulace s měřicími elektrodami a následná nestabilita měření, která vedla k opakovaně nereprodukovatelnosti výsledků. Velkým problémem byla i velká poruchovost elektrod v důsledku trhání citlivé membrány. To vše vedlo k tomu, že tato metoda se téměř přestala v laboratorní praxi používat a byla nahrazena fluorescenční metodou měření, která je pouze semikvantitativní, avšak dává reprodukovatelné a snadno realizovatelné výsledky.

Hlavním cílem práce bylo využití současných technologických možností (počítačem řízeného měření a vyhodnocování, nalezení nové technologie složení citlivé membrány, návrh nového konstrukce měřící komůrky a elektrod), které by umožnily využití původního metodiky v nově navrženém technologickém zařízení umožňujícím reprodukovatelná a technicky snadno realizovatelná měření.

Vytvoření nové technologie znamenalo překonat řadu technických a konstrukčních obtíží. Bylo nutno navrhnout takovou měřící aparaturu, která by zabezpečila praktickou nepolarizovatelnost elektrod. Znamenalo to zkonstruovat aparaturu s extrémně vysokým vnitřním odporem a zároveň potlačit šum pro dosažení dostatečné citlivosti měření. Bylo nutno (v několika iteracích) nalézt a navrhnout nový tvar a uspořádání měřící komůrky a elektrod. Především bylo nutné nalézt nové složení měřící membrány (a technologický způsob její výroby), které by zabezpečilo reprodukovatelnost měření.

To vše se po časově velmi náročné práci, provázené testováním a následným překonstruováním řady prototypů, podařilo dosáhnout. Byl vytvořen nový počítačem řízený přístroj, nalezeno nové složení citlivé membrány (a nalezena technologie její výroby), navržen a naprogramován automatizovaný způsob vyhodnocování výsledků měření (v prostředí MATLAB/Simulink) pomocí identifikace matematického modelu s experimentálními daty. Výsledný algoritmus vyhodnocování byl implementován do vyhodnocovacího programu počítače propojeného s přístrojem. Pro novou citlivou membránu byly experimentálně změřeny a vypočteny různými metodami koeficienty selektivity, které charakterizují její chemické vlastnosti a umožňují vyhodnocení výsledků měření.

Experimentálně byla otestována stabilita a reprodukovatelnost měření. Přístroj byl testován měřením membránového potenciálu izolovaných mitochondrií. Výsledky těchto testů byly uspokojivé a nakonec umožnily nasadit tento přístroj pro rutinní laboratorní a výzkumná měření.

O tuto aparaturu projeví zájem i další vědeckovýzkumná pracoviště, kterým byla aparatura poskytnuta.

Nově byla aparatura využita pro měření membránového potenciálu mitochondrií buněk s permeabilizovanou plazmatickou membránou. Na rozdíl od měření na izolovaných mitochondriích tato metodika umožňuje měření membránového potenciálu in-situ se zachovanými kontakty mezi jednotlivými buněčnými organelami a hodnocení funkce dýchacího řetězce, což má i praktické klinické využití pro diagnostiku mitochondriálních nemocí.

Nově navržená metodika měření byla dále využita pro měření vlivu kalcia a prooxidantu na mitochondriální membránový potenciál a na funkci dýchacího řetězce a případně i zapojení mitochondriálního megakanálu (tzv. mitochondrial permeability transition pore), propojujícího vnitřní mitochondriální membránu s mezimembránovým mitochondriálním prostorem.

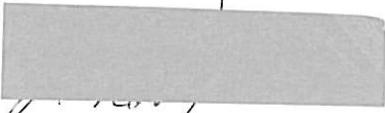
Dosažené výsledky byly prezentovány na mezinárodních konferencích a publikovány v impaktovaných vědeckých časopisech.

Závěrem lze konstatovat, že cíle, kladené v úvodu disertační práce byly splněny.

Prioritním výsledkem bylo vytvoření nové technologické aparatury, umožňující praktickou realizaci kvantitativního způsobu měření membránových potenciálů. Dalším výsledkem bylo využití této aparatury pro studium některých mitochondriálních funkcí a publikace těchto výsledků v impaktovaných časopisech.

Doktorandka splnila všechny požadavky kladené na získání titulu Ph.D. a proto doporučuji tuto práci k obhajobě.

V Praze, 5.6.2007


MUDr. Jiří Kofránek, CSc.
Oddělení biokybernetiky, Ústav patologické fyziologie I. LF UK.
U nemocnice 5,
128 53 Praha 2