

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Elišky Štejnarové:**Vliv obsahových látek vybraných taxonů vyšších rostlin na trombocytární agregaci**

Předložená disertační práce přispívá k systematickému výzkumu sekundárních metabolitů rostlin z čeledi Asteraceae na trombocytární aktivitu (antiagregační a antioxidační účinky). V práci byly testovány sumární extrakty z 32 druhů této taxonomické jednotky. Antiagregační aktivita byla hodnocena na lidských trombocytech in vitro u parchy saflorové při využití několika agonistů (arachidonová kyselina, ADP, kolagen, trombin). Žádný z testovaných taxonů nevykazoval proagregační efekt. Podstatnou částí práce byla příprava extraktů z listů parchy a následná izolace látek s využitím chromatografických postupů a sledováním jejich antiagregačních účinků (sledování IC₅₀).

Práce je formálně přiměřeně rozsáhlá (cca 135 stran textu, obrázků, tabulek a příloh). Zahrnuje vedle popisu a zhodnocení současného stavu znalostí ve studované problematice řadu postupů využitých v experimentální činnosti doktorandky, směřujících zejména k vyhodnocení látek ze skupiny guajanolidů a flavonových aglykonů, postupně izolovaných z výše uvedeného rostlinného zdroje (pro oponenta neznalého botaniky je obr. 6 rostliny na str. 46 velmi užitečný).

Práce je členěna tak, že třístránkový **úvod** uvádí natolik dostatečně do problematiky, že může být následován z něj vyplývajícími **cíli** a poté je čtenář podrobně seznámen v tzv. „**teoretické části**“ s aktuálním stavem znalostí jak ve využití dále použitých metod (morfologie a funkce trombocytů, hemostáza, antiagregancia atp.). Tato část je velmi rozsáhlá a přispívá významně k celkovému počtu citovaných a v práci využitých literárních odkazů (jichž je celkem asi 250). Tato část je zároveň pro orientaci v dalším pracovním postupu, metodách a cílech užitečná, i když některé její části jsou v podstatě učebnicového původu (hemostáza...).

Před **Experimentální částí (6)** jsou zvlášť uvedeny **Metodiky a materiál (5, 11 stran)**, avšak i experimentální část (11 stran) se pak k jednotlivým postupům vrací. Zvlášť je pak uvedena sedmistránková kapitola **Výsledky (7)**. **Diskuse (8, 13 stran)** je hodnotnou částí práce a dosažené výsledky jsou odpovídajícím způsobem srovnávány s literaturou.

Některé poznámky a dotazy:

Celkově v práci hodnotím velmi pozitivně rozbor současného stavu problematiky včetně počtu citovaných prací. Nejsm si však jist, zda bylo třeba uvádět učebnicové údaje typu tabulky 1 (přehled koagulačních faktorů) nebo obr. 2 (přehled mechanismu hemokoagulace). Zdá se, že dále uváděné mechanismy účinků antiagregancí k těmto údajům nemají přímý vztah.

V obr. 3 na str. 25 je jako jeden ze směrů metabolismu kyseliny arachidonové chybně uveden „**lipotoxin**“. Správně má být **lipoxin**.

Co se týká cílů práce, možná by bylo formálně vhodnější jako cíl uvést jen vlastní vyhodnocení účinků látek, zatímco řada dalších předcházejících bodů představuje spíše dílčí kroky na cestě k tomuto cíli. Obdobně tomu by byly užitečné (vedle souhrnu) stručné závěry práce.

V experimentální práci doktorandka využila standardní postupy získání materiálu, čištění a izolace struktur. Vlastní metoda sledování účinku látek s využitím trombocytů a jejich agregace se zdá být jednoduchá a přitom přinášející výsledky. Zajímavé by bylo možná sledovat, jak se v průběhu působení agonistů a zásahu látek s potenciálními antiagregačními účinky mění např. distribuce vápenatých iontů v trombocytech, což by ovšem znamenalo zavést poměrně náročnou metodu využívající fluorescenčního činidla (např. FURA-2).

Dotazy:

Metody – str. 53: jaký byl rozměr sloupců připravených a použitých pro sloupcovou chromatografii?

- V práci byly nalezeny u látek LC-1,... – LC-5 např. rozdíly v antiagregační aktivitě při použití různých agonistů. Bylo by možno (za předpokladu, že mechanismus působení těchto agonistů je na molekulární úrovni znám) alespoň uvažovat na základě těchto vztahů (tj. rozdílů mezi účinkem jednotlivých látek při použití konkrétního agonisty a rozdílu mezi intenzitou efektu při použití různých agonistů u konkrétní látky), jaký je mechanismus nalezeného antiagregačního účinku (opět na molekulární úrovni - podobně, jako je to uvedeno v přehledu již známých antiagregancí v „teoretické části“)?

- Autorka disertace děkuje na začátku písemného elaborátu řadě spolupracovníků za dílčí pomoc při vypracování této práce. Prosím o konkrétní vyjádření podílu doktorandky na získání výsledků práce.

Závěr:

Práce splňuje jak svým rozsahem, tak dosaženými výsledky a jejich hodnocením požadavky, kladené na disertační práci a doporučuji ji k obhajobě.