

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

VYHLEDÁVÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH  
ROSTLINNÝCH SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ:  
TESTY ANTIOXIDAČNÍ A ANTIAGREGAČNÍ  
AKTIVITY

Disertační práce

PharmDr. Zuzana Řeháková

Školitel: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Toxikologie přírodních látek

Hradec Králové 2009

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Luděkovi Jahodářovi, CSc. za podporu v průběhu celého studia a také za vytvoření vhodných podmínek pro odborný růst, za kvalitní vedení a cenné připomínky během experimentů, psaní publikací i sepisování této práce. Nemalé díky náleží také celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvořené zázemí na této katedře a podporu v průběhu celého studia. Zejména velký dík patří PharmDr. Janě Karličkové, PhD., Doc. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. a Mgr. Vítovi Kolečkářovi, za podporu a rady při experimentech i psaní publikací. Speciální dík patří Mgr. Jitce Vytlačilové, která mi umožnila provádět experimenty v laboratoři tkáňových kultur na botanické zahradě Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Ráda bych také poděkovala profesoru Lucianu Sasovi z Univerzity la Sapienza v Římě, který mi umožnil zúčastnit se zahraniční stáže na jeho pracovišti, vytvořil mi kvalitní vědecké zázemí, naučil mě nové metody a daroval mi sérii vzorků pro další testování. Děkuji mu za ochotu a trpělivost a za předání cenných zkušeností.

Děkuji dále PharmDr. Miloslavu Hronkovi, Ph.D. a transfuznímu oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové za kvalitně prováděné odběry krve. Děkuji také kolektivu Oddělení klinické hematologie 2. Interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla prováděna veškerá měření počtu trombocytů. Rovněž chci poděkovat všem dárčům krve, která byla použita v experimentech.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Přemyslovi Mladěnkovi z Katedry farmakologie a toxikologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, za pomoc při řešení grantu Univerzity Karlovy (GAUK 130/50/75011), za předání cenných zkušeností a pomoc při zavádění nových metodik.

V Hradci Králové 2009

Zuzana Řeháková

## PROHLÁŠENÍ O AUTORSTVÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 2009

Zuzana Řeháková

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Antioxidanty, volné radikály .....	9
2.1.1	Endogenní antioxidanty .....	10
2.1.2	Exogenní antioxidanty přírodního původu .....	12
2.2	Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek <i>in vitro</i> .....	19
2.2.1	Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů .....	19
2.2.2	Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů .....	20
2.2.3	Metody eliminace oxidu dusnatého (NO <sup>•</sup> ), peroxinitritu .....	21
2.2.4	Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace .....	22
2.2.5	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek .....	23
2.3	Měření RS (reactive species) v buněčných kulturách .....	23
2.4	Metody stanovení antiagregační aktivity; měření agregace destiček .....	25
2.4.1	Impedanční agregometrie v plné krvi .....	26
2.4.2	Optická agregometrie v PRP .....	26
3	CÍL PRÁCE .....	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1	Materiál a chemikálie .....	30
4.2	Testované látky .....	30

4.3	Metodika měření antioxidační aktivity .....	35
4.3.1	DPPH radikálový test.....	35
4.3.2	FRAP metoda.....	37
4.4	Metodika měření agregace destiček.....	38
4.5	Statistická analýza.....	39
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – VÝSLEDKY .....	40
5.1	Výsledky měření antioxidační aktivity .....	40
5.1.1	Výsledky DPPH testu .....	40
5.1.2	Výsledky FRAP antioxidačního testu.....	52
5.1.3	Výsledky antiagregační aktivity .....	59
6	DISKUSE.....	66
7	ZÁVĚR .....	75
8	SOUHRN .....	77
9	SUMMARY .....	78
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	79
11	SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ .....	87
12	Konference-postery, přednášky .....	88
13	Studijní pobyty.....	90

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
ABTS <sup>•+</sup>	radikál (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ASA	kyselina acetylsalicylová
ATP	adenosintrifosfát
BMPO	5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGPx	cytosolová glutathionperoxidasa
COL	kolagen
DAB	diaminobenzidin
DCFDA	dichlorofluorescin diacetát
DCFH	dichlorofluorescin
DCF	dichlorofluorescein
DHE	dihydroethidin
DHR 123	dihydrorhodamin 123
DMPO	5,5-dimethylpyrroline-N-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpicrylhydrazin
E <sub>A</sub>	anodický potenciál
EGCG	epigallokatechin-gallát
ESR	elektronová spinová rezonance
EtOH	ethanol
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GSH	glutathiontransferasa

HPLC	high performance liquid chromatography, kapalinová chromatografie
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
I <sub>A</sub>	anodický proud
KAT	katalasa
LDL	low density lipoprotein, nízkodenzitní lipoprotein
MDA	malondialdehyd
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NO	oxid dusnatý
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PAF	platelet-activating factor, faktor aktivující destičky
Ph-H	polyfenol
PHGPx	fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidasa
PPP	platelets poor plasma, plazma bez destiček
PRP	platelets rich plasma, plazma bohatá na destičky
RNS	reactive nitrogen species, reaktivní formy dusíku
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RS	reactive species, reaktivní formy
SIA	sekvenční injekční analýza
SOD	superoxiddizmutasa
TBA	thiobarbiturová kyselina
TLC	thin layer chromatography, tenkovrstevná chromatografie
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TIRON	1,2-dihydroxybenzen-3,5-disulfonát
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin
TR	trombin

# 1 ÚVOD

Hledáním a izolací nových látek či extraktů přírodního původu, které by vykazovaly vhodné biologické účinky (např. antioxidační, antiagregační, antifungální, popř. mající schopnost ovlivňovat dělení buněk apod.) se zabývají výzkumné týmy po celém světě. Často jsou hledány takové látky, popř. rostlinné extrakty, které mají výrazný antioxidační účinek a které zároveň disponují jinými, terapeuticky využitelnými účinky např. antiagregační aktivitou. Tyto látky by navíc měly být bezpečné z toxikologického hlediska při běžném užívání. V posledních letech se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze antioxidantů při oxidačním stresu u živých organismů. Kromě celé řady endogenních antioxidantů (koenzym Q, kyselina močová, glutathion atd.) se do oblasti zájmu dostávají zejména přírodní antioxidanty, přijímané potravou. Jednak jsou to antioxidační vitamíny (kyselina askorbová, karotenoidy, tokoferoly) a potom zejména polyfenolické sloučeniny flavonoidy, fenolické kyseliny a katechiny (kondenzované třísloviny, proanthocyanidiny). Tyto látky se běžně nacházejí v ovoci a zelenině, zeleném čaji a v celé řadě léčivých rostlin a jsou zkoumány z důvodu potencionálního využití v prevenci a terapii tzv. civilizačních chorob. Klinické a epidemiologické studie poukazují na vztah mezi příjmem polyfenolů a prevencí některých onemocnění včetně rakoviny, kardiovaskulárních chorob, některých degenerativních chorob či procesu stárnutí. Navíc jsou polyfenoly známé svojí schopností působit protizánětlivě, kardioprotektivně, vasodilatačně, působit proti zvýšené srážlivosti krve, aterogenezi (BALASUNDRAM N., 2006; BRAVO L., 1998).

Většina aktivních látek je přijímána v potravě ve směsi s ostatními látkami, které mohou působit jak synergicky, tak inhibičně. Zjišťování jejich antioxidační aktivity a dalších biologických aktivit (např. antiagregační) může pomoci lépe pochopit jejich mechanismus účinku v živém organismu. Je ovšem nutno dodat, že zjištěné biologické aktivity *in vitro* ještě nemusejí nutně odpovídat aktivitě *in vivo*. Tyto látky podléhají při příjmu potravou v trávicím traktu metabolickým změnám a míra jejich účinku může být tak značně ovlivněna resorpcí a dalším metabolismem. Informací o biodostupnosti a farmakokinetice těchto látek je stále nedostatek a jsou proto předmětem intenzivního studia.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Antioxidanty, volné radikály

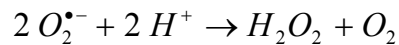
V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agens, které jsou schopny organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.

Pokud atom nebo molekula (ať už neutrální nebo jako ion) obsahuje alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem, částice se nazývá volný radikál. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí organismu. Jejich role v patogenezi různých chorobných stavů je však do značné míry proměnlivá a mnohdy nedostatečně objasněná. Všeobecně se předpokládá, že pro správnou funkci biologických systémů je nutné udržet rovnováhu mezi tvorbou a zánikem reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). K tomu, aby organismus zachoval oxidoredukční rovnováhu a zamezil zvýšené tvorbě ROS a RNS využívá různých mechanismů. Tyto mechanismy umožňují vychytávat již existující ROS (RNS) endogenními a exogenními antioxidanty (tzv. “scavengery“), zamezovat novotvorbě radikálů regulací enzymů, využívat podpory antioxidačních enzymů nebo inaktivovat přechodné kovy (ŠTÍPEK S., 2000).

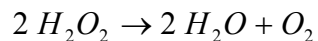
## 2.1.1 Endogenní antioxidanty

### 2.1.1.1 Antioxidační enzymy

K hlavním antioxidačním enzymům patří superoxiddizmutasy (SOD), glutathionperoxidasy (cGPx, PHGPx), glutathiontransferasy (GSH), katalasy (KAT). Superoxiddizmutasy urychlují přeměnu superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku.



Glutathionperoxidasy mají za úkol odstraňovat intracelulární hydroperoxydy. Cytosolová GSH-gluthathionperoxidasa (cGPx), rozkládá hydroperoxydy mastných kyselin, fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidasa (PHGPx) redukuje fosfolipidové hydroperoxydy na neškodné hydroxyderiváty přímo v membránách. Glutathiontransferasy působí v cytosolu, katalyzují konjugační reakci, při které je -SH glutathionu navázána na elektrofilní organickou látku (např. xenobiotikum) a tím významně chrání organismus před následky peroxidace lipidů. Katalasa katalyzuje dizmutaci peroxidu na dioxygen a vodu.



Jako kofaktory antioxidačních enzymů se uplatňují některé stopové prvky např. selen, zinek nebo měď (ŠTÍPEK S., 2000).

### 2.1.1.2 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Řada proteinů lidského těla je schopna vázat přechodné prvky (trojmocné železo, jednomocnou měď) a měnit jejich oxidačně-redukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. V tomto smyslu se mezi antioxidanty řadí transferin v plazmě, laktoferin polymorfonukleárních leukocytů, ceruloplazmin v plazmě, haptoglobin vázající železo z erytrocytů, albumin. Tyto proteiny patřící mezi vysokomolekulární endogenní antioxidanty pevně váží železo ve formě Fe(III) nebo měď ve formě Cu(I) a zabraňují tak jejich účasti při Fentonově (Haberovo-Weissova) reakci, při které vzniká vysoce toxický

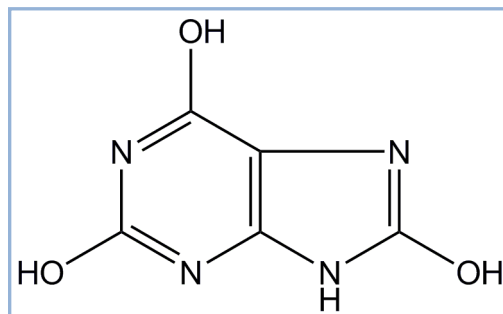


hydroxylový (OH•) radikál. Tranzitní kovy se významně účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v bezpečných deponitních formách. Reaktivitu volných radikálů významně ovlivňují též thiolové skupiny některých proteinů (např. metalothienu, proteiny obsahující mnoho cysteinů), které hrají významnou roli v buněčném jádře. Prostřednictvím síry chelatují ionty kovů. Při oxidačním stresu se zvyšuje jejich syntéza. Poslední studie, také hovoří o reparační úloze chaperonů. Tyto proteiny mají zřejmě schopnost rozeznat oxidací poškozené jiné proteiny, navazují je na sebe a urychlují jejich odstranění v proteosomech (ŠTÍPEK S., 2000).

### 2.1.1.3 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

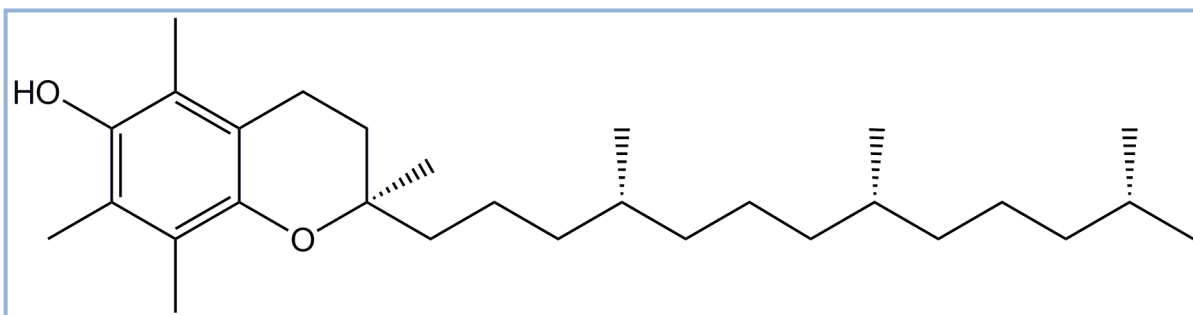
K dalším obranným mechanismům organismu patří nízkomolekulární endogenní antioxidanty. Do této skupiny lze řadit askorbát (vitamín C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), ubichinon/ubichinol (koenzym Q), karotenoidy a vitamin A, thioly a bisulfidy, bilirubin, kyselinu lipoovou, kyselinu močovou a melatonin. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty většinou působí jako tzv. „lapače“

**Obrázek 1 Příklad antioxidačního činidla: kyselina močová**



volných radikálů. Vitamin C je kofaktorem enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. Má schopnost redukovat Fe(III) na Fe(II) a Cu(II) na Cu(I), čímž umožňuje vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivním centru

**Obrázek 2 Příklad antioxidačního činidla:  $\alpha$ -tokoferol**



hydroxylas. Jeho antioxidační účinek spočívá v redukci anorganických i organických radikálů. Všeobecně je přijato (i když ne zcela dokázáno *in vivo*), že askorbát regeneruje tokoferolový radikál, ztrácí elektron a mění se na mnohem méně reaktivní askorbylový radikál. Tokoferol přeměňuje lipidové alkylperoxidové radikály LOO<sup>•</sup> na hydroperoxydy, které jsou odstraněny glutathionperoxidasou. Tím brání oxidaci lipidů membrán. Thioly, disulfidy a další sírné sloučeniny (lipoamid, taurin, homocystein) se významně podílejí na ochraně proti radikálovým reakcím. Glutathion ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin) se snadno oxiduje a s další molekulou glutathionu tvoří glutathiondisulfid. Regeneruje tokoferol a askorbát, chrání sulfhydrylové skupiny cysteinu, ubichinonu a proteinů a je substrátem glutathionperoxidas. Ubichinon “zháší“ peroxylový a alkoxylový radikál a regeneruje tokoferol. Kyselina lipoová reaguje s různými radikály. Podílí se na regeneraci tokoferolu, askorbátu nebo glutathionu. Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamin), hormon epifýzy vykazuje také silnou antioxidační aktivitu. Snadno prochází hematoencefalickou bariérou. Při farmakologických hladinách vychytává hydroxylové radikály. Bilirubin, degradační metabolit hemu má antioxidační význam jak volný, tak vázaný na albumin a jiné proteiny. Inhibuje peroxidaci lipoproteinů, je silným lapačem RNS. Kyselina močová má schopnost vychytávat alkoxylový radikál a kyselinu chlornou, a vázat železo a měď (SHIBATA T., 2003; ROBARDS K., 1999).

### 2.1.2 Exogenní antioxidanty přírodního původu

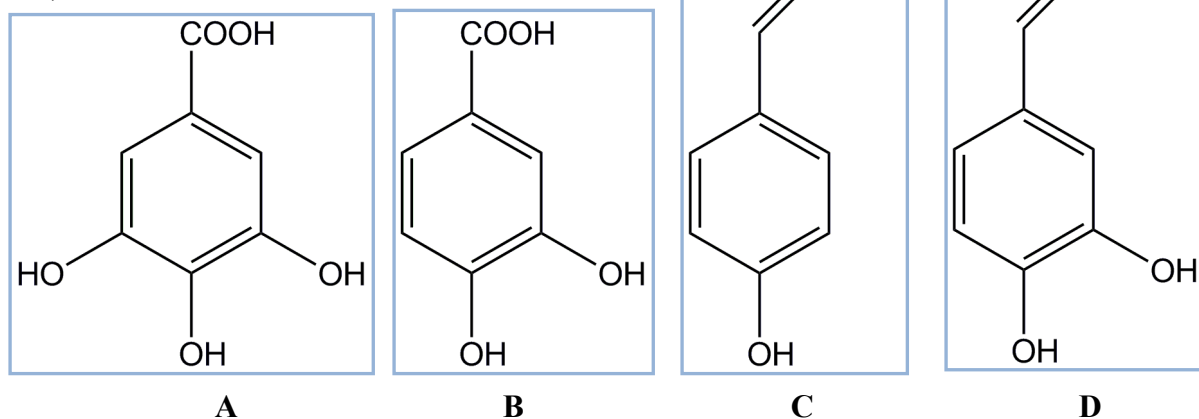
Reparativní procesy v organismu nemohou často samy plně eliminovat poškození biomolekul. Významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku. Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako jsou glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti dostává mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají potravou. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidační vitamíny C, E a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny apod. Zdrojem těchto látek je zelenina, ovoce, čaje, vína a léčivé rostliny.

V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. Klinické epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesu stárnutí. Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu (RICE-EVANS C., 1996).

### 2.1.2.1 Fenolické látky, polyfenoly

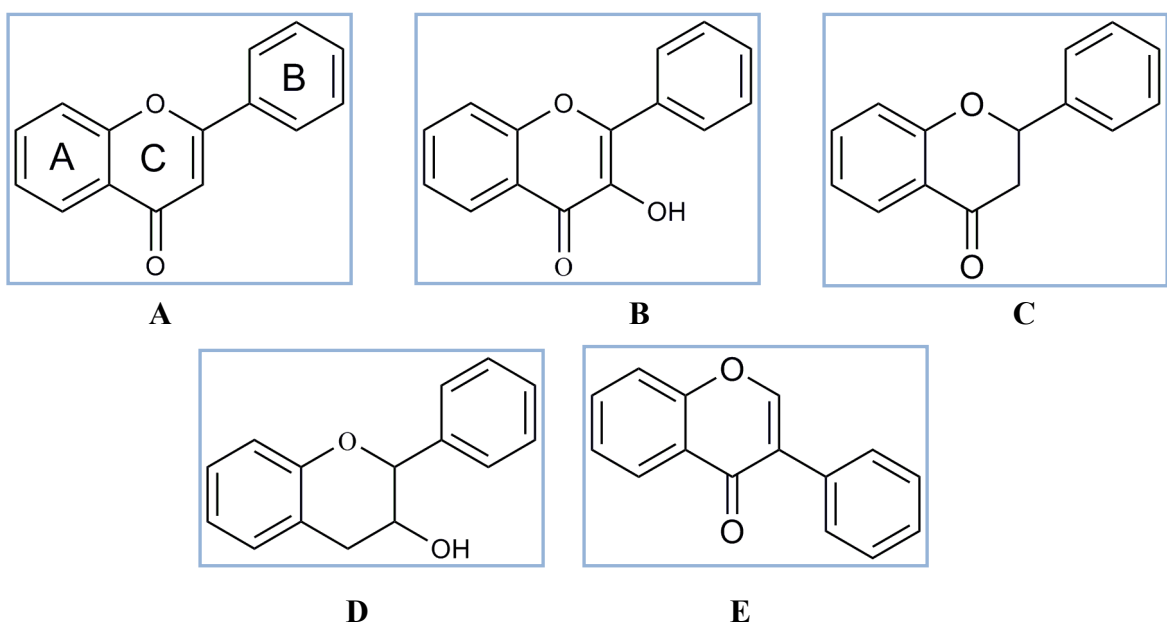
Fenolická struktura se vyskytuje mezi rostlinnými metabolity velmi často. Rostlinné fenoly jsou také častými složkami potravy a krmiva. Chemicky se jedná o širokou skupinu látek rozdílných vlastností odvozených od hydroxybenzenu. K obecně platným charakteristikám patří antioxidační efekt vysvětlovaný jako reakce polyfenolů s volnými radikály: Ph-H (polyfenol) + ROO·(radikál) → Ph· + ROOH, přičemž vznikající polyfenolový radikál (Ph·) je relativně stabilní a není dostatečně aktivní, aby byl karcinogenní.

**Fenolické kyseliny** - vycházejí z kyseliny benzoové (kyselina gallová) a kyseliny skořicové (kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová, sinapová). Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin vůči karboxylu. Obecně platí, že s rostoucím počtem hydroxylů, roste antioxidační aktivita. Antioxidačně aktivnější jsou deriváty hydroxyskořicové kyseliny oproti jiným hydroxybenzoovým kyselinám (ROBARDS K., 1999).



Obrázek 3 Příklady fenolických kyselin: A kyselina gallová, B kyselina protokatechová, C kyselina *p*-kumarová, D kyselina kávová

**Flavonoidy, flavolignany** - jedná se o velice rozsáhlou skupinu látek. Klasifikace do jednotlivých podskupin se u různých autorů liší. Jsou odvozeny od fenylochromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Dle stupně oxidace pyranového kruhu se pak flavany dále dělí na flavany, flaveny, flavanony, flavanoly, flavanonoly, flavandioly, flavony a flavonoly. Flavonoidy jsou předmětem zájmu pro své výrazné antioxidační vlastnosti. Jsou účinné v řadě antioxidačních testů (zhášení radikálů, redukční vlastnosti, inhibice lipidové peroxidace apod.). Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny u látek s *o*-dihydroxy strukturou v kruhu B; 2,3 dvojnou vazbou a 4-oxo funkční skupinou v kruhu C a 5-OH skupinami v kruzích A a C. Tato struktura je typická zejména pro flavonoly. Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematózně. Potencují účinek vitamínu C, mají vlastnosti cholerektické, cholagogenní a spasmolytické. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S  $\text{Ca}^{2+}$  ionty tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle ( FIRUZI O., 2004; ARORA A., 1998; CAO G., 1997). Lignany jsou sekundární metabolity, které vznikají spojováním fenylypropanových jednotek. Pro svůj antioxidační a hepatoprotektivní efekt jsou známy zejména flavolignany *Silybum marianum* (*Asteraceae*). Mají schopnost zabráňovat

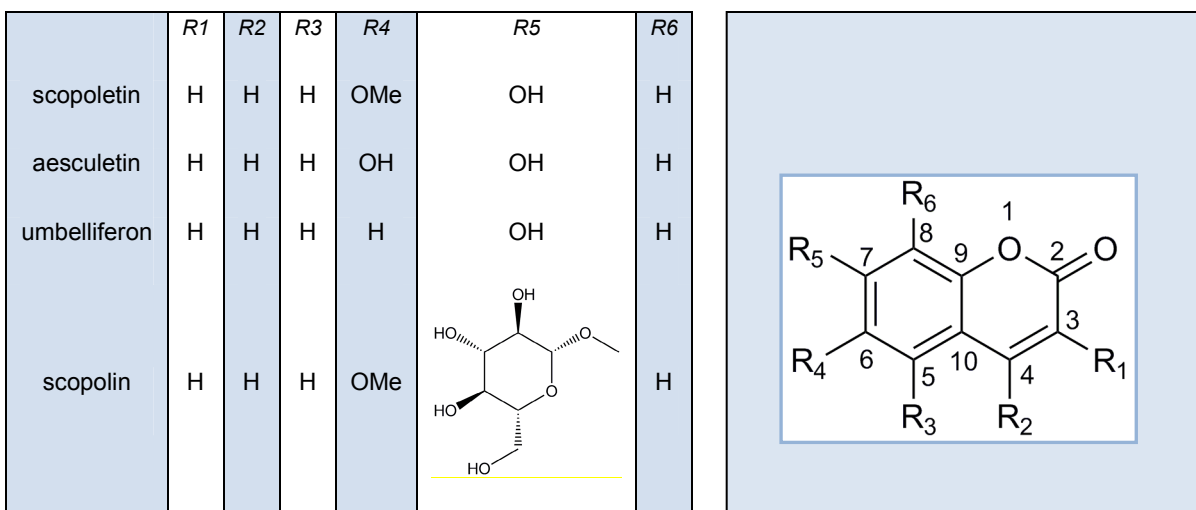


Obrázek 4 Základní typy flavonoidních struktur: A flavon, B flavonol, C flavanon, D flavanol, E isoflavon

lipidové peroxidaci jaterní tkáně (MORAZZONI P., 1995; PETRONELLI A., 1981).

**Kumariny** - tuto skupinu látek lze chemicky označit jako deriváty laktonu *o*-hydroxyskořicové kyseliny (*cis-o*-kumarové). Všechny jsou substituované v poloze C7 hydroxylovou skupinou a dále se stejná funkční skupina může objevovat v polohách C3, C6, C8 (např. umbelliferon, herniarin, eskuletin, scopoletin, fraxetin). Skupiny OH - pak mohou být methylovány nebo glukosylovány. Prenylace na C6 nebo C8 může mimo jiné vést ke vzniku polycyklických kumarinů, jako jsou lineární (psoralen, imperatorin, xanthotoxin, xanthyletin apod.) a angulární (angelicin, sfondin apod.) furano a pyranokumariny. V rostlinné říši existuje téměř tisíc různých variant základní kumarinové struktury. Určité čeledi krytosemenných rostlin jsou na kumariny bohatší např. *Fabaceae*, *Asteraceae* a zvláště pak *Apiaceae* a *Rutaceae*. Jsou obsaženy v běžných zeleninách, jako je celer a petržel, a též v ovoci, např. citrusových plodech (JAHODÁŘ L., 2004). Kumariny vykazují celou řadu biologických vlastností, mají řadu účinků na různé buněčné systémy. Působí tlumivě na CNS, snižují teplotu, mají hypnotické účinky. Některé působí spasmolyticky. Byl u nich prokázán účinek antioxidační, antialergický, protizánětlivý, hepatoprotektivní, antitrombotický, antivirový a antikarcinogenní. Kumariny také velmi silně absorbují UV záření. Některé furanokumariny sensibilizují kůži na sluneční záření a používají se proto k léčení vitiliga. Navíc hrají důležitou roli při biochemických a fyziologických procesech probíhající v rostlinách, působí jako antioxidanty, enzymové inhibitory a prekurzory

**Obrázek 5** Příklady kumarinů přírodního původu: scopoletin, aesculetin, umbelliferon, scopolin



toxických látek. Jsou součástí procesu rostlinných hormonů, růstových regulátorů, kontroly rostlinného dýchání, fotosyntézy a obrany proti infekci (KOSTOVA I., 2006; KOSTOVA I., 2005; FYLAKTAKIDOU K. C., 2004; RIETJENS I. M., 2005; GALVANO F., 2001). Z toxikologického hlediska jsou významné zejména furanokumariny, které jsou potentními primárními fotosenzibilizujícími jedy. Tyto fotosenzibilizátory se dostávají po konzumaci krevním oběhem do pokožky, kde jsou příčinou abnormální reakce kůže na sluneční záření (především UV). Na molekulární úrovni je zjištěno, že furanokumariny mohou způsobit cykloadice v polohách 3, 4 nebo 4', 5' nebo oboje s pyrimidinovými bázemi DNA, mohou se zabudovat do nukleových kyselin a poškodit genom. Takto lze vysvětlit jejich mutagenní a karcinogenní vlastnosti (tvorba melanomů). Na úrovni buněčné jsou popisovány: anomálie v buněčném dělení, změna permeability membrán a s tím související změny v aktivních transportních procesech, poruchy glykolýzy a buněčného dýchání, poruchy syntézy bílkovin a DNA a buněčná smrt. Počáteční svědění, pálení a celkový neklid se může vyvinout až do formy generalizované fototoxické reakce charakterizované erytremem a edémem, častými sekundárními infekcemi, které mohou vést až k nekrotizaci velkých ploch pokožky. Z celkových příznaků se může objevit žloutenka.

Furanokumariny mohou být také příčinou alergické kontaktní dermatitidy a fotodermatitidy. Bohatá na furanokumariny je zejména čeleď *Apiaceae*. Lineární nesubstituovaný furanokumarin **psoralen**, jehož zdrojem jsou např. *Coronilla glauca* z čeledi *Fabaceae*, nebo *Heracleum lestonii*, *Petroselinum crispum* z čeledi *Apiaceae* je látka mající významné fotobiologické účinky včetně fototoxicity, zvláště pak při působení UV záření. Poškozuje syntézu DNA a působí jako fotokarcinogen. Jeho derivát, lineární furanokumarin **bergapten** (5-methoxypsoralen), jehož zdrojem je např. bergamotová silice získaná z *Citrus bergamia*, *Ruta graveolens*, *Angelica spp.*, *Heracleum giganteum*, vykazuje tlumivý účinek na CNS, při kontaktu s pokožkou a intenzivním světlem způsobuje fotodermatitidy. Je vysoce toxický pro ryby. Dalším derivátem psoralenu je **xanthotoxin** (8-methoxypsoralen, methoxalen), jehož zdrojem je *Ammi majus*, *Angelica archangelica*, *Heracleum sphondylium* apod. z čeledi *Apiaceae* a *Fragaria* a *Ruta spp.* z čeledi *Rutaceae*. Jedná se o významný fotosenzibilizátor. Je příčinou kontaktních dermatitid. Toxikologicky významné jsou také **ferprenin** a **ferulenol**, které se vyskytují v latexu *Ferula communis*, *Apiaceae* a mají významnou antikoagulační aktivitu. Popsána je jejich vysoká toxicita pro ovce s typickým projevem



ležícího zvířete krvácejícího z nozder, průjmem s nesraženou krví, hematurií. Významný hemoragický efekt způsobuje **kumarin**. Jeho zdrojem je celá řada kaprad'orostů z čeledi *Polypodiaceae*, nahosemenných rostlin z čeledi *Pinaceae*. V krytosemenných rostlinách je často glykosidicky vázán a nachází se zejména v čeledi *Fabaceae* a *Poaceae*. Působí jako antagonist vitamínu K, čímž dochází k blokadě tvorby protrombinu a řady dalších hemokoagulačních faktorů v játrech. Benzofuranový derivát **tremeton**, jehož zdrojem jsou některé druhy čeledi *Asteraceae*, způsobuje svalovou slabost provázenou tremorem, nauzeou, vomitem, anorexií a křečemi. Dlouhodobé zkrmování rostlin s obsahem této látky může vést až k tukové degeneraci jater, kómatu a smrti. Cytotoxicita byla prokázána také u **xanthyletinu, mammeisinu a mikromelinu** (JAHODÁŘ L., 2004).

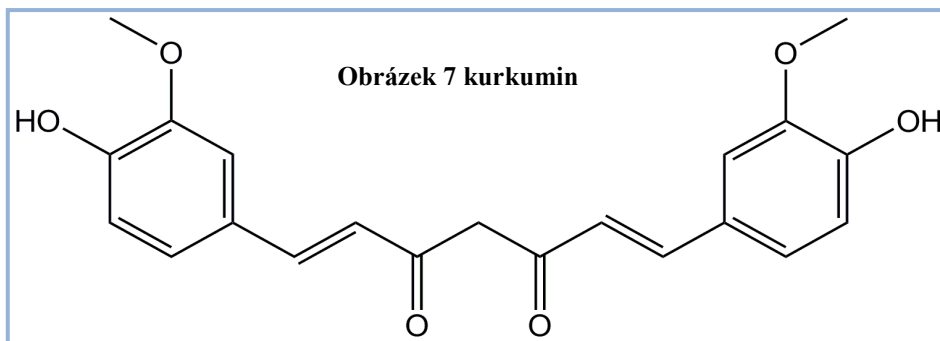
**Kurkuminoidy** – skupina sekundárních metabolitů patřící mezi tzv. fenylypropany, respektive arylheptanoidy. Tyto látky byly izolovány z oddenků *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). Patří

sem zejména kurkumim, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin, tetrahydrokurkumin. Kurkuminu jsou přisuzovány účinky protizánětlivé, antikarcinogenní, antiHIV. Má schopnost inhibovat lipidovou peroxidaci v různých tkáních, zhaset superoxidový anion a peroxid vodíku (RUBY A.J., 1995; RAMSEWAK R.S. 2000).

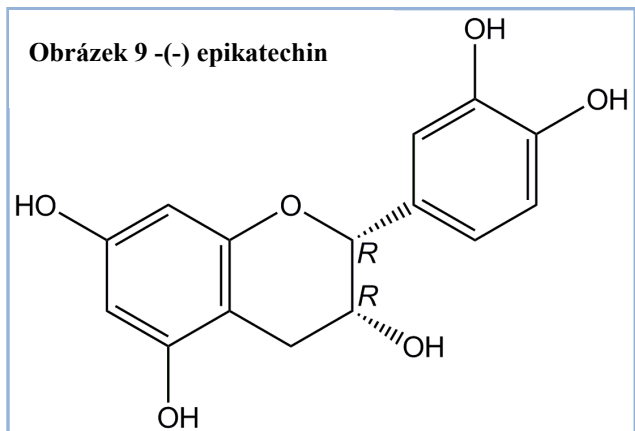
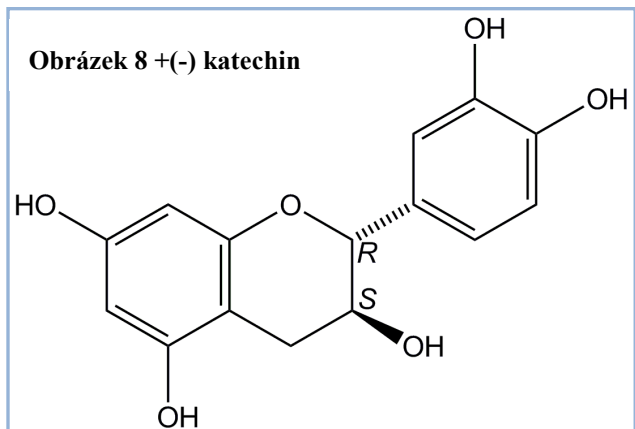


Obrázek 6 Oddenek *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*)- zdroj:

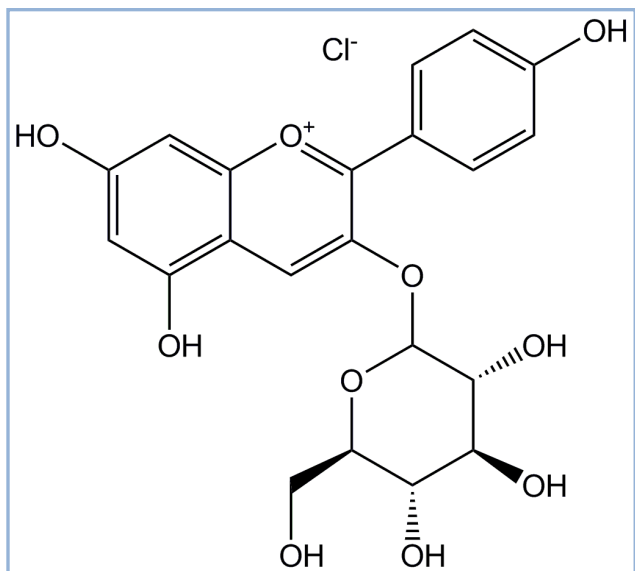
[http://www.indianetzone.com/1/images/spices\\_138.jpg](http://www.indianetzone.com/1/images/spices_138.jpg)



**Proanthocyanidiny** - jsou kondenzované třísloviny. Mohou mít oligomerní nebo polymerní strukturu. Vycházejí z katechinů (flavan-3-olů), základní jsou (+)-katechin a (-)-epikatechin. Tyto antioxidanty mají schopnost chránit cévní stěny, střevní sliznici, jaterní tkáň. Proanthocyanidiny vykazaly účinek proti celé řadě radikálů, mají schopnost chelátovat kovy a inhibovat prooxidační enzymy (např. lipooxygenasu, syntasu oxidu dusnatého) (SHIBATA T., 2003; MASAMOTO Y., 2003). Zhášecí aktivita u těchto látek roste s počtem hydroxylů, obzvláště jsou-li v *ortho*-uspořádání vázané na kyselinu gallovou (CAI Y. Z., 2006).



**Anthokyaniny** - jedná se o hydroxyderiváty flavyliových solí (trihydroxybenzopyriliový kationt). Jsou rozmanitě zbarveny od modré přes fialovou až po červenou, barva závisí na struktuře a taky pH v rostlině. Nacházejí se např. v zeleném čaji *Camellia sinensis* (*Theaceae*), v červeném vínu nebo je můžeme nalézt v plodech např. *Vaccinium myrtillus* (*Vaccinaceae*). Patří sem např. glykosidy cyanidinu, pelargonidinu, petunidinu, malvidinu apod. Jsou to látky strukturou značně podobné flavonoidům,



Obrázek 10 anthokyanin

vykazují také celou řadu anti-ROS a anti-RNS účinků (PI-JEN TSAI, 2002; EINBOND L.S., 2004).

## 2.2 Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*

Literatura nabízí velké množství metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Je to dáno tím, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Obecně se metody stanovení antioxidační aktivity *in vitro* dají rozdělit do dvou základních skupin – metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály (zhášení, vychytávání) a metody hodnotící redoxní účinnost antioxidantů.

Metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály lze dělit podle radikálů, vůči kterým se antioxidační aktivita sleduje. Mohou to být syntetické radikály (DPPH, ABTS, glavinoxyl, Fredyho sůl atd.) nebo reaktivní formy kyslíku (superoxidový, hydroxylový radikál, kyselina chlorná, peroxid vodíku) nebo dusíku (oxid dusnatý, peroxinitrit).

### 2.2.1 Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

#### 2.2.1.1 Metoda DPPH

Metoda používající DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl) radikál patří k základním metodikám testování antiradikálové aktivity čistých látek i směsných vzorků. Vzorek reaguje s DPPH, při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpicrylhydrazin). Reakce je vyhodnocována spektrofotometricky. Metoda je používána v různých modifikacích, jako např. v kombinaci s HPLC, SIA (sekvenční injekční analýza), FIA (průtoková injekční analýza), TLC, nebo ESR (elektronová spinová rezonance) (ESPIN J. C., 2000; NANJO F., 1996; DU TOIT R., 2001).

#### 2.2.1.2 Metoda ABTS (metoda TEAC)

K základním metodám využívající syntetické radikály patří metoda využívající ABTS<sup>+</sup> radikál (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), jehož úbytek se sleduje spektrofotometricky. Je také označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant

capacity), neboť výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Zhášení radikálu  $ABTS^{•+}$  antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra  $ABTS^{•+}$  (nejčastěji se měří absorbance při 734 nm). V reakční směsi se kationt-radikál  $ABTS^{•+}$  generuje oxidací ABTS např. pomocí systému  $ABTS/H_2O_2$ /peroxidasa nebo  $ABTS$ /methmyoglobin/ $H_2O_2$ . V literatuře jsou také uváděné i možnosti chemické oxidace ABTS (např. oxidem manganičitým, peroxodisíranem draselným).  $ABTS^{•+}$  radikál se může generovat během vlastního měření, nebo již může být v reakční směsi přítomen. Metoda je použitelná jak v hydrofilním tak lipofilním prostředí (ARNAO M. B., 2001; RICE-EVANS C., 1995; MILLER N. J., 1996).

## 2.2.2 Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

### 2.2.2.1 Metoda ORAC

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu nebo fluoresceinu po kontaktu s radikály. Generovány mohou být jak hydroxylové, tak peroxylové radikály. Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty (CAO G., 1997; OU B., 2001).

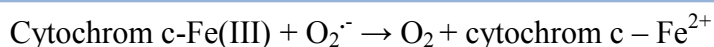
### 2.2.2.2 Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Metody založené na eliminaci hydroxylového radikálu používají různé postupy jeho generování. Jedná se např. o Fentonovu reakci, UV fotolýzu peroxidu vodíku, fotolýzu syntetických derivátů. Detekce je založena na základě vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit např. s kyselinou salicylovou (reakční produkty hydroxylované kyseliny salicylové se detekují metodou HPLC s UV detekcí) nebo s DMPO (5,5-dimethylpyrrolin-N-oxid)(vzniklý adukt je detekován metodou ESR nebo HPLC ve spojení s elektrochemickou detekcí) nebo s deoxyribosou (její degradační produkty jsou

detekovány po reakci s TBA spektrofotometricky). Výhodou tohoto postupu je možnost stanovit antioxidační i prooxidační vlastnosti látek (YOSHIOKA H., 2001; PAULOVA H., 2000; HUSAIN S. R., 1987).

### 2.2.2.3 Metody založené na vyčytávání superoxidového radikálu ( $O_2^{\cdot-}$ )

Při hodnocení eliminace superoxidového radikálu *in vitro* se využívá jeho generování neenzymaticky např. reakcí 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH nebo enzymaticky, při které se radikál  $O_2^{\cdot-}$  tvoří reakcí xantinoxidasy s xantomem nebo hypoxantinem. Superoxidový radikál redukuje nitrotetrazolinovou modř na formazan, modrou sloučeninu, která vykazuje maximum absorpce při vlnové délce 550-560 nm. Znamé jsou i další způsoby detekce, např. ESR metoda na základě reakce superoxidového anion radikálu s DMPO nebo BMPO (5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid), nebo kombinace HPLC a chemiluminiscence, nebo reakce  $O_2^{\cdot-}$  s cytochromem c. Reakce  $O_2^{\cdot-}$  s cytochromem c je poměrně jednoduchá, nicméně mnoho jiných substancí je schopno redukovat cytochrom c (zejména askorbát) a mohou tak interferovat s  $O_2^{\cdot-}$  detekcí. Jako další detekční molekula se používá Tiron (1,2-dihydroxybenzen-3,5-disulfonát). Při reakci s  $O_2^{\cdot-}$  vzniká semichinon, který je měřen pomocí ESR. Dále byly popsány také histochemické detekce  $O_2^{\cdot-}$  v tkáních. Např. reakce s tetrazolinovou solí může vést k mikroskopicky pozorovatelné formazanové sraženině. Nebo je známá přeměna DAB (diaminobenzidinu) na nerozpustný produkt (LU Y., 2001; UNNO T., 2002; DAPKEVICIUS A., 2001; GOSH M., 2002; DIKALOV S., 2005; HALLIWELL B., 2004).



### 2.2.3 Metody eliminace oxidu dusnatého ( $NO\cdot$ ), peroxinitritu

Mezi základní postupy stanovení oxidu dusnatého patří stanovení za využití Griessova činidla. Jedná se o nepřímé stanovení  $NO\cdot$ . Konkrétně se stanovují stabilní dekompoziční produkty  $NO\cdot$  - dusičnany a dusitany. Nitroprusid sodný ve vodném roztoku za

fyziologického pH spontánně produkuje oxid dusnatý, který po reakci se vzdušným kyslíkem produkuje dusitanové ionty. Dusitanové ionty přes kyselinu dusitou poskytují nitrační činidlo ( $N_2O_3$ ), které reaguje s kyselinou sulfanilovou za tvorby diazoniového kationu, který následně kopuluje s N-(1-naftyl)-ethylendiaminem za tvorby azosloučeniny vykazující maximum absorpce při 543 nm (Griessova reakce). K přímému stanovení  $NO\cdot$  a  $NOO\cdot$  patří reakce s oxyhemoglobinem popř. s methemoglobinem. Vzniklý nitrosylhemoglobin je dále měřen spektrofotometricky nebo pomocí ESR.  $NO\cdot$  také oxiduje ferrokyanid na ferrikyanid, jehož maximum absorpce je 420 nm. Peroxynitrit oxiduje barvivo dihydrorhodamine 123 na rhodamine 123, které fluoreskuje při 536 nm. Dále také nitratuje řadu aromatických sloučenin. Nitrace tyrosinu je měřena spektrofotometricky, produkt 3-nitrotyrosin má žlutou barvu. Dále lze k detekci použít HPLC, plynovou chromatografii nebo hmotnostní spektrometrii (TARPEY M. M., 2004; FROST M.T., 2000; ISCHIROPOULOS H., 2003).

#### 2.2.4 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat iniciační kyslíkové radikály, sekundárně vzniklé radikálové meziprodukty (peroxyly, alkoxyly) nebo mohou působit také jako látky chelatující ionty přechodných kovů. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů. Od jednoduchých, které se provádí s jednoduchými lipidy v jednoduchém systému (např. hodnocení produktů peroxidace linolové kyseliny nebo hodnocení sekundárního produktu lipidové peroxidace malondialdehydu na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou), až po složitější biologické modely na mitochondriích, LDL částicích nebo tkáňových homogenátech. Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace MDA (malondialdehydu) na základě jeho barevné reakce s TBA (kyselinou thiobarbiturovou). Stanovení produktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, měří se absorbance při 532 nm (YAMANAKA N., 1997; VAN DER SLUIS A. A., 2000; DAGLIA M., 2000; NIELSEN F., 1997).

## 2.2.5 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

### 2.2.5.1 Metody chemické

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power) je založena na principu redoxního účinku antioxidantů, na redukcí komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) antioxidanty ve vzorku. Nárůst absorbance odpovídající množství komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) je mírou antioxidační aktivity vzorku a sleduje se spektrofotometricky. Metoda FRAP odráží pouze schopnost látek redukovat iont  $\text{Fe}^{3+}$  (OU B., 2002).

### 2.2.5.2 Metody elektrochemické

Cyklická voltametrie hodnotí schopnost látek odštěpovat elektrony. Na elektrodu se vkládá napěťový pulz s určitou rychlostí polarizace a sledují se proudové odezvy v roztoku studované látky. Záznam zachycuje křivka-tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry - z potenciálu anodického oxidačního píku  $E_A$  a jeho anodického proudu  $I_A$ . Čím je nižší hodnota  $E_A$ , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku  $I_A$  je možné určit koncentraci látek. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty  $E_A$  korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami např. s lipoperoxidací, DPPH, FRAP metodou (RAPTA P., 1995; NAKAMURA T., 1998; FIRUZI O., 2005).

## 2.3 Měření RS (reactive species) v buněčných kulturách

Je popsáno mnoho metod určených k měření RS v buněčných kulturách. Produkce RS v buňkách může být měřena pomocí aromatických látek, spinovým záchytem, měřením míry poškození biomolekul, měřením lipidové peroxidace popř. využití různých fluorescenčních metod. Nejznámější je užití DCFDA (dichlorofluorescein diacetát). DCFDA proniká do buněk a akumuluje se zejména v cytosolu, kde je esterásami deacetylován na DCFH a různými RS převeden na DCF (dichlorfluorescein), který po excitaci okolo 488 nm může být detekován při 525 nm. Touto metodou se dá určit celá řada radikálů např. ( $\text{RO}_2^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{ONOO}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$  apod.). Další známou fluorescenční látkou je DHR 123 (dihydrorhodamin 123). Sloužící k detekci celé řady radikálů s výjimkou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nebo  $\text{NO}^\cdot$ , po přeměně na

rhodamin se akumuluje se v mitochondriích. DHE (dihydroethidin) slouží k detekci  $O_2^{\cdot-}$ , je oxidován na fluorescenční produkt 2-hydroxyethidium. Dále jsou známy luminol a lucigenin, sloučeniny určené k detekci RS produkovaných aktivovanými fagocyty a buňkami endotelu (HALLIWELL B., 2004; TARPEY M.M., 2004; GIULIVI C., 1999; FREITAS I., 2002).



## 2.4 Metody stanovení antiagregační aktivity; měření agregace destiček

Termín "agregace destiček" vyjadřuje proces adheze jedné destičky ke druhé. Tento jev může být indukován přidáním látek vyvolávajících agregaci do plazmy obohacené destičkami nebo do plné krve. Destičky adherují za různých podmínek a v přítomnosti rozličných látek. Průběh agregace destiček závisí na koncentraci vápenatých iontů, fibrinogenu a přítomnosti jednoho či více plazmatických faktorů. Agregace proběhne specificky v závislosti na typu látky vyvolávající agregaci a na její koncentraci. Pro optickou agregometrii se jako faktory indukující agregaci (agonisté agregace) používají AA (arachidonová kyselina), ADP (adenosindifosfát), epinefrin, COL (kolagen), TR (trombin) a ristocetin. ADP a epinefrin jsou obsaženy v organelách destiček, odtud jsou uvolňovány při tvorbě primární trombocytární zátky, čímž podporují další agregaci destiček. COL je přítomen v endotelu cév a je považován za první srážecí nebo pro-koagulační faktor, se kterým se setkají destičky po cévním poranění. Tím jsou *in vitro* studie reakce destiček na COL velmi významné. Ostatní látky jako jsou TR, kalciový ionofor A23187, AA, ristocetin, bovinní faktor VIII a 5-HT (5-hydroxytryptamin, serotonin) mají také svůj význam pro studium srážlivosti, ale spíše pro specifitější účely (JUN D., 2005).

Agregace destiček *in vitro* umožňuje v klinické praxi kontrolu funkce destiček (INGERMAN-WOJENSKI C.M., 1984; PODCZASY J. J., 1997; SIRRIDGE M., 1984) a dovoluje tak najít vhodnou terapii pro pacienty s poškozenou funkcí srážení a poznání dědičných dysfunkcí (O'BRIEN J. R., 1962). Je však také vhodnou metodou, která umožňuje určit, zda látka přidaná k nativním trombocytům před samotným agonistou agregace ovlivňuje jím následně vyvolaný proces agregace, tedy zda látka působí pro- nebo antiagregačně.

Obvykle jsou používány dva základní typy agregačních testů: impedanční agregometrie v plné krvi a optická agregometrie v PRP (platelet rich plasma).

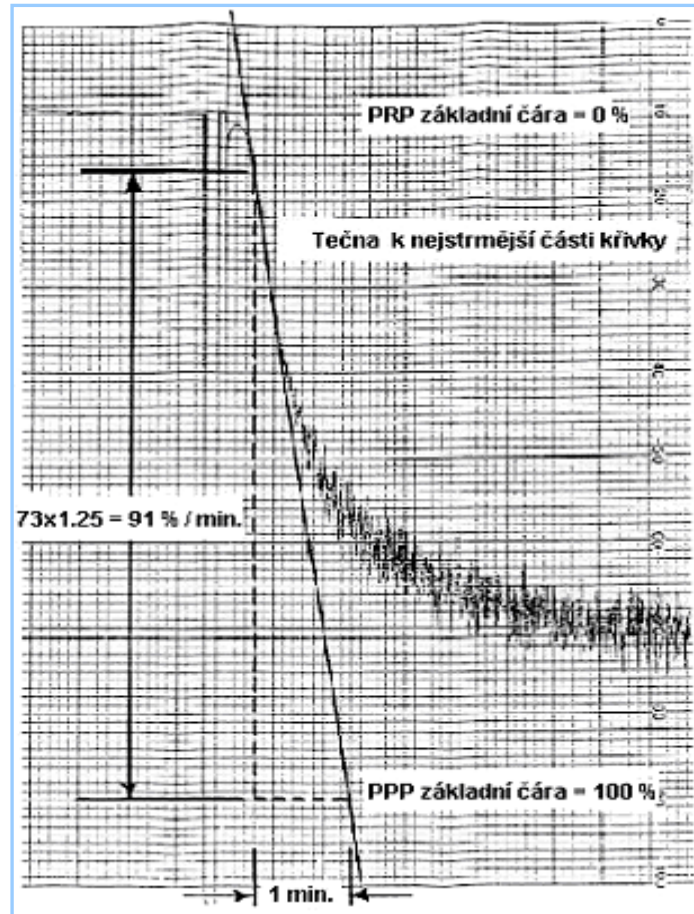
### 2.4.1 Impedanční agregometrie v plné krvi

Průběh agregace je sledován přímo v plné protisrážlivě upravené krvi, bez nutnosti separace destiček od ostatních krevních elementů, jako je tomu v případě optické agregometrie. Nevýhodou metody je oproti optické agregometrii větší spotřeba krve pro jedno měření (1 ml). Do temperované kyvety se vzorkem se před vlastním měřením ponoří elektroda sestávající ze dvou platinových drátků oddělených vzduchovou mezerou. Měřícím okruhem elektrody prochází malé střídavé napětí (zabrání se tak elektrolýze) řádu milivoltů. Agregometr měří elektrický odpor či jeho převrácenou hodnotu (vodivost) mezi vloženými elektrodami. Během krátkého času se ustaví na platinových drátcích elektrody rovnováha, kdy na jejich povrchu dojde k vytvoření jedné vrstvy destiček. Po ustálení impedance je tato hodnota nastavena jako základní (nulová) hodnota, která u impedanční agregometrie nahrazuje kontrolu. Jakmile je látka vyvolávající agregaci přidána do kyvety, stimulované destičky adherují na původní vrstvu destiček vytvořenou na elektrodách. Tato postupná adheze destiček způsobí růst elektrického odporu mezi elektrodami. Tato změna elektrického odporu je udávána v ohmech. Doba sledování průběhu agregace trombocytů je 4 - 6 minut po přidání agonisty.

Nárůst impedance odpovídá proporcionálně nárůstu hmotnosti agregovaných destiček. Impedanční metoda je poměrně citlivá na stavy hyperagregability či na přítomnost léků jako jsou ASA, dipyridamol a jiné léky ovlivňující agregaci. Není ovlivněna optickými vlastnostmi vzorku, může být analyzována krev obsahující větší množství lipidů nebo krev trombocytopenická (JUN D., 2005; CHRONO-LOG CO., 1996).

### 2.4.2 Optická agregometrie v PRP

Destičky v suspenzi plazmy jsou izolovány ze vzorku plné krve s protisrážlivou úpravou odstředěním při nízkých otáčkách. Tím se získá PRP – což je plazma, ve které jako majoritní krevní elementy převažují trombocyty. Odstředěním při vysokých otáčkách se získá takzvaná PPP (platelet poor plasma), tedy čistá plazma bez krevních elementů. Agregometr Bornova typu (BORN G.V. 1962; O'BRIEN J.R. 1962) nebo optický agregometr je spektrofotometr s fixní vlnovou délkou s prostorem na vzorky termostatovaným na teplotu 37°C. Protože pro agregaci destiček *in vitro* je nutný jejich vzájemný kontakt, je zajištěno míchání testovaného



Obrázek 11 Průběh agregační křivky – zdroj: JUN D., 2005

vzorku během měření magnetickým míchadlem, které se vkládá do kyvety před započítáním měření. Vlastní měřicí prostor je u agregometru Chrono-log 500-Ca řešen tak, že paprsek infračerveného záření o vlnové délce 950 nm prochází skrz dvě kyvety, z nichž jedna obsahuje PRP (vzorek) a druhá PPP (kontrola). Křemíkové fotodiody detekují záření prošlé skrz kyvety se vzorky: PRP je považována za vzorek s 0% transmitancí či agregací a PPP za vzorek se 100% transmitancí či agregací. Každá kyveta má svůj zdroj záření i snímač, principem jde tedy o dvoupraskový fotometr. Rozdíl ve výstupním signálu fotodiody pak vypovídá o aktuálním stavu transmitance (neboli agregace) měřeného vzorku, jelikož vznikající agregáty trombocytů kontinuálně zvyšují optickou propustnost vzorku.

Stiskem tlačítka na agregometru se nastaví hodnoty pro 0% a 100% transmitanci. Pro testování je nutný početní rozdíl trombocytů mezi testovaným a referenčním vzorkem minimálně  $30 \times 10^9/l$  plazmy. V případě že rozdíl transmitance obou vzorků klesne pod hodnotu odpovídající této koncentraci, výstup agregometru upozorní obsluhu na chybu. Poté

co je přidán do PRP agonista agregace a destičky začínají reagovat, nastávají odpovídající změny v transmitanci a jsou kontinuálně zaznamenávány připojeným počítačem.

Jakmile destičky prodělají tvarovou změnu jako odpověď na stimul (agonistu, agregační látku), jejich větší rozměr způsobí snížení průchodu světla skrz PRP a tím se sníží relativně k PPP aktuální transmitance. Jestliže je dávka látky dostačující k vyvolání vzájemného shlukování destiček a k vytvoření destičkových agregátů, zvýší se naopak průchodnost vzorku pro infračervené záření. Naměřené hodnoty transmitance se postupně blíží k úrovni odpovídající PPP.

Charakteristickými znaky, které je možno pozorovat na získaných agregačních křivkách, jsou:

- změna tvaru destiček
- první vlna agregace (primární agregace, reverzibilní) - naměřená křivka se může vrátit zpět k základní čáře PRP
- druhá vlna agregace (sekundární agregace, ireverzibilní) nastane, když látky uvolněné z granul destiček způsobí stimul vedoucí ke kaskádě dalších dějů vedoucích ve výsledku k agregaci

Agregační křivka je dále charakterizována:

- maximální změnou velikosti transmitance způsobené agonistou (% agregace)
- směrnici neboli intenzitou agregace (% změny agregace za minutu)

Rozdílné koncentrace agonistů se potom využívají pro získání hodnot  $EC_{50}$ . Preinkubace destiček s testovanou látkou po určité době před přidáním agonisty agregace umožňuje zhodnocení jejího vlivu na tento proces a zjištění odpovídajících hodnot  $EC_{50}$ . Spotřeba PRP činí 0,25 nebo 0,5 ml pro jedno měření (JUN D., 2005; CHRONO-LOG CO., 1996).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) vyhledávání aktivních rostlinných sekundárních metabolitů a jejich syntetických derivátů, zaměření zejména na jejich antioxidační a antiagregační aktivitu
- 2) určování antioxidační aktivity: metodou zhašení volných radikálů (DPPH test) a železito- redukčním testem (ferric reducing antioxidant power-FRAP)
- 3) měření antiagregační aktivity vzhledem k použitým agonistům agregace
- 4) porovnávání antioxidační a antiagregační aktivity látek ze skupiny polyfenolů, kumarinů rostlinného původu izolovaných z *Evolvulus alsinoides* (*Convolvulaceae*), kumarinů vyskytujících se v *Trigonella foenum-graecum* (*Fabaceae*) a *Eupatorium pauciflorum* (*Asteraceae*) a 16 syntetických kumarinů získaných od Prof. Sasa (Department of Human Physiology and Pharmacology “Vittorio Erspamer”, University La Sapienza, Roma, Italy)
- 5) určování vztahu mezi strukturou a účinkem daných látek

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a chemikálie

**agregační agonisté (AA, ADP, COL)** – Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)

**citran sodný 3,6%** - Biotika (Slovenská Lupča, Slovensko)

**DMSO bezvodý p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**EtOH 95% denaturovaný 1% methanolem** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**DPPH radikál (95%)** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (heptahydrát síranu železnatého) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (hexahydrát chloridu železitého) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**NaOH (hydroxid sodný) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**kyselina acetylsalicylová (99%) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**kyselina chlorovodíková 36% p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**kyselina octová (99%) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**methanol p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O (trihydrát octanu sodného) p.a.** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**voda čištěná reverzní osmózou** - připravovaná na Katedře analytické chemie (Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká Republika)

### 4.2 Testované látky

**trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (97%)** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**kyselina askorbová (99%)** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**(+)-katechin (98%)** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**Quercetin (98%)** - Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**EGCG (epigallokatechin-gallát) 90%** - extrahovaný ze zelených listů *Camellia sinensis* (*Theaceae*), Abatra Natural Chemicals, katal. č. A2-007

**trans-resveratrol 95%** - izolovaný z *Polygonum cuspidatum* (*Polygonaceae*), Abatra Natural Chemicals, katal. č. A2-022

**přípravek „forever young“** - doplněk stravy firmy AVICENNA Company, spol. s.r.o.

1 tobolek obsahuje: Proanthocyanidinovou frakci (95%) z kůry *Pinus pinaster* (*P. maritima*) 80 mg, Schizandrinovou frakci (9%) z plodů *Schisandra chinensis* 45 mg, EGCG frakce (90%) z listů *Camellia sinensis* 25 mg, Anthokyanovou frakci (25%) z plodů *Vaccinium myrtillus* 12,50 mg, Stilbenovou frakci (98% trans-resveratrolu) z plodů *Vitis vinifera* 12,50 mg, Flavonoidní frakci (98% quercetinu) z plodů *Citrus* sp. 10 mg, vitamin C 100 mg, vitamin E 25 mg, vitamin B<sub>6</sub> 3 mg, vitamin B<sub>12</sub> 7,50 µg a kyselinu listovou 250,00 µg.

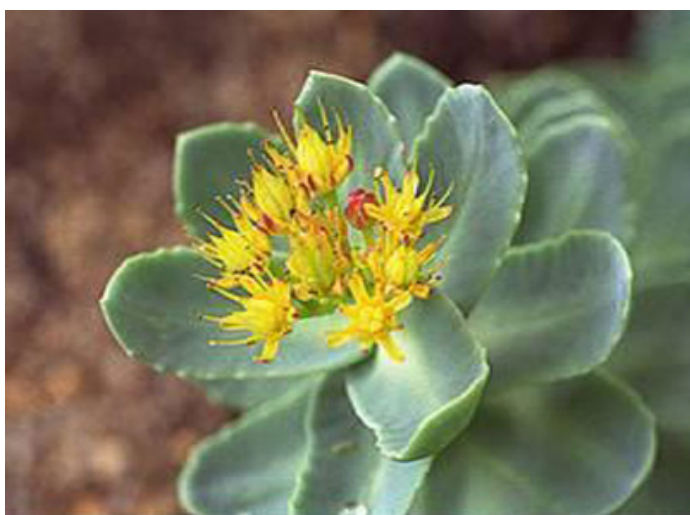
**extrakt z oddenku *Zingiber officinalis* (*Zingiberaceae*)** - s deklarovaným 10% obsahem gingerolu

**flavonoidní frakce z *Humuli strobilus* (*Humulaceae*)** - s deklarovaným obsahem 10% flavonoidů (včetně Xanthohumolu)

**gallová kyselina (98%)**– Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

**ethylester kyseliny gallové** - izolovaný z nadzemí části rostliny *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*) na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie

**methylester kyseliny gallové** - izolovaný z nadzemí části rostliny *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*) na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie



Obrázek 12 *Rhodiola rosea* (*Crassulaceae*) - zdroj: [http://www.gaiaherbs.com/images/herbs/rhodiola\\_rosea.jpg](http://www.gaiaherbs.com/images/herbs/rhodiola_rosea.jpg)

**scopolin (7-glykosid-5-methoxykumarin), scopoletin (7-hydroxy-5-methoxykumarin), umbelliferon (7-hydroxykumarin)** - kumariny izolované na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Hradec Králové z *Evolvulus alsinoides* (*Convolvulaceae*)

Obrázek 13 *Evolvulus alsinoides* (*Convolvulaceae*) - zdroj:

<http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/images/14/147190-1-t.jpg>



**4-OH-kumarin (99%)**- Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika)

16 syntetických kumarinů získaných od Prof. Sasa (Department of Human Physiology and Pharmacology “Vittorio Erspamer”, University La Sapienza, Roma, Italy), syntetizované skupinou Prof. Parmar (Department of Chemistry, University of Delhi, India):

- **Hymecromon (4-methyl-7-hydroxykumarin)** - krystalická látka označena jako BHC - 1
- **7,8-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho deriváty C3 ethylester kyseliny octové a C3 ethylester kyseliny propanové** - krystalické látky označené jako (753), (784) a (476)
- **6,7-dihydroxy-4-methylkumarin** - žlutá krystalická látka označená jako (813)
- **5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho deriváty C3 ethylester kyseliny octové a C3 ethylester kyseliny propanové** – krystalické látky označené jako (777), (786) a (779)



- **7,8-diacetoxy-4-methylkumarin jeho deriváty C3 ethylester kyseliny octové a C3 ethylester kyseliny propanové** – krystalické látky označené jako (730), (821) a (796)
- **C3 ethylester kyseliny propanové 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin** - krystalická látka označená jako (764)
- **7,8-dimethoxy-4-methylkumarin a jeho derivát C3 ethylester kyseliny octové (trigokumarin)** - krystalické látky označené jako (823) a (827)
- **5,7-dimethoxy-4-methylkumarin a 5,7-dimethoxy-6-acetoxy-4-methylkumarin** - krystalické látky označené jako (825) a (801)
- **1,4-dihydroxyanthron** - žlutá krystalická látka č. (864)

**latex *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*)** - čistý latex získaný z Peruánského keře, dodán jako doličný materiál Policií ČR, kriminální službou, za účelem vypracování znaleckého posudku

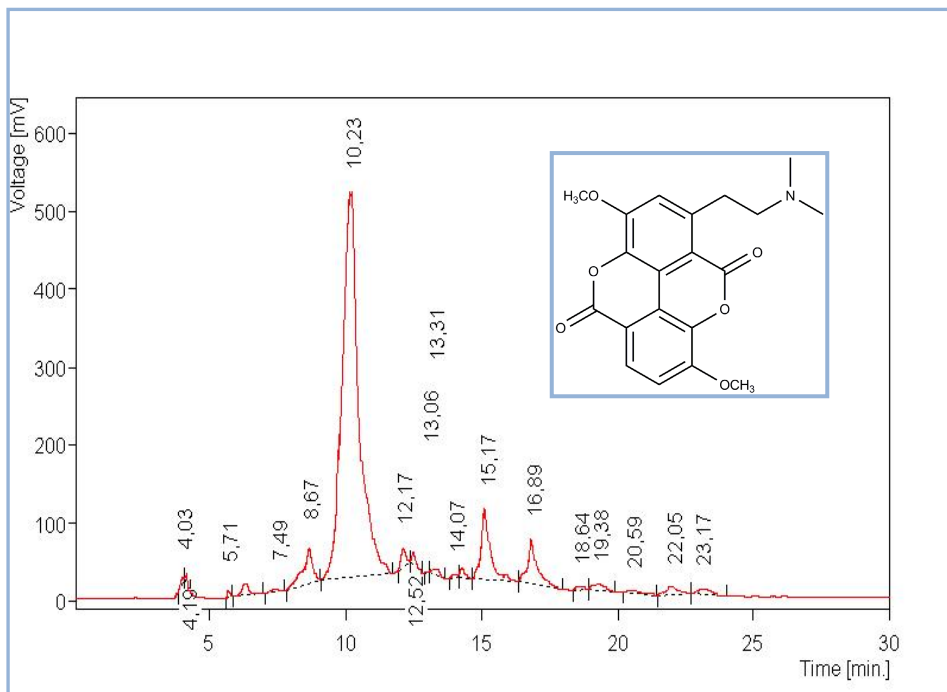
**CHCl<sub>3</sub> extrakt latexu *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*)** - chloroformový extrakt byl připraven vytřepáním 5 ml latexu 4x20 ml chloroformu, výtřepek byl zahuštěn na 100 ml; dále upravován podle potřeb testu.

**Obrázek 14 Latex vytékající z poraněného keře *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*)- zdroj:**

<http://ccbolgroup.com/sangre/sangre.jpg>



Obrázek 15 HPLC analýza latexu *Croton lechleri*(Euphorbiaceae)



**kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová** - izolována z jazykovitých květů *Helianthus annuus* (*Asteraceae*) na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, Česká Republika.

**stigmasterol (3 $\beta$ -Hydroxy-24-ethyl-5,22-cholestadien)** – izolován z jazykovitých květů *Helianthus annuus* (*Asteraceae*) na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, Česká Republika.

## 4.3 Metodika měření antioxidační aktivity

### 4.3.1 DPPH radikálový test

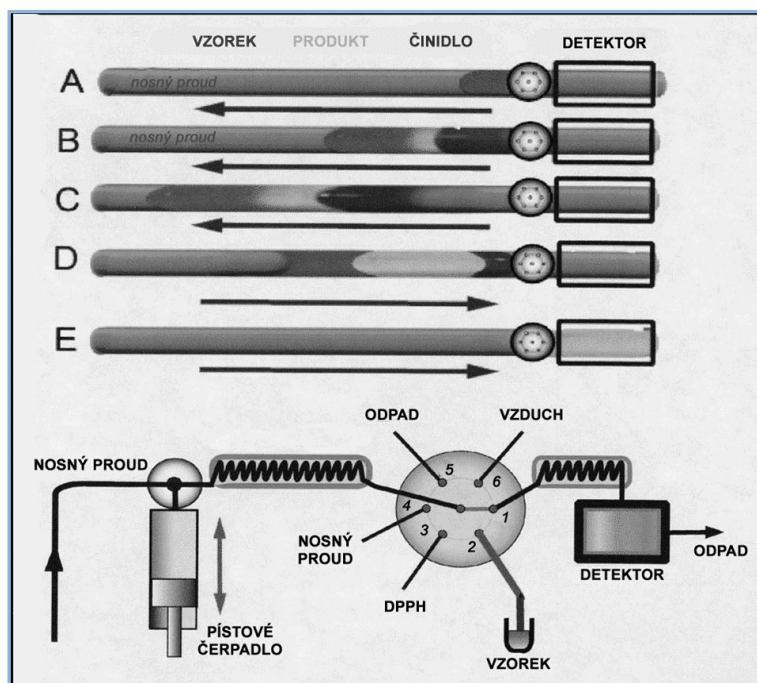
Tato automatizovaná metoda je založena na reakci stabilního fialově zbarveného radikálu DPPH (2,2'-difenyl-1-picrylhydrazyl radikál) s antioxidantem. Dochází ke zhášení DPPH radikálu projevující se blednutím roztoku DPPH a poklesem jeho absorbance měřené při 525 nm. Pokles absorbance je úměrný koncentraci antioxidantu ve vzorku (BONDET V., 1997). Tato metoda byla upravena ve spolupráci Katedry analytické chemie a Katedry farmaceutické botaniky a ekologie (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové) pro účely antioxidačního screeningu rostlinných extraktů i čistých látek. Vyvinutá metoda používá programovatelného SIA (sekvenční injekční analýza) systému (POLASEK M., 2004). SIA využívá systému hadiček, mísící cívky, pístového čerpadla, přepínacího ventilu, průtokové cely a spektrofotometrického detektoru k automatickému měření DPPH radikály vychytávající aktivity testovaných vzorků. Schéma systému je zobrazeno na Obr. 16. Měření DPPH radikály zhášecí aktivity rostlinných extraktů a izolovaných látek bylo provedeno na počítačem řízeném přístroji FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) vybaveným 2,5 ml pístovým čerpadlem, šesticestným přepínacím ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s LS-1 světelným zdrojem (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtokovou celou. Objem mísící cívky byl 0,6 ml, průměr 0,72 mm (Watrex, Praha, Česká Republika).

Základní roztoky lyofilizovaných rostlinných extraktů a izolovaných látek byly připraveny rozpuštěním asi 1 mg vzorku v ethanolu (50% v/v) tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Rozpuštění proběhlo v ultrazvukové lázni při stupni 10 po dobu 10 min za laboratorní teploty. Základní roztoky byly dále naředěny ethanolom (50% v/v) na koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,005 mg/ml a 0,0001 mg/ml. Jako nosný proud byl použit ethanol (50% v/v). Roztok DPPH byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH do 100 ml 50% (v/v) ethanolu.

DPPH zhášecí aktivita vzorků byla popsána zhášecím indexem (%Q) definovaným jako relativní pokles absorbance DPPH roztoku vyvolaný přidavkem antioxidantu:

$$\%Q = \frac{(1 - A_x)}{A_0} \times 100$$

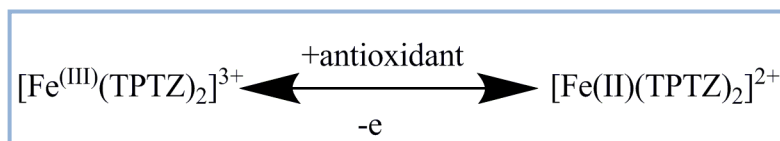
kde  $A_0$  je absorbance samotného DPPH roztoku bez vzorku a  $A_x$  je absorbance DPPH roztoku po přidání a promíchání se vzorkem. U každého vzorku byla změřena a vypočtena hodnota %Q pro uvedené koncentrace a sestrojena křivka závislosti %Q na koncentraci vzorku. Všechny vzorky byly měřeny nejméně 3x.



Obrázek 16 Schéma SIA systému. – zdroj:  
 Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser  
 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA)

### 4.3.2 FRAP metoda

FRAP metoda je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda založená na schopnosti antioxidantů redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  jsou měřeny spektrofotometricky měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595 nm (HUANG D., 2005).



Všechny experimenty byly dělány dle článku (FIRUZI O., 2005). Na mikrodestičku typu P (Brand 400  $\mu\text{l}$ , Fisher) bylo nanášeno do 4 jamek 25  $\mu\text{l}$  látky v různé koncentraci 10-200  $\mu\text{M}$ . Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu nebo methanolu. Reakční FRAP roztok byl připraven smícháním 10 ml roztoku A + 1 ml roztoku B + 1 ml roztoku C a zahřátím na 37 °C .

- Roztok A – 300 mM acetátový pufr, jehož pH bylo upraveno na 3,6 pomocí kyseliny octové
- Roztok B – 20 mM vodný roztok  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Roztok C – 10 mM TPTZ rozpuštěný v 40 mM HCl

175  $\mu\text{l}$  FRAP roztoku, vždy čerstvě připraveného a zahřátého na 37 °C bylo přidáno k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175  $\mu\text{l}$  acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance roztoku byla měřena při 595 nm na přístroji microplate reader (Anthos 2010) po 4 minutách a poté v časových intervalech (10 minut) až po dobu 120 min. Změna absorbance  $\Delta A_{595\text{nm}}$  byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsi (175  $\mu\text{l}$  FRAP roztoku +25  $\mu\text{l}$  rozpouštědla použitého na rozpuštění daného antioxidantu) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát. FRAP hodnota pro časový interval  $t$  (FRAP hodnota  $t$ ) byla počítána dle vzorce:

$$\text{FRAP hodnota}_t(\text{M}) = (\Delta a_t L / \Delta a_t \text{Fe}^{2+}) \times 10^{-5}$$

Kde  $\Delta a_t L$  je změna v časovém intervalu  $t$  (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  a  $\Delta a_t \text{Fe}^{2+}$  je změna absorbance ve stejném časovém intervalu vztažená na železnaté ionty při stejné koncentraci. Jako standardy byly využity známé antioxidanty trolox, kyselina askorbová a (+)-katechin.

## 4.4 Metodika měření agregace destiček

Pro určování antiagregační aktivity látek a rostlinných extraktů byla použita metoda optické agregometrie popsána výše v teoretické části. Stupeň agregace destiček byl sledován pomocí agregometru Chrono-log 500-Ca (Chrono-Log Co., USA) spojeným s osobním počítačem. Proces agregace byl sledován po dobu pěti minut a vyhodnocován programem Aggro/Link for Windows, verze 4.75 (Chrono-Log Co., USA).

Jako dárci krve sloužili zdraví dobrovolníci, nekuřáci, kteří neužívali po dobu alespoň 10 dnů žádnou látku ovlivňující funkci destiček. Krev byla odebírána na transfuzní stanici Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Jako antikoagulační látka sloužil 3,8% citran sodný, který neovlivňuje agregační funkci destiček. Krev byla po odběru centrifugována (centrifuga U-32R, Boeco) 10 minut při  $240 \times g$  za laboratorní teploty. Tím byla získána PRP. Po jejím oddělení byla krev dále centrifugována dalších 15 minut při  $600 \times g$  za laboratorní teploty a byla získána PPP. Počet destiček v PRP byl určen na Oddělení klinické hematologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Množství destiček bylo následně naředěno pomocí PPP jako dilučního média na hodnotu  $250 \times 10^9/l$ .

Všechny látky i rostlinné extrakty byly před měřením rozpuštěny v DMSO. Do skleněné silikonizované kyvety bylo přidáno 490  $\mu\text{l}$  PRP, kyveta byla následně vložena do temperovaného ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) agregometru, obsah byl promícháván za pomoci magnetického míchadla. Po třech minutách bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (DMSO) (kontrola). Po pěti minutách byl do kyvety přidán jeden z agonistů agregace (AA-výsledná koncentrace v kyvetě 0,5 mM/ml; ADP-výsledná koncentrace v kyvetě 10  $\mu\text{M/ml}$ ; COL výsledná koncentrace 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Tyto koncentrace byly zvoleny tak, aby u průměrného vzorku zdravé populace lidí

vyvolaly v PRP agregaci trombocytů v rozsahu 70-99 % (JUN D., 2005). Pokud by byl dárce postižen některou z poruch agregace destiček nebo by užil lék, který ji snižuje, projevilo by se to při měření kontrolního vzorku.

## 4.5 Statistická analýza

Statistická analýza výše zmíněných testů byla vyhodnocována párovým Studentovým t-testem v programu GraphPad Version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p < 0,05$ . Jednotlivá měření byla opakována nejméně třikrát. Výše uvedený program byl použit také pro výpočet hodnot  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ) u měřených látek.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – VÝSLEDKY

### 5.1 Výsledky měření antioxidační aktivity

#### 5.1.1 Výsledky DPPH testu

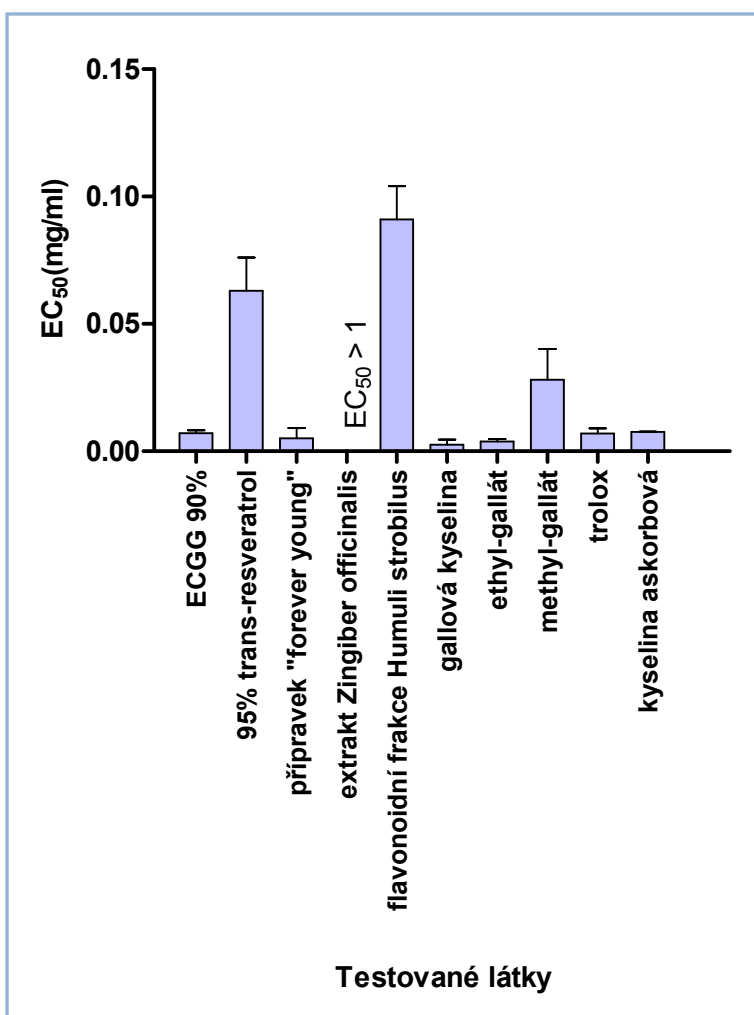
Výsledky radikálového DPPH testu jsou prezentovány jako hodnoty  $EC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) a/nebo jsou popsány zhášecím indexem (%Q) definovaným jako relativní pokles absorbance DPPH roztoku vyvolaný přidavkem antioxidantu.



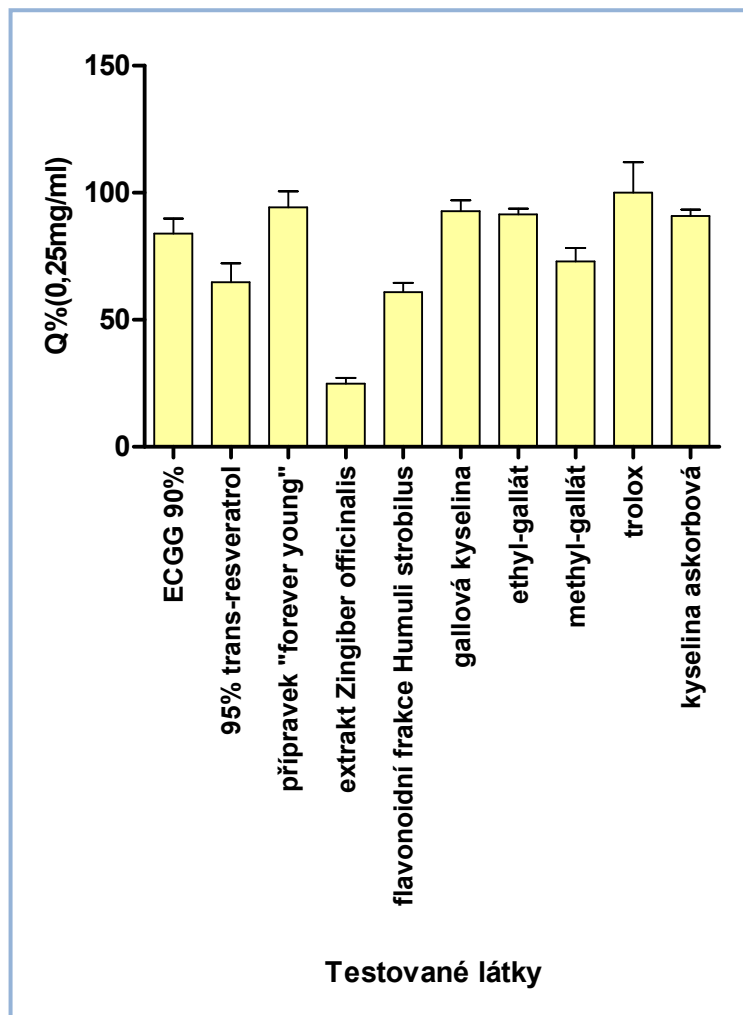
**Tabulka 1** Hodnoty  $EC_{50}$  (mg/ml) a relativní pokles absorbance DPPH (Q%) testovaných polyfenolů při koncentraci 0,25 mg/ml

Měřené vzorky	Vzorec	$EC_{50}$ (mg/ml)±S.D	Q% při koncentraci 0,25mg/ml ±S.D
EGCG 90%		0,007±0,0012	83,97±5,8
95% trans -resveratrol		0,063±0,013	64,8±7,5
přípravek "forever young"		0,005±0,004	94,3±6,2
extrakt <i>Zingiber officinalis</i>		≥1	24,95±2,2
flavonoidní fraxce <i>Humuli strobilus</i>		0,091±0,013	60,9±3,6
gallová kyselina		0,0025±0,002	92,8±4,2
ethyl-gallát		0,0038±0,001	91,5±2,3
methyl-gallát		0,028±0,0122	73±5,3
trolox		0,00696±0,002	97±12
kyselina askorbová		0,0075±0,000150	90,9±2,5

Graf 1 Hodnoty  $EC_{50}$  (mg/ml) testovaných polyfenolů a rostlinných extraktů, troloxu a askorbové kyseliny

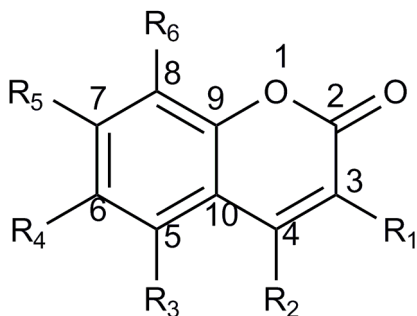


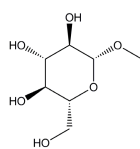
**Graf 2** Závislost relativního poklesu absorbance radikálu DPPH (Q%) na koncentraci (mg/ml) testovaných polyfenolů, rostlinných extraktů, troloxu a kyseliny askorbové

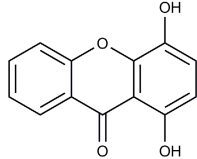
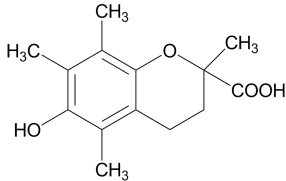
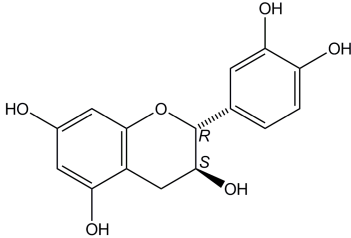
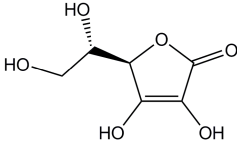


Z polyfenolických sloučenin vykázala největší radikál zhášecí aktivitu kyselina gallová ( $EC_{50} = 0,0025 \pm 0,002$  mg/ml,  $Q = 92,8 \pm 4,2$  %), ethyl-gallát ( $EC_{50} = 0,0038 \pm 0,001$  mg/ml,  $Q = 91,5 \pm 2,3$  %), epigallokatechin-gallát ( $EC_{50} = 0,007 \pm 0,0012$  mg/ml,  $Q = 83,97 \pm 5,8$  %). Jako standard sloužil trolox ( $EC_{50} = 0,00696 \pm 0,002$  mg/ml,  $Q = 97 \pm 12$  %) a kyselina askorbová ( $EC_{50} = 0,0075 \pm 0,0015$  mg/ml,  $Q = 90,9 \pm 2,5$  %). (Tab.1, Graf 1 a 2).

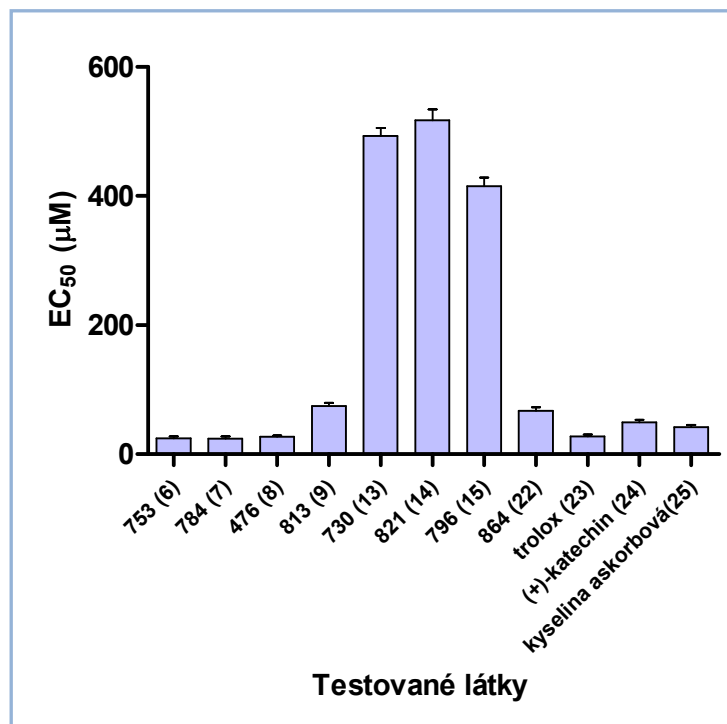
**Tabulka 2** Hodnoty  $EC_{50}$  ( $\mu M$ ) a relativní pokes absorpance DPPH (Q%) testovaných kumarinů a známých antioxidantů při koncentraci látek 750  $\mu M$



No.	Látka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	EC <sub>50</sub> ±S.D.	Q % při 750 ( $\mu M$ )
1	scopoletin	H	H	H	OMe	OH	H	≥750	15,1±1,2
2	4-OH-kumarin	H	OH	H	H	H	H	≥750	5,1±0,33
3	umbelliferon	H	H	H	H	OH	H	≥750	6,3±2,1
4	scopolin	H	H	H	OMe		H	≥750	3,8±1,05
									
5	BHC- 1(hymecromon)	H	Me	H	H	OH	H	≥750	4,5±1,07
6	753	H	Me	H	H	OH	OH	24,9±2,7	89,5±5,2
7	784	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OH	OH	24,0±3,5	83,3±7,5
8	476	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OH	OH	27,0±2,2	90,6±7,3
9	813	H	Me	H	OH	OH	H	74,7±4,9	89,2±5,2
10	777	H	Me	OH	H	OH	H	≥750	6,5±2,2
11	786	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OH	H	OH	H	≥750	9,7±1,3
12	779	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OH	H	OH	H	≥750	18,8±3,2
13	730	H	Me	H	H	OAc	OAc	492,8±12,5	78±6,5
14	821	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OAc	OAc	517,2±16,8	67,29±7,9
15	796	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OAc	OAc	415,4±13,3	80,7±1,2
16	764	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OAc	H	OAc	H	≥750	5,2±2,2
17	823	H	Me	H	H	OMe	OMe	≥750	4,9±1,5
18	827(trigokumarin)	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OMe	OMe	≥750	7,3±1,7
19	733	H	Me	OMe	H	OMe	H	≥750	5,4±2,2
20	825	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OMe	H	OMe	H	≥750	9,1±1,6
21	801	H	Me	OMe	OAc	OMe	H	≥750	3,2±1,2

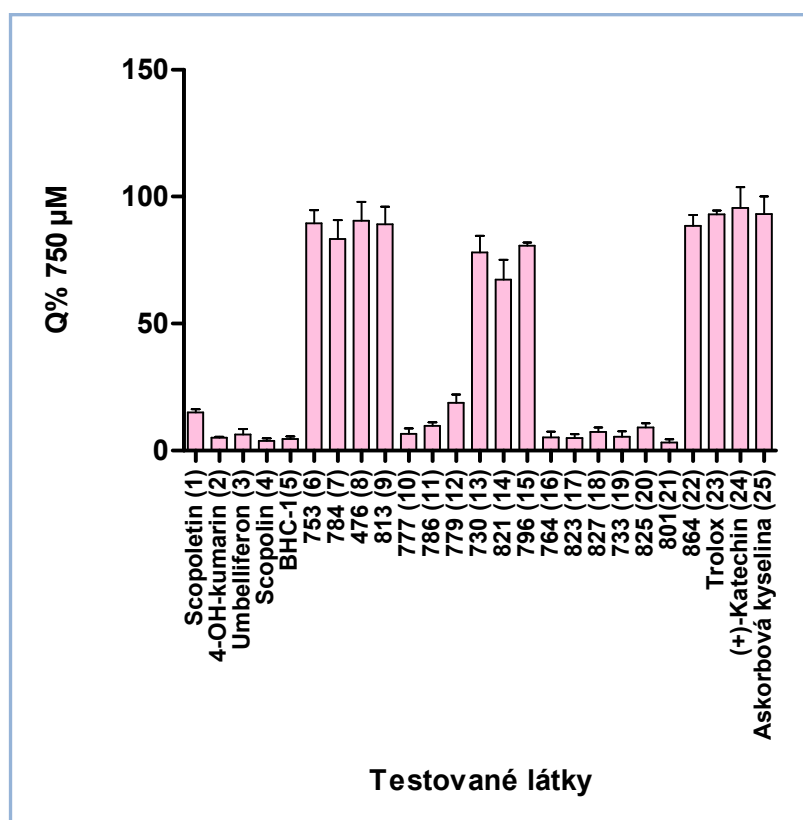
22	864		67,3±4,3	88,6±4,2
23	trolox		27,8±3,02	93±1,5
24	(+)-katechin		49,2±4,2	95,5±8,3
25	kyselina askorbová		42,4±3,1	93,2±6,8

**Graf 3** Hodnoty  $EC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) testovaných kumarinů a známých antioxidantů

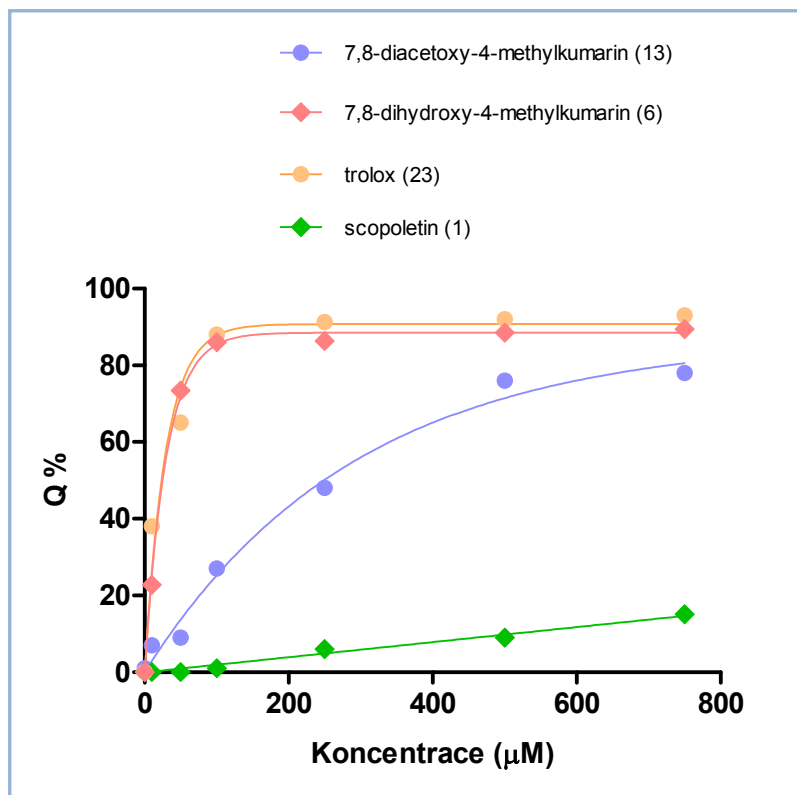


*Ortho*-dihydroxy-4-methylkumariny (**6-9**), 1,4-dihydroxyanthron (**22**) a známé antioxidanty (**23-25**) vykázaly excelentní zhášecí schopnost. *Ortho*-diacetoxy-4-methylkumariny (**13-15**) vykázaly střední radikál zhášecí aktivitu. Ostatní sloučeniny mají jen slabé antioxidační schopnosti (Tab. 2, Graf 3, 4). Závislost relativního poklesu absorbance DPPH roztoku Q% na koncentraci 7,8-dihydroxy-4-methylkumarinu (**6**), 7,8-diacetoxy-4-methylkumarinu (**13**), scopoletinu (**1**) a standardu troloxu (**23**) je zobrazena v grafu 5. 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin má schopnost zhášet radikál DPPH při obdobných koncentracích jako standard trolox. 7,8-diacetoxy-4-methylkumarin vykázal střední radikál zhášecí aktivitu. Přírodní kumarin scopoletin vykázal jen slabou radikál zhášecí aktivitu. Výpočet schopnosti antioxidantu zhášet radikál (Q%) byl pořízen dle vzorce uvedeného v kapitole 4.3. (Metodika měření antioxidační aktivity).

**Graf 4** Relativní pokles absorbance DPPH roztoku (Q%) testovaných kumarinů a známých antioxidantů při koncentraci 750  $\mu\text{M}$



Graf 4 Závislost relativního poklesu absorbance DPPH roztoku (Q%) na koncentraci 7,8-dihydroxy-4-methylkumarinu (6), 7,8-diacetoxy-4-methylkumarinu (13), scopoletinu (1) a troloxu (23)



Výsledky schopnosti kumarinů vychytávat volné radikály jsou součástí publikace:

Rehakova Z., Kolečkar V., Cervenka F., Jahodar L., Saso L., Opletal L., Jun D., Kuca K.: DPPH radical scavenging activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues measured by SIA method. *Toxicol. Mechan. Methods*, 18(5), 2008, 413-418.

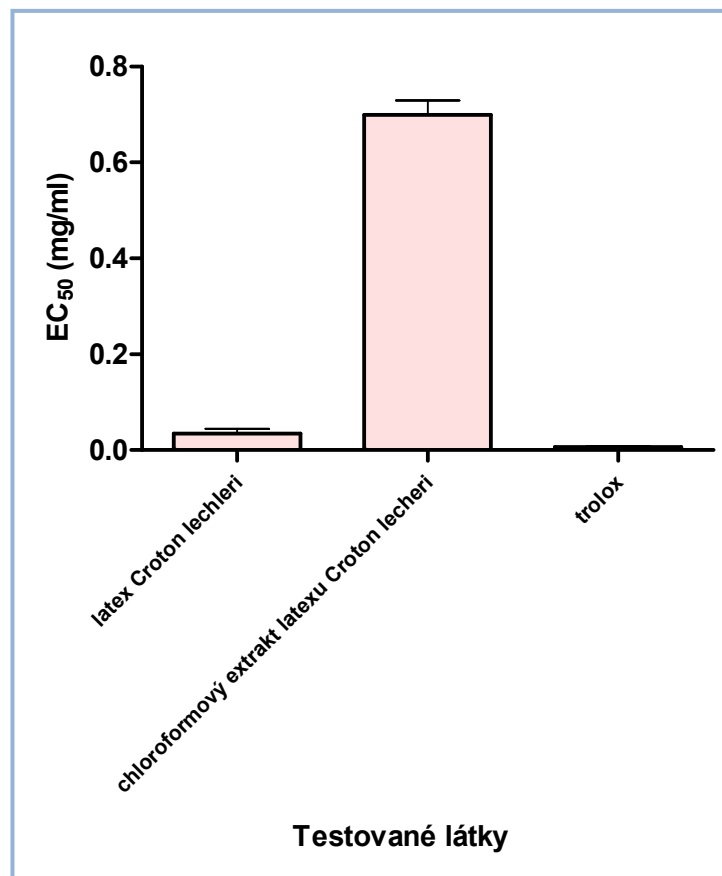
Dále byla testována antioxidační aktivita pomocí testu DPPH latexu peruánského keře *Croton lechleri (Euphorbiaceae)*, zvaného „Dračí krev“.



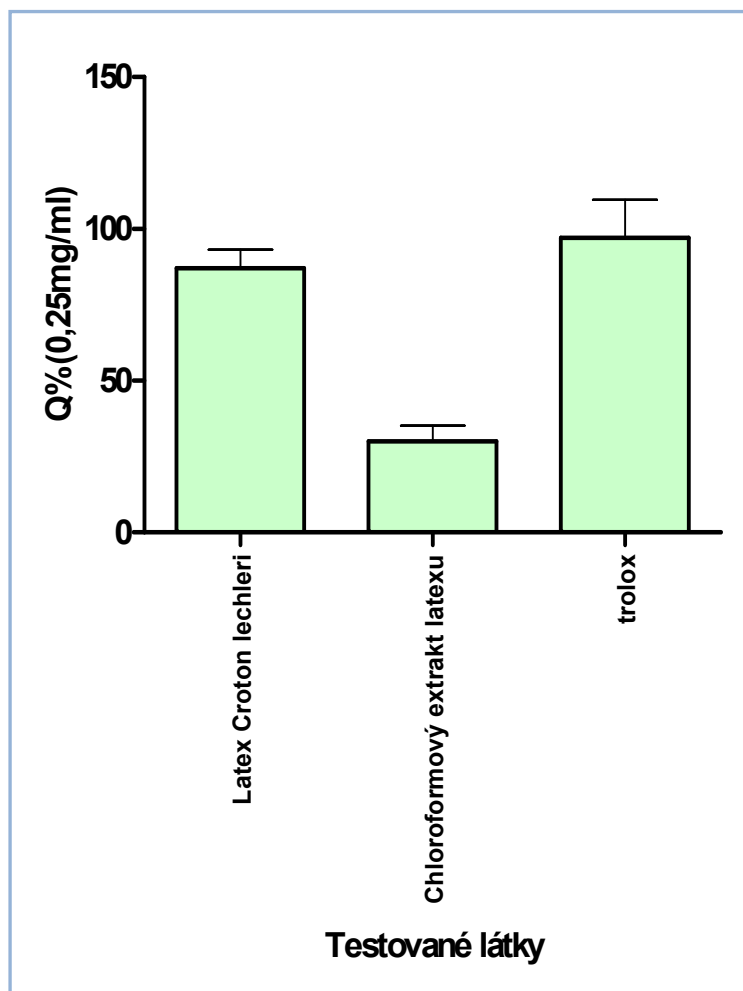
Tabulka 3 Hodnoty EC<sub>50</sub> (mg/ml) a relativní pokles absorbance DPPH roztoku (Q%) při koncentraci testovaného latexu *Croton lechleri*, jeho chloroformového extraktu a standardu troloxu 0,25 mg/ml

Testované látky	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	Q% (0,25mg/ml)
latex <i>Croton lechleri</i>	0,0347±0,018	87±6,2
chloroformový extrakt latexu <i>Croton lechleri</i>	0,7±0,03	30±5,2
trolox	0,00696±0,002	97±12,5

Graf 6 Hodnoty EC<sub>50</sub> (mg/ml) čistého latexu *Croton lechleri*, jeho chloroformového extraktu a troloxu



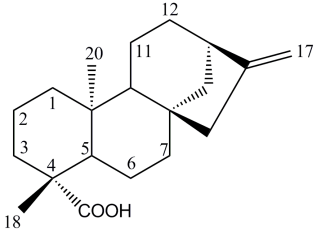
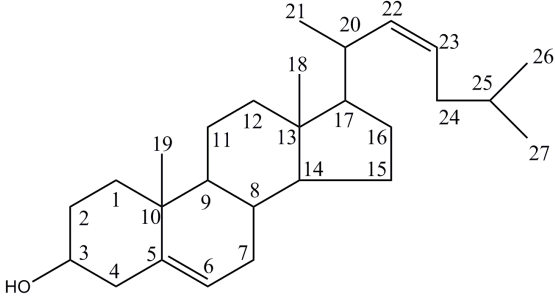
Graf. 7 Závislost relativního poklesu absorbance DPPH roztoku (Q%) na koncentraci chloroformového extraktu latexu *Croton lechleri*, čistého latexu *Croton lechleri* a troloxu



Čistý latex *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*) vykázal výraznou radikál zhášecí aktivitu. Při koncentraci 0,25 mg/ml poklesla absorbance DPPH roztoku o  $87 \pm 6,2$  %. Nicméně hodnota  $EC_{50}$  (mg/ml) čistého latexu je zhruba 5x nižší než u standardu troloxu. Závislost relativního poklesu absorbance DPPH roztoku (Q%) na koncentraci je znázorněna v grafu 7. Chloroformový extrakt čistého latexu *Croton lechleri* vykázal výrazně nižší radikál zhášecí aktivitu oproti čistému latexu.

Z butanolového extraktu jazykovitých květů *Helianthus annuus* (*Asteraceae*), byly vyizolovány dvě sloučeniny: kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová a stigmasterol. Tyto látky nevykázaly žádnou radikál zhášecí aktivitu.

**Tabulka 4** Výsledky DPPH testu testovaných látek izolovaných z *Helianthus annuus* (*Asteraceae*) vyjádřené jako EC<sub>50</sub> (μM)

Testované látky izolované z <i>Helianthus annuus</i>	EC <sub>50</sub> (μM)
	<p>≥1500</p>
	<p>≥1500</p>

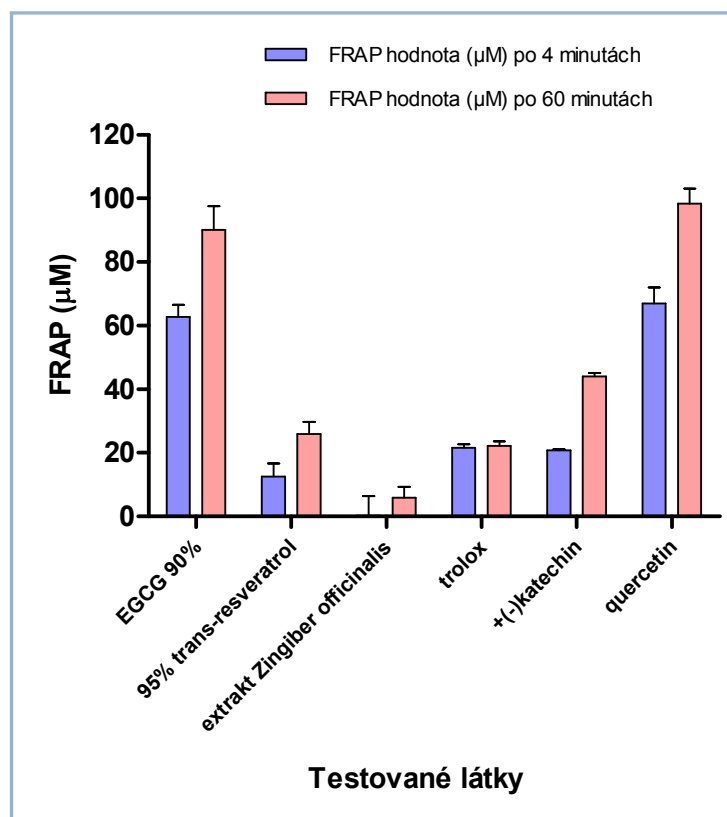
## 5.1.2 Výsledky FRAP antioxidačního testu

Výsledky FRAP testu (Ferric reducing antioxidant power) jsou uvedeny jako FRAP hodnoty ( $\mu\text{M}$ ) měřené po 4 a 60 minutách. Všechny výsledky byly měřeny a počítány, jak je uvedeno v kapitole 4.3. (Metodika měření antioxidační aktivity).

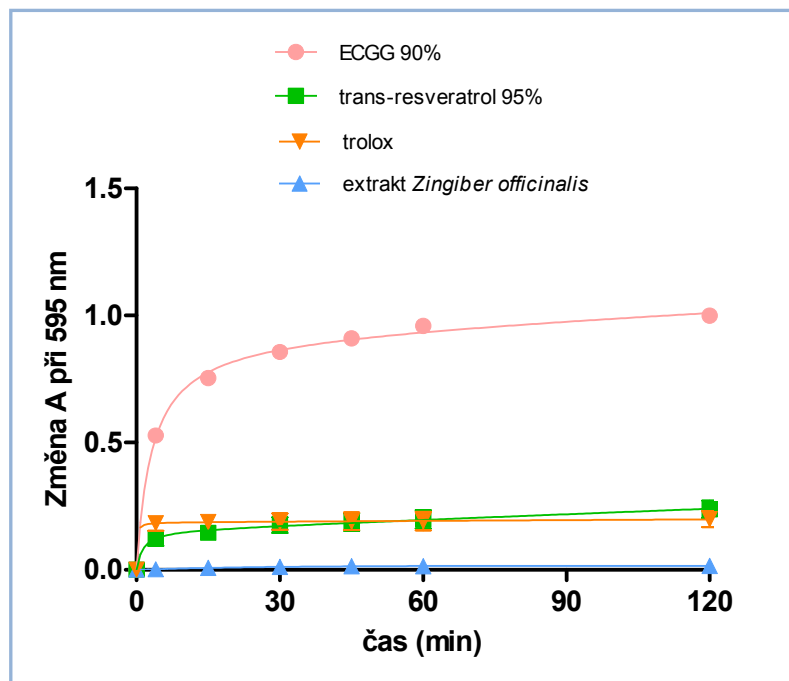
**Tabulka 5** Výsledky FRAP testu ( $\mu\text{M}$ ) testovaných polyfenolů a známých antioxidantů měřeno po 4 a 60 minutách ( $\pm$  S.D.)

Měřené vzorky	vzorec	FRAP hodnoty ( $\mu\text{M}$ ) po 4 minutách	FRAP hodnoty ( $\mu\text{M}$ ) po 60 minutách
<b>EGCG 90%</b>		62,7 $\pm$ 3,8	90,2 $\pm$ 7,4
<b>95% trans-resveratrol</b>		12,5 $\pm$ 4,1	25,95 $\pm$ 3,8
<b>extrakt <i>Zingiber officinalis</i></b>		0,24 $\pm$ 6,2	5,85 $\pm$ 3,5
<b>trolox</b>		21,5 $\pm$ 1,2	22,2 $\pm$ 1,4
<b>(+)-katechin</b>		20,7 $\pm$ 0,3	44,1 $\pm$ 1,05
<b>quercetin</b>		66,9 $\pm$ 5,2	98,3 $\pm$ 4,8

Graf 8 Hodnoty FRAP testu uvedené v Tabulce 5

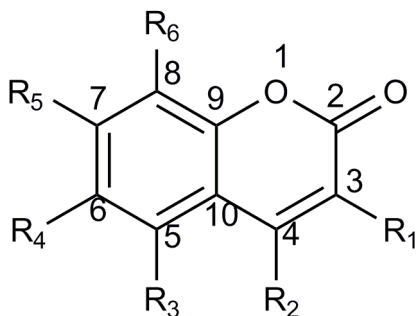


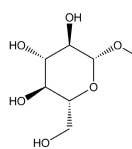
**Graf 9** Změny absorbance (595 nm) na čase při koncentraci měřených polyfenolů a známých antioxidantů 10  $\mu$ M



Z testovaných polyfenolů vykázal největší schopnost redukovat železité ionty 90% epigallokatechin-gallát. Jeho FRAP hodnoty po 4 a 60 minutách se blíží hodnotám polyfenolu quercetinu, který v tomto testu vykázal nejvyšší redukční aktivitu. Také 95% trans-resveratrol vykázal železito-redukční účinek, FRAP hodnota po 60 minutách se blíží hodnotám standardu troloxu. Pro porovnání byly vybrány látky s různou železito-redukční aktivitou. V grafu 9 je znázorněna závislost změny absorbance při 595 nm na čase (min) polyfenolů testovaného ECGG, trans-resveratrolu, troloxu a extraktu *Zingiber officinalis*, jehož železito-redukční aktivita je pouze zanedbatelná.

**Tabulka 6 Výsledky FRAP testu ( $\mu\text{M}$ ) testovaných kumarinů a známých antioxidantů měřeno po 4 a 60 minutách ( $\pm$  S.D.)**

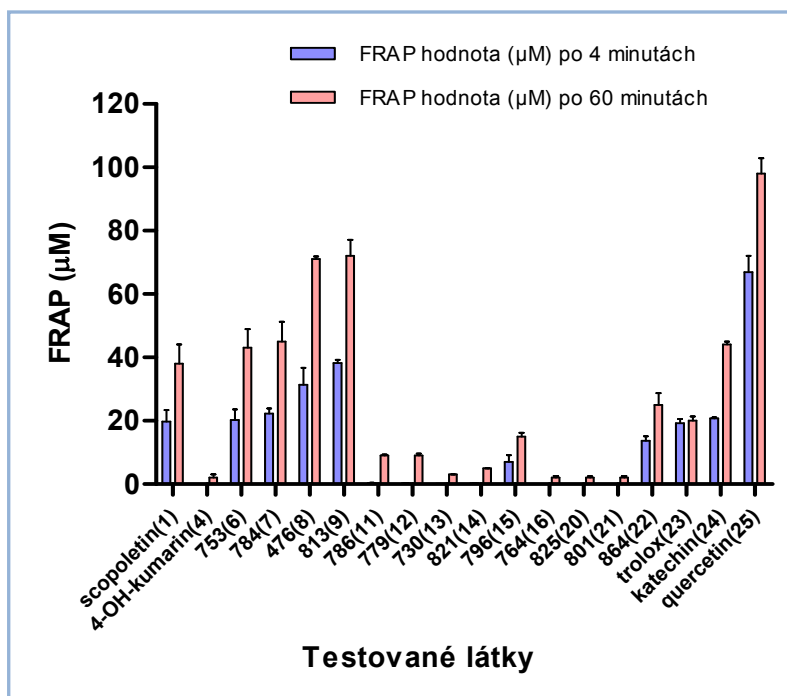


No.	Látka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	FRAP	FRAP
								value 4min ( $\mu\text{M}$ )	value 60min ( $\mu\text{M}$ )
1	scopoletin	H	H	H	OMe	OH	H	19,8 $\pm$ 3,6	38,6 $\pm$ 6,1
2	4-OH-kumarin	H	OH	H	H	H	H	$\sim$ 0	2,85 $\pm$ 1,1
3	umbelliferon	H	H	H	H	OH	H	$\sim$ 0	$\sim$ 0
4	scopolin	H	H	H	OMe		H	$\sim$ 0	$\sim$ 0
5	BHC-1(hymecromon)	H	Me	H	H	OH	H	$\sim$ 0	$\sim$ 0
6	753	H	Me	H	H	OH	OH	20,3 $\pm$ 3,3	43,9 $\pm$ 5,9
7	784	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OH	OH	22,2 $\pm$ 1,6	45,4 $\pm$ 6,2
8	476	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OH	OH	31,4 $\pm$ 5,3	71,4 $\pm$ 0,8
9	813	H	Me	H	OH	OH	H	38,3 $\pm$ 0,9	72,8 $\pm$ 5,2
10	777	H	Me	OH	H	OH	H	$\sim$ 0	$\sim$ 0
11	786	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OH	H	OH	H	0,3 $\pm$ 0,1	9,7 $\pm$ 0,4
12	779	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OH	H	OH	H	0,28 $\pm$ 0,03	9,52 $\pm$ 0,7
13	730	H	Me	H	H	OAc	OAc	0,11 $\pm$ 0,01	3,4 $\pm$ 0,05
14	821	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OAc	OAc	0,29 $\pm$ 0,03	5,4 $\pm$ 0,05
15	796	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OAc	OAc	7 $\pm$ 2,1	15,4 $\pm$ 1,3
16	764	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OAc	H	OAc	H	$\sim$ 0	2,5 $\pm$ 0,5
17	823	H	Me	H	H	OMe	OMe	$\sim$ 0	$\sim$ 0

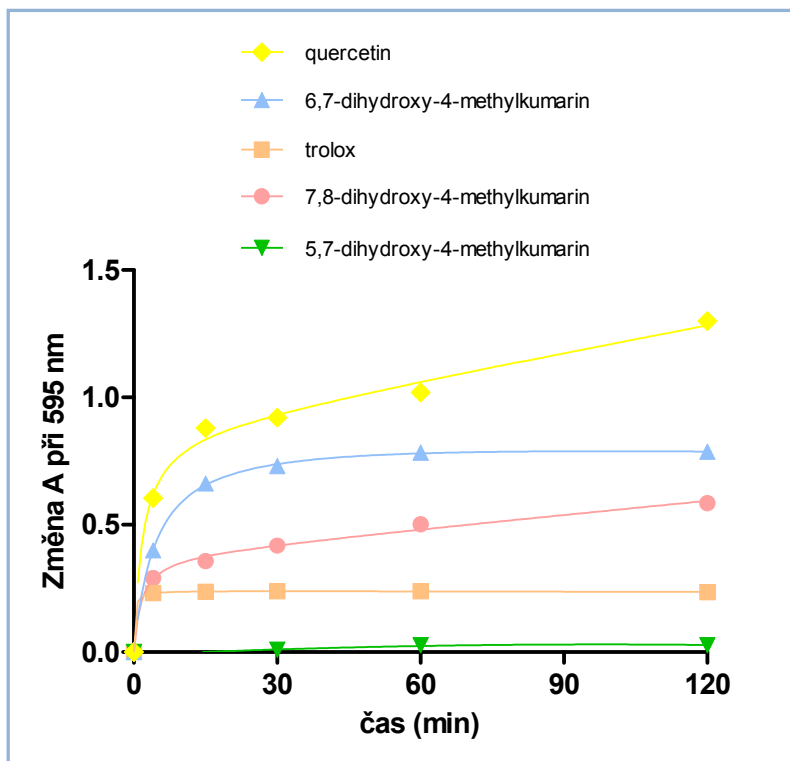
18	827(trigokumarin)	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	H	H	OMe	OMe	~0	~0
19	733	H	Me	OMe	H	OMe	H	~0	~0
20	825	CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Me	OMe	H	OMe	H	~0	2,5±0,4
21	801	H	Me	OMe	OAc	OMe	H	~0	2,5±0,5
22	864							13,7±1,5	25,5±3,8
23	trolox							19,3±1,2	20,2±1,4
24	(+)-katechin							20,73±0,3	44,1±1,05
25	quercetin							66,9±5,2	98,3±4,8



Graf 10 Hodnoty FRAP testu ( $\mu\text{M}$ ) uvedené v tabulce 6

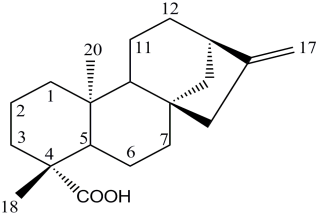
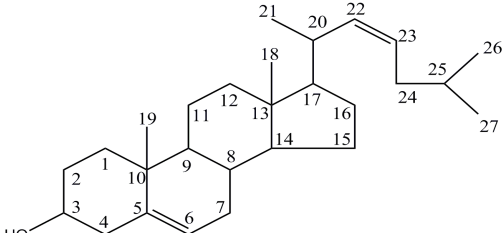


Graf 11 Změna absorbance (595 nm) na čase při koncentraci měřených *o,m*-dihydroxy-4-methylkumarinů, quercetinu a troloxu při koncentraci 10  $\mu\text{M}$



Z testovaných přírodních kumarinů vykázal nejvyšší železito-redukční aktivitu scopoletin. Ze syntetických kumarinů pak skupina *ortho*-dihydroxy-4-methylkumarinů, jak je vidět z Tab.6, Graf 10. Závislost změny absorbance 595 nm na čase u *ortho* a *meta*-dihydroxy-4-methylkumarinů je znázorněna v grafu 11. 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny a 6,7-dihydroxy-4-methylkumariny mají vynikající železito-redukční schopnost. Oproti tomu *meta*-dihydroxy-4-methylkumariny nevykázaly žádnou železito-redukční aktivitu.

**Tabulka 7 Výsledky FRAP testu ( $\mu\text{M}$ ) testovaných látek izolovaných z *Helianthus annuus* (Asteraceae) měřeno po 4 a 60 minutách ( $\pm$  S.D.)**

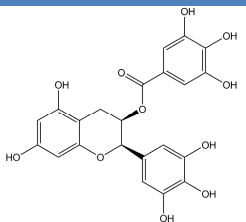
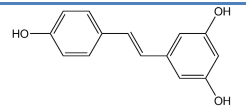
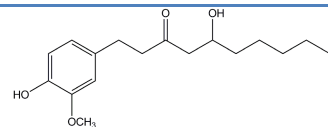
Vzorec	FRAP value ( $\mu\text{M}$ ) po 4 minutách	FRAP value ( $\mu\text{M}$ ) po 60 minutách
	0,011 $\pm$ 0,02	0,012 $\pm$ 0,01
	$\sim$ 0	0,04 $\pm$ 0,01

Látky izolované z butanolového extraktu *H. annuus* nevykázaly žádnou železito-redukční aktivitu.

### 5.1.3 Výsledky antiagregační aktivity

Výsledky antiagregační aktivity jsou vyjádřeny v %, jako antiagregační aktivita při celkové koncentraci 0,5 mg/ml PRP a nebo jako hodnoty IC<sub>50</sub> (μM) ± S.D. Jako agregační činitelé byly použity ADP, kolagen a kyselina arachidonová. Všechny pokusy byly dělány dle postupu uvedeného v části 4.4. (Metodika měření antiagregace destiček).

**Tabulka 8 Výsledky antiagregační aktivity (%) polyfenolů přírodního původu**

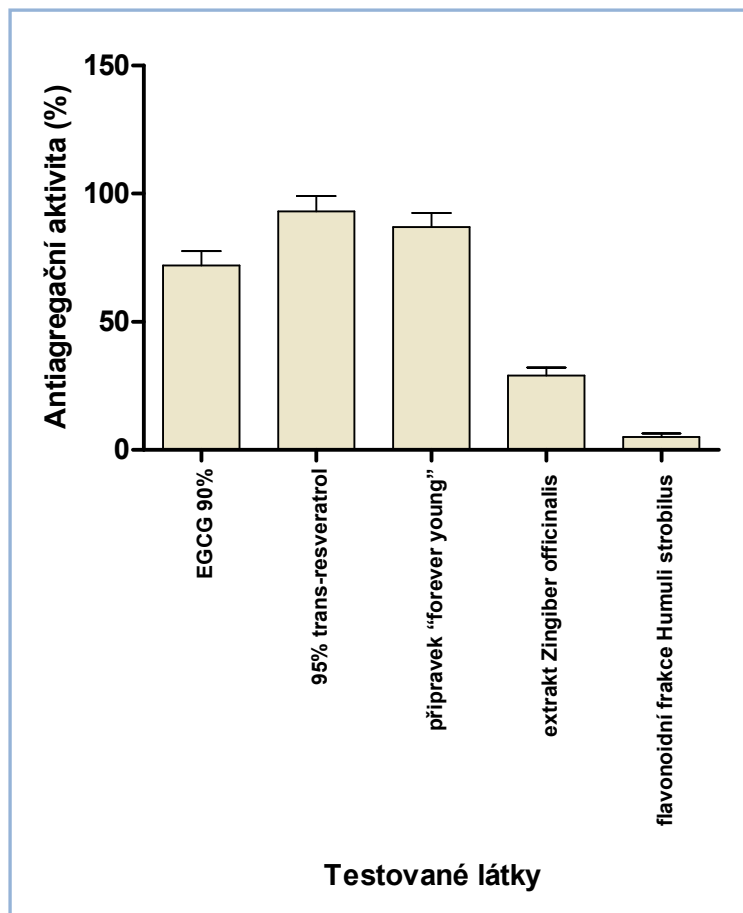
Měřené vzorky	Vzorec	Antiagregační aktivita při celkové koncentraci 0,5mg/ml PRP		
		ADP	COLn	AA
EGCG 90%		8±2,1	72±5,7	–
95% trans-resveratrol		67±4,7	93±6,1	–
přípravek „forever young“		25±2,3	87±5,4	–
extrakt <i>Zingiber officinalis</i>		18±3,1	29±3,2	–
flavonoidní fraxce <i>Humuli strobilus</i>		8±2,9	5±1,4	–

U ADP indukované agregace vykázal nejvyšší antiagregační účinek 95% trans-resveratrol (antiagregační aktivita 67 ± 4,7 %). Ostatní testované polyfenoly vykázaly pouze slabou antiagregační aktivitu. U COL vyvolané agregace vykázal nejvyšší antiagregační účinek 95% trans-resveratrol (antiagregační aktivita 93 ± 6,1 %), ale rovněž 90% ECGG (antiagregační aktivita 72 ± 5,7 %) a přípravek „forever young“ (antiagregační aktivita 87 ± 5,4 %) vykázaly vynikající antiagregační aktivitu.

Antiagregační aktivita u AA indukované agregace nebyla měřena.

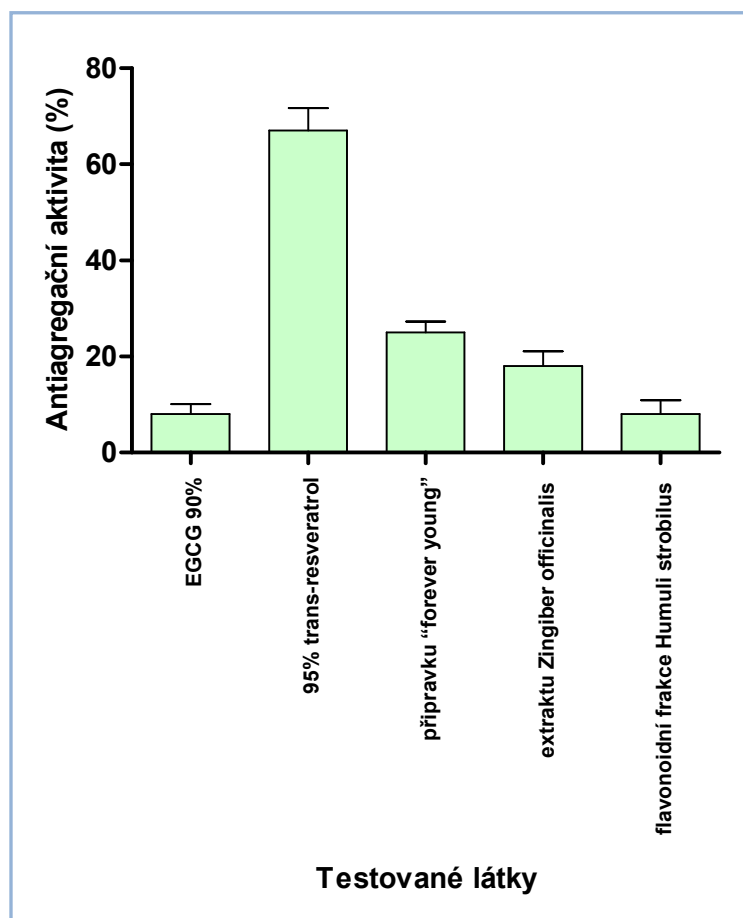
Graf 12 Antiagregační aktivita testovaných polyfenolů

AGONISTA AGREGACE-KOLAGEN

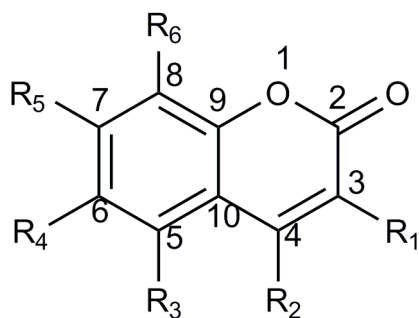


Graf 13 Antiagregační aktivita testovaných polyfenolů

AGONISTA AGREGACE-ADP



Tabulka 9 Výsledky antiagregační aktivity kumarinů přírodního původu a jejich syntetických analogů



Č.	Testovaná látka	IC <sub>50</sub> (μM) ± S.D.		
		ADP	COL	AA
1	scopoletin	≥1500	390±35	406±28
2	4-OH-kumarin	≥1500	≥1500	≥1500
3	umbelliferon	≥1500	1480±56	1200±66
4	scopolin	≥1500	≥1500	≥1500
5	BHC-1	≥1500	≥1500	≥1500
6	753	≥1500	634±51	187±31
7	784	≥1500	1078±64	168±37
8	476	≥1500	1026±48	547±52
9	813	1439±32	649±51	395±33
10	777	420±34	312±35	45±8,2
11	786	875±39	450±22	23,3±4,5
12	779	821±43	199±18	17,5±2,4
13	730	≥1500	670±35	236±48
14	821	1297±54	706±19	230±31
15	796	531±28	415±29	375±38
16	764	585±17	698±25	372±36
17	823	1180±51	681±38	254±42
18	827 (trigokumarin)	≥1500	972±42	522±21
19	733	≥1500	≥1500	635±53
20	825	≥1500	522±27	1350±36
21	801	1079±52	965±25	575±37
22	864	≥1500	356±36	16,9±3,5
23	ASA	-	84,8 ± 11	16,1 ± 1,2
24	dipyridamol	122,5±13	-	-

Jak je patrné z Tab.9 antiagregační aktivita měřená v plazmě bohaté na destičky (PRP), jejichž agregace byla vyvolána arachidonovou kyselinou (AA), vzrůstá ( $IC_{50}$  klesá) v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) > 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin (6) > 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin (9). 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) a jeho C3 ethylester kyseliny octové (11) a C3 ethylester kyseliny propanové (12) vykázaly vynikající antiagregační aktivitu u agregace vyvolané (AA). Jejich hodnoty  $IC_{50}$  jsou porovnatelné s hodnotami acetylsalicylové kyseliny (23).

5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho C3 deriváty (10-12) také inhibují signifikantně ADP a COL-vyvolanou agregaci destiček.

Antiagregační aktivita, kdy agonista agregace je kolagen, vzrůstá v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) > 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin (9) > 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin (6). Antiagregační aktivita byla porovnána u dihydroxy-4-methylkumarinu, diacetoxy-4-methylkumarinu a dimethoxy-4-methylkumarinu a jejich derivátů C3 ethylesteru kyseliny octové a C3 ethylesteru kyseliny propanové. Inhibiční aktivita agregace destiček vzrůstala v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) > 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin (16) > 5,7-dimethoxy-4-methylkumarin (19).

Nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v inhibici agregace destiček vyvolané COL, ADP nebo AA u těchto měřených látek: 7,8-dihydroxy-4-methylkumarinu (6), 7,8-diacetoxy-4-methylkumarinu (13) a 7,8-dimethoxy-4-methylkumarinu (17). Podle těchto výsledků není předpokládán žádný vztah mezi funkčními deriváty navázanými v poloze 7,8 na benzenovém jádře a antiagregační aktivitou u těchto látek.

Navíc byla testována látka 1,4-dihydroxyanthron (22), která vykázala signifikantní antiagregační aktivitu, pokud agregace destiček byla indukována AA. Jeho aktivita ( $IC_{50} = 16,9 \pm 3,5 \mu M$ ) je porovnatelná se standardem ASA ( $IC_{50} = 16,1 \pm 1,2 \mu M$ ) (23). V případě že agregace byla vyvolána COL, antiagregační účinek je srovnatelný s 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinem (10). Tato látka ale nevykázala žádnou větší inhibiční aktivitu u agregace vyvolané ADP. Přestože antiagregační schopnost testovaných kumarinů byla nižší než u testovaných standardů dipyridamolu (24) a ASA (23), skupina 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu a jeho C3 ethylesteru kyseliny octové a C3 ethylesteru kyseliny propanové

(10-12) vykazala porovnatelnou antiagregační aktivitu měřenou *in vitro* v PRP, kdy agregace byla indukována AA.

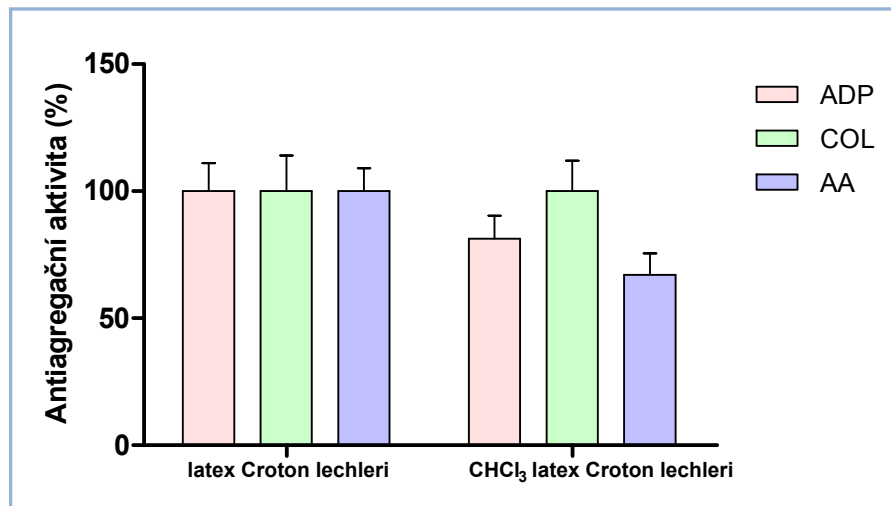
**Tabulka 10** Výsledky antiagregační aktivity latexu *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*) a jeho chloroformového extraktu jsou uvedeny jako % při koncentraci látky 0,5 mg/ml PRP

Měřené vzorky	Antiagregační aktivita % při celkové		
	ADP	COL	AA
latex <i>Croton lechleri</i>	100±11	100±14	100±9
chloroformový extract latexu <i>Croton lechleri</i>	81,33±9	100±12	67±8,5

Dále byla testována antiagregační aktivita latexu peruánského keře *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*) zvaného „Dračí krev“. Latex *Croton lechleri* snižoval agregační aktivitu činitelů při celkové koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) o 100 ± 14 % u agregace vyvolané (COL), o 100 ± 11 % u agregace vyvolané (ADP) a o 100 ± 9 % u agregace vyvolané (AA). Antiagregační aktivita chloroformového extraktu čistého latexu o finální koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) byla 100 ± 12 % (COL), 81,33 ± 9 % (ADP) a 67 ± 8,5 % (AA).



Graf 14 *In vitro* inhibiční aktivita latexu *Croton lechleri* a jeho chloroformového extraktu na agregaci destiček v PRP, indukovanou AA, COL a ADP



Látky z *Helianthus annuus* (*Asteraceae*): kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová a stigmasterol nevykázaly žádnou antiagregační aktivitu.

## 6 DISKUSE

Hledání nových látek přírodního původu, které by vykazovaly vhodné biologické účinky (např. antioxidační, antiagregační, antifungální apod.) je celosvětovým trendem. Často jsou hledány takové látky popř. rostlinné extrakty, které mají výrazný antioxidační účinek a které zároveň disponují jinými terapeuticky využitelnými účinky (např. antiagregační aktivitou). Přírodní antioxidanty jsou nejčastěji polyfenolické rostlinné sekundární metabolity (polyfenoly) mezi něž patří fenolické kyseliny, hydroxyskořicové kyseliny, naftochinony, kumariny, flavonoidy nebo taniny. Rostlinné polyfenoly jsou jednou z nejrozšířenějších skupin rostlinných sekundárních metabolitů (známo je zhruba 8 000 struktur) a jsou důležitou součástí výživy (ovoce, zelenina, šťávy). Mnohé studie poukazují na pozitivní efekt konzumace potravy bohaté na přírodní polyfenoly na lidské zdraví např. na kardiovaskulární systém (taniny), karcinogenezy (flavony), postmenopauzální syndrom u žen (isoflavony), nebo zlepšení metabolismu (katechiny). Antioxidační aktivita těchto látek byla testována vůči celé řadě radikálů (např. DPPH•, HO•, O<sub>2</sub>•, ROO• atd) (NANJO F., 1996; HANASAKI Y., 1994; DUGAS A.J., 2000). Kromě antioxidační aktivity se rostlinné polyfenoly vyznačují také širokým spektrem jiných biologických vlastností, jako je anti-alergický, anti-aterosklerotický, protizánětlivý, anti-mikrobiální, anti-trombotický, kardioprotektivní a vasodilatační efekt. Flavonoidy mají navíc schopnost inhibovat lipidovou peroxidaci, agregaci krevních destiček, snižují kapilární permeabilitu a aktivitu enzymových systémů, včetně cyklo-oxygenas a lipoxygenas ( BRAVO L., 1998; WILLIAMSON G., 2005; BALASUNDRAM N., 2006; BELINKY P.A., 1998).

Další významnou skupinou sekundárních metabolitů, kterou se zabývala tato práce jsou kumariny. Více než 300 kumarinů bylo identifikováno v přírodních zdrojích, zejména v zelených rostlinách. Farmakologické a biologické vlastnosti a terapeutická aplikace jednoduchých kumarinů záleží na stupni jejich substituce. Existuje mnoho studií zabývajících se biologickou aktivitou kumarinů. Např. Kumarin (1,2-benzopyran) je dlouho znám pro svoje příznivé účinky na lymfoedém u mužů. Scoparon (6,7-dimethoxykumarin) izolován z čínské rostliny *Artemisia scoparia* redukuje proliferativní reakce na lidských periferních mononukleárních buňkách, relaxuje hladké svalstvo, redukuje cholesterol a triglyceridy a snižuje charakteristické patomorfologické změny u diabetických králíků

s hypercholesterolemií. Tato látka navíc vykazala schopnost vychytávat volné radikály a inhibuje tyrosinkinasu ( RAJ H. G., 1998). Eskuletin izolovaný z *Euphorbia lathyris* vykázal inhibiční účinek na tyrosinasy. Vztah mezi strukturou a účinkem určený u pěti analogů eskuletinu dokazuje, že hydroxylové skupiny v poloze C6 a C7 hrají důležitou roli v inhibiční aktivitě tyrosinasy (MASAMOTO Y., 2003). Kumariny izolované z čínských drog byly testovány pro inhibiční účinky lipidové peroxidace v homogenátech ledvin a mozku krys a pro vliv na hemolýzu erytrocytů krys. Kumarin xanthotoxol (8-hydroxypsoralen) inhibuje lipidovou peroxidaci a prokázal vliv na hemolýzu erytrocytů. Kumariny bergapten a angelicin měly mírný vliv na lipidovou peroxidaci testovanou v mozkových a ledvinových homogenátech. Bylo prokázáno, že pro antioxidační účinek je důležitá přítomnost hydroxyskupiny na aromatickém jádře (NG T.B., 2000). Kumarinové deriváty mansorin A a mansorin B ze dřeva *Mansonia gagei* byly testovány pro antifungální účinky proti *Cladosporium cucumerinum* a *Candida albicans* a dále proti larvám *Aede aegypti* a pro antiradikálové účinky v testu DPPH. Tyto kumarinové deriváty vykazaly antifungální účinek proti *Cladosporium cucumerinum* (TIEW P., 2003). Z *Hybiscus syriacus* byly izolovány kumariny scopoletin a cleomiscosin A, C a D, kumarinové analogy a kumarolignany. Kumarinové analogy a scopoletin výrazně inhibovali monoaminoxidasu. Kumarolignan a cleomiscosin C vykazaly inhibici lipidové peroxidace porovnatelnou s vitamínem C (YUN B.S., 2001).

V literatuře se vyskytuje velmi mnoho prací, zabývajících se antioxidačními účinky a to nejen léčivých rostlin, ale také potravních doplňků apod. Známé jsou zejména antioxidační účinky flavonoidů a procyanidinů vína, citrusových plodů nebo zeleného čaje. Do středu zájmu se dále dostávají např. deriváty kurkuminu, látky z *Rozmarinus officinalis* a *Salvia officinalis*, látky izolované ze zázvoru, nebo rostlinná barviva z taxonů čeledi *Amaranthaceae* (CAI Y.Z., 2003). Současně s narůstajícími poznatky o oxidačním stresu se zvyšuje zájem o aplikaci antioxidantů pro účely léčby chorob způsobených oxidačním stresem a vyvíjí se mnoho analytických metod, které slouží k určování antioxidační aktivity jak přírodních, tak syntetických látek. Tyto testy hodnotí schopnost potencionálních antioxidantů eliminovat různé druhy radikálů (TEAC test, DPPH test, ORAC test apod.), schopnost chránit před lipidovou peroxidací nebo určují redoxní potenciál látek (FRAP, cyklická voltametrie)

(BONDET V., 1997; RICE-EVANS, 1996; PEDERSEN C. B., 2000; NAKAMURA T., 1998).

V této práci byla antioxidační aktivita měřena pomocí automatizovaného DPPH testu využívajícího sekvenční injekční systém dávkování (SIA) pomocí modifikované FRAP (ferric reducing antioxidant power) metody. SIA metoda byla původně zavedena pro určování antioxidační aktivity velkého počtu rostlinných extraktů (POLASEK M., 2004). Tento automatizovaný test je velmi výhodný pro rychlé a citlivé určení schopnosti různých typů látek zhaset radikál DPPH. Metoda má nesporné výhody spočívající zejména v poměrně rychlém určení antioxidační aktivity jednotlivých vzorků (jeden vzorek je automaticky třikrát dávkován, což zabere přibližně ~4 min.), určení EC<sub>50</sub> jednotlivých látek zabere pouze 15 až 30 min. Použitím této metody je možno analyzovat více potencionálních antioxidantů za kratší čas v porovnání s původní DPPH metodou dle (GUO J. T., 2001). Dále byla antioxidační aktivita určována pomocí modifikované FRAP assay, která umožňuje rychlou analýzu (FIRUZI O., 2005). Tato metoda je založena na měření schopnosti látek redukovat Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> a původně byla používána pro měření totální antioxidační aktivity plazmy a následně byla stejnými autory aplikována pro měření různých látek (BENZIE & STRAIN, 1996; BENZIE & STRAIN, 1999). Fe<sup>2+</sup> jsou měřeny spektrofotometricky měřením barevného komplexu s TPTZ při 595 nm. Redukce železitých iontů u řady fenolických látek neproběhne hned, nýbrž absorbance mírně vzrůstá po dobu několika minut (HUANG D., 2005). Pro fenolické sloučeniny včetně troloxu a také kumariny je typické, že k redukcí železitých iontů dochází postupně v průběhu několika minut a není tedy možné dosáhnout konečného výsledku po čtyřech minutách. Proto byla absorbance měřena v časovém intervalu 0-120 minut a FRAP hodnoty byly určeny ve dvou časových intervalech (4 a 60 minut). Antioxidanty s různou schopností redukovat železité ionty byly charakterizovány určováním závislosti změny absorbance při 595 nm na koncentraci testovaných látek (μM). Antioxidanty s různou schopností zhaset DPPH radikál mohou být charakterizovány závislostí %Q (pokles absorbance DPPH) na koncentraci vzorku antioxidantu. Obě metody umožňují rychlé, reprodukovatelné určení vztahu mezi strukturou/aktivitou zkoušeného vzorku. Je nutno podotknout, že SIA metodou lze určit pouze schopnost antioxidantů zhaset syntetický radikál DPPH a FRAP metodou pouze schopnost látky redukovat železité ionty. Je proto nezbytné, aby perspektivní vzorky z těchto testů byly nadále testovány a analyzovány

pomocí dalších *in vitro* a *in vivo* antioxidačních metod (PAULOVA H., 2004; ARUOMA O. I., 2003, ROGINSKY V., 2005).

V této práci za použití výše zmíněných metod bylo testováno 21 kumarinů; 7 polyfenolů; jeden komerční přípravek „forever young“ (směs polyfenolů), 1,4-dihydroxyanthron; latex *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*) a jeho chloroformový extrakt; kyselina kaurenová a stigmasterol - látky izolovány z butanolového extraktu *Helianthus annuus* (*Asteraceae*). Skupina kumarinu zahrnovala 6 kumarinů přírodního původu (scopoletin, umbelliferon, scopolin, 4-hydroxykumarin, hymecromon a trigokumarin), 16 syntetických analogů. Na kumarinovém jádře byly nasubstituovány různé funkční skupiny (jedna nebo dvě hydroxylové, acetoxylové a methoxylové skupiny samostatně nebo v kombinaci s dalšími skupinami). Navíc byl zkoumán vliv substituentu ethylesteru kyseliny octové a ethylesteru kyseliny propanové v poloze C3 na kumarinovém jádře. Jako standardy byly použity 4 známé antioxidanty (kyselina askorbová, trolox, (+)-katechin, quercetin).

Z výsledků je patrné, že excelentní antioxidační aktivita u dihydroxy derivátů 4-methylkumarinů závisí na *ortho* pozici hydroxylových skupin na benzenovém jádře. Naopak kumariny s hydroxylovými skupinami ve vzájemné poloze *meta* vykazovaly pouze malou schopnost zhaset radikály DPPH nebo redukovat železité ionty. Schopnost zhaset radikály DPPH u dihydroxy-4-methylkumarinů byla pozorována v následujícím pořadí: 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny > 6,7-dihydroxy-4-methylkumariny > 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny. Vynikající schopnost zhaset radikály u *ortho*-dihydroxy-4-methylkumarinů může být vysvětlena tím, že *ortho* dihydroxy systém je schopen vytvářet stabilní radikál, který je potřebný pro schopnost zhaset radikály (RAJ H.G., 1998). Stejně výsledky také potvrdil test FRAP. Redukční aktivita dihydroxy-4-methylkumarinů následuje v tomto pořadí: 6,7-dihydroxy-4-methylkumariny > 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny > 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny. Monomethoxy kumarin, monohydroxy kumarin a dimethoxy-4-methylkumariny nevykázaly žádný signifikantní účinek ani v jednom z antioxidačních testů. Ethylester kyseliny octové nebo ethylester kyseliny propanové v poloze C3 neovlivnil schopnost antioxidantu zhaset radikály. Zajímavá situace nastala u diacetoxy-4-methylkumarinů. Podle našich výsledků je schopnost zhaset radikál DPPH u *ortho*-diacetoxy-4-methylkumarinů signifikantně slabší v porovnání s *ortho*-dihydroxy-4-

methyلكumariny. Tento výsledek odpovídá výše zmíněnému mechanismu vychytávání radikálů. Nicméně Raj a kol. popsali, že *ortho*-diacetoxy-4-methyلكumariny jsou vynikajícími zhášeci radikálu DPPH (měřeno originálním DPPH testem). Tito autoři předpokládají, že existuje možnost konverze z diacetoxy-4-methyلكumarinu na dihydroxy-4-methyلكumarin v přítomnosti volného radikálu jako je např. DPPH radikál (RAJ H. G., 1998). Domníváme se, že tato neshoda mohla být způsobena užitím automatizovaného SIA systému, který způsobuje zkrácení reakčního času vzorku a DPPH radikálu a tak může být ovlivněna možná konverze z diacetoxy-4-methyلكumarinu na dihydroxy-4-methyلكumarin (POLASEK M., 2004). Diacetoxy-4-methyلكumariny nevykázaly žádný výrazný účinek ani ve FRAP testu. Navíc byl testován také 1,4-dihydroxyanthron za účelem zjistit, zdali více modifikované struktury jsou také schopny vykázat nějakou radikál zhášecí aktivitu nebo mají schopnost redukovat železité ionty. Testovaný 1,4-dihydroxyanthron vykázal signifikantní radikál zhášecí aktivitu porovnatelnou s aktivitou 6,7-dihydroxy-4-methyلكumarinů a vykazoval i vynikající schopnost redukovat železité ionty na železnaté. Z polyfenolických sloučenin vykazovala největší radikál-zhášecí aktivitu kyselina gallová a ethyl-gallát a epigallokatechin-gallát izolovaný z *Camellia sinensis*. Epigallokatechin-gallát vykázal také výrazný železito-redukční účinek ve FRAP testu. Kyselina gallová a ethyl-gallát nebyly pomocí FRAP metody testovány. Čistý latex *Croton lechleri* vykázal vyšší antioxidační účinek než jeho chloroformový extrakt. Získané výsledky jsou slibné pro další určování vztahu mezi strukturou/aktivitou těchto typů sloučenin. Bylo verifikováno, že užití SIA a FRAP metody je vhodné pro rychlé a citlivé určení radikál-zhášecí aktivity a redukční schopnosti různých typů sloučenin. Za použití těchto metod byl určen vztah mezi strukturou a antioxidační aktivitou u celé řady potenciálních antioxidantů. Tyto výsledky potvrdily, že *ortho*-dihydroxy-4-methyلكumariny jsou výborní zhášeci radikálů a látky schopné vyvolat redukci železitých iontů.

Obecně se předpokládá, že destičky hrají důležitou roli při vzniku a rozvoji trombózy, speciálně cerebro-vaskulárních onemocněních jakými jsou ischemie, ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu a periferní vaskulární onemocnění. Inhibice agregace destiček představuje slibný krok v prevenci těchto onemocnění. V klinické praxi existuje celá řada látek, která se pro tento účel využívá. Nicméně tyto látky vykazují řadu nežádoucích účinků anebo nejsou dostatečně účinné (BENNETT J. S., 2001; KUMAR S.K., 2003). Z toho

důvodu je velmi důležité hledat nové látky, které by vykazovaly antiagregační účinky a byly by přitom dostatečně účinné a z toxikologického hlediska bezpečné. Existuje řada studií, zabývající se antiagregační aktivitou sekundárních metabolitů i jejich syntetických derivátů. Kumariny a další polyfenoly jsou z tohoto hlediska poměrně dobře prozkoumány. Antiagregační aktivita byla popsána například u kumarinů xanthyletinu, xanthoxyletinu a suberosinu izolovaných z *Citrus grandis*, kumarinu auraptenu izolovaného z *Severinia huxifolia* a poncitrinu z *Poncirus trifoliata*. Všechny tyto látky kromě xanthyletinu vykázaly výraznou antiagregační aktivitu testovanou na králičí krvi, kdy agregace destiček byla vyvolána AA, COL, PAF (platelet-activating factor) nebo U46619 (A2 analog tromboxanu) (CHE-MING TENG, 1992). Methanolový extrakt *Usnea longissima* vykázal výrazný antiagregační účinek u ADP-indukované agregace (testováno na myším modelu *in vivo*). Tento extrakt obsahoval řadu fenolických látek. Vodné extrakty z *Arctium lappa* a *Centipeda minor* inhibovaly agregaci destiček v králičí krvi navozenou PAF. Aktivní byly některé lignany *A. lappa* a seskviterpeny 6-O-angeloylphenolín a 6-O-senecioplénolín izolované z *C. minor* (IWAKAMI S., 1992). Antiagregační aktivita byla rovněž zkoumána u flavonoidů myricetinu, kaempferolu, morinu, quercetinu a fisetinu. Flavonoidy inhibovaly významně agregaci destiček a uvolňování ATP v králičí krvi, kdy agregace byla vyvolána AA nebo COL a mírně ovlivňovaly agregaci vyvolanou PAF. ADP -indukovaná agregace byla inhibována myricetinem, fisetinem a quercetinem. V lidské plazmě bohaté na destičky (PRP) quercetin zabraňoval sekundární agregaci a blokoval uvolnění ATP z destiček při působení epinephrinu nebo ADP. Výsledky této publikace demonstrovaly, že hlavní antiagregační efekt testovaných flavonoidů může být způsoben inhibicí tvorby tromboxanu i antagonismem tromboxanového receptoru (TZENG S.H., 1991). Dále byl sledován efekt flavonoidů na hladinu adenosin-3',5'-cyklického monophosfátu (cyklický AMP) za standardních podmínek a po stimulaci prostacyklinem (PGI<sub>2</sub>). Ukázalo se, že glykony flavonoidů obecně a také flavanonové deriváty neměly vliv na funkci krevních destiček. Flavony chrysin, apigenin a phloretin inhibovaly agregaci destiček potlačením cyklooxygenasy. Jako pravděpodobný antiagregační mechanismus účinku flavonoidů je považována modifikace metabolismu destičkového cyklického AMP přes inhibici fosfodiesterasové aktivity (LANDOLFI R., 1984; MOWER R.L., 1984). V rostlinách *Artemisia capillaris* a *Gnaphallium affine* byly nalezeny kumariny a flavonoidy, které inhibovaly agregaci destiček a enzym aldosa

reduktasu. Z obsažených flavonoidů byly v *in vitro* testu na králíčích trombocytech antiagregačně aktivní skopoletin, 4,2',4'-trihydroxy-6'-methoxychalkon-4'-O- $\beta$ -glukosid, quercetin a luteolin. Flavonoidní glykosidy 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkon-2'-glukosid, kemferol-3-glukosid a naringenin-glukosid nalezené kvetoucí nati *Helichrysum italicum* snížily oproti kontrole agregaci lidských trombocytů *in vitro* indukovanou COL (FACINO R.M., 1990). Helenalin a estery 11 $\alpha$ , 13-dihydrohelenalinu obsažené v květech *Arnica montana* vykázaly silnou protizánětlivou, antirevmatickou a antitrombotickou aktivitu. Na naší katedře byly dříve z antiagregačního hlediska testovány zejména rostlinné čeledi *Asteraceae* a *Cichoriaceae*. Hlavními obsahovými látkami jsou flavonoidy různé struktury, seskviterpeny (laktony) a polyiny. Z testovaných rostlin prokázal účinek hlavně *Cnicus benedictus* (benedikt lékařský). Germakranolidní seskviterpenový lakton knicin tvoří jednu z hlavních obsahových látek benediktu. Další vhodnou rostlinou pro fytochemické zpracování za účelem získání antiagregačně účinných látek se jeví *Galinsoga ciliata* (JUN D., 2005).

V předkládané práci bylo z antiagregačního hlediska *in vitro* hodnoceno 21 kumarinů; 4 polyfenoly; 1,4-dihydroxyanthron; latex *Croton lechleri* (*Euphorbiaceae*) a jeho chloroformový extrakt; látky izolované z *Helianthus annuus* (*Asteraceae*) - kyselina kaurenová a stigmaterol. Nejlepší antiagregační účinek prokázal trans-resveratrol při agregaci vyvolané COL a ADP. Látky izolované z butanolového extraktu *Helianthus annuus* nevykázaly žádný antiagregační účinek. Vynikající antiagregační účinek vykázal čistý latex *Croton lechleri* a to u všech agregčních činitelů, při koncentraci 0,5 mg/ml PRP inhiboval všechny agregční činitele o 100 %. Dobrou antiagregační aktivitu vykázal také jeho chloroformový extrakt.

Na kumarinech přírodního původu monomethoxy a monohydroxy kumarinu scopoletinu (1) a jeho 7-glykosidu scopolinu (4) je patrné, že glykosylace snižuje antiagregační aktivitu, zejména u agregace indukované COL a AA. Tato skutečnost odpovídá dříve prováděné studii Guerrero et al. (GUERRERO M.F., 2002), ve které je uvedeno, že glykosylované formy některých flavonoidů jsou méně aktivní, než jejich aglykony. Kumariny přírodního původu, umbelliferon (7-hydroxykumarin) (3), hymecromon (7-hydroxy-4-methylkumarin) (5) nevykázaly žádnou antiagregační aktivitu v PRP proti hlavním agregčním činitelům COL,



ADP a AA. Trigokumarin (C3 ethyl ester kyseliny octové 7,8-dimethoxy-4-methylkumarin) (18) vykázal signifikantní inhibiční efekt na AA-vyvolanou agregaci destiček. Nicméně v porovnání s ASA a dipyridamolem je antiagregační aktivita námi testovaných přírodních kumarinů nízká.

Dihydroxy-4-methylkumarin a jeho C3 ethylester kyseliny octové a C3 ethylester kyseliny propanové vykázaly vynikající antiagregační aktivitu. Antiagregační aktivita měřená v plazmě bohaté na destičky (PRP) jejichž agregace byla vyvolána AA vzrůstá ( $IC_{50}$  klesá) v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) > 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin (6) > 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin (9) (Tab. 9). Podle naší studie, 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) a jeho C3 ethylester kyseliny octové (11) a C3 ethylester kyseliny propanové (12) vykázaly vynikající vliv na agregaci destiček vyvolanou AA. Jejich hodnoty  $IC_{50}$  jsou porovnatelné s hodnotami acetylsalicylové kyseliny (ASA) (23). 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho C3 deriváty (10-12) inhibují signifikantně také ADP-indukovanou agregaci destiček. Navíc podle publikace Xu, Y. C. (XU Y.C., 2007), struktura polyfenolů s 5-OH a 7-OH, 4-OH, C2=C3 a C=O je nezbytná k tomu, aby sloučenina měla dobré vaskulární relaxační vlastnosti. Oproti tomu 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin a 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin a jejich C3 deriváty (6-9) vykázaly pouze nízkou antiagregační aktivitu. Antiagregační aktivita (u COL - vyvolané agregace) vzrůstá v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (9) > 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin (9) > 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin (6).

Podle našich výsledků inhibiční efekt (u COL - indukované agregace) u dimethoxy-4-methylkumarinů vzrůstá ( $IC_{50}$  klesá) v následujícím pořadí: 7,8-dimethoxy-4-methylkumarin (17) > 5,7-dimethoxy-4-methylkumarin (19). Inhibiční efekt (u ADP a AA-vyvolané agregace) je u těchto látek porovnatelný.

Antiagregační aktivita byla dále porovnána u dihydroxy-4-methylkumarinu, diacetoxy-4-methylkumarinu a dimethoxy-4-methylkumarinu a jejich derivátů C3 ethylesteru kyseliny octové a C3 ethylesteru kyseliny propanové. Inhibiční aktivita agregace destiček vzrůstala v následujícím pořadí: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (10) > 5,7-diacetoxy-4-methylkumarin (16) > 5,7-dimethoxy-4-methylkumarin (19). Nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v inhibici agregace destiček u 7,8-dihydroxy-4-methylkumarinu (6), 7,8-

diacetoxy-4-methylkumarinu (13) a 7,8-dimethoxy-4-methylkumarinu (17). Podle těchto výsledků není předpokládán žádný vztah mezi strukturou a aktivitou u těchto látek.

Navíc byla testována látka 1,4-dihydroxyanthron (22), která vykazala signifikantní antiagregační aktivitu, pokud agregace destiček byla indukována AA. Jeho ( $IC_{50} = 16,9 \pm 3,5 \mu M$ ) je porovnatelné se standardem ASA ( $IC_{50} = 16,1 \pm 1,2 \mu M$ ) (23). V případě, že agregace byla indukována COL, antiagregační účinek je srovnatelný s 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny (10). Nicméně tato látka nevykazala žádnou větší inhibiční aktivitu u agregace vyvolané ADP. Přestože antiagregační schopnost námi testovaných kumarinů byla nižší než standardů ASA (23) a dipyridamolu (24), skupina 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu a jeho C3 derivátů (10-12) vykazovala porovnatelnou antiagregační aktivitu (agregace indukována AA) jako měřené standardy. Tyto látky jsou slibné pro další testování. Nicméně pro zjištění mechanismu účinku je nezbytné další testování. Bohužel skupina 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinů nevykazala téměř žádnou antioxidační aktivitu měřenou oběma výše uvedenými metodami. Bylo by vhodné rozšířit spektrum použitých agonistů agregace o další látky, např. adrenalin, PAF nebo kalciový ionofor, aby bylo možno přesněji ohraničit metabolické dráhy a mechanismy působení nově izolovaných antitrombocytárně účinných látek. Experimenty *in vivo* na laboratorních zvířatech by umožnily zhodnotit relevanci informací z *in vitro* testů získaných o jednotlivých substancích. Dá se předpokládat, že se látky budou chovat v celkovém organismu poněkud odlišně, nicméně poznání antiagregační aktivity přírodních látek v prvním stupni *in vitro* v sobě nese významný potenciál v poznávání účinku těchto látek a to nejen z hlediska potenciálně farmakoterapeutického, ale především toxikologického. Tak jako je v současnosti věnována velká pozornost látkám prooxidačně působícím (a jsou nalézány překvapivé závěry u řady antioxidantů), tak je vhodné věnovat pozornost látkám, působícím potenciálně proagregačně a to nejenom z hlediska patobiochemického, ale také z hlediska toxikologického. Velmi zajímavé se ukazuje studium vztahu antiagregační a antioxidační aktivity těchto látek.

## 7 ZÁVĚR

V této práci bylo využito pro měření antioxidační aktivity vysoce citlivých a modifikovaných metod SIA a FRAP, pro zjišťování radikál zhášecí aktivity a železito-redukční schopnosti látek. Za použití těchto metod byl určen vztah mezi strukturou a antioxidační aktivitou testovaných potenciálních antioxidantů. Bylo potvrzeno, že excelentní antioxidační aktivita u dihydroxy derivátů 4-methylkumarinů závisí na *ortho*-pozici hydroxylových skupin na benzenovém jádře. Schopnost zhášet radikály DPPH u dihydroxy-4-methylkumarinů jde v následujícím pořadí: 7,8-dihydroxy-4-methylkumariny ( $EC_{50} = 24,9 \pm 2,7 \mu M$ ) > 6,7-dihydroxy-4-methylkumariny ( $EC_{50} = 74,7 \pm 4,9 \mu M$ ) > 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny ( $EC_{50} > 750 \mu M$ ). Stejný závěr potvrdil také FRAP test. Redukční aktivita dihydroxy-4-methylkumarinů je závislá na *ortho*-pozici hydroxylů na benzenovém jádře. Největší redukční aktivitu vykazoval 6,7-dihydroxy-4-methylkumarin ( $FRAP_{\text{value po } 4\text{min}} = 38,3 \pm 0,9 \mu M$ ,  $FRAP_{\text{value po } 60\text{min}} = 72,8 \pm 5,2 \mu M$ ) a 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho C3 deriváty ( $FRAP_{\text{value po } 4\text{min}} = 20,3 \pm 3,3 \mu M$ ,  $FRAP_{\text{value po } 60\text{min}} = 43,9 \pm 5,9 \mu M$ ). Navíc byl testován také 1,4-dihydroxyanthron za účelem zjistit, zdali více modifikované struktury jsou také schopny vykazat nějakou radikál zhášecí aktivitu nebo mají schopnost redukovat železité ionty. Testovaný 1,4-dihydroxyanthron vykazoval signifikantní radikál zhášecí aktivitu porovnatelnou s aktivitou 6,7-dihydroxy-4-methylkumarinů a vykazoval i vynikající schopnost redukovat železité ionty na železnaté. Dobrou radikál zhášecí aktivitu vykázal také čistý latex peruánského keře *Croton lechleri* ( $EC_{50} = 0,0347 \pm 0,018 \text{ mg/ml}$ ). Z testovaných polyfenolů nejvyšší aktivitu vykazala kyselina gallová ( $EC_{50} = 0,0025 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ ), ale také ostatní polyfenoly měly antioxidační aktivitu značně vysokou.

Dále byla v této práci měřena antiagregační aktivita všech potenciálních antioxidantů. Z přírodních kumarinů vykázal trigokumarin (C3 ethyl ester kyseliny octové 7,8-dimethoxy-4-methylkumarin) (18) signifikantní inhibiční efekt u AA-vyvolané agregaci destiček. Nicméně v porovnání s ASA a dipyridamolem byla antiagregační aktivita testovaných přírodních kumarinů nízká. Ze syntetických kumarinů vykazala nejslibnější antiagregační aktivitu skupina 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu a jeho C3 ethylester kyseliny octové a C3 ethylester kyseliny propanové (10-12). Antiagregační aktivita těchto látek je porovnatelná

s antiagregační aktivitou ASA měřenou *in vitro* v PRP, kdy agregace byla indukována AA. 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho C3 deriváty (10-12) inhibují signifikantně také ADP a COL-vyvolanou agregaci destiček. Navíc byla testována látka 1,4-dihydroxyanthron (22), která vykazala signifikantní antiagregační aktivitu, pokud agregace destiček byla indukována AA. Jeho ( $IC_{50} = 16,9 \pm 3,5 \mu M$ ) je porovnatelné se standardem ASA ( $IC_{50} = 16,1 \pm 1,2 \mu M$ ) (20). V případě že agregace byla vyvolána COL, je antiagregační účinek srovnatelný s 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny (10). Tato látka ale nevykazala žádnou větší inhibiční aktivitu u agregace indukované ADP. Latex *Croton lechleri* snižoval agregaci destiček při celkové koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) o  $100 \pm 14 \%$  u agregace vyvolané COL, o  $100 \pm 11 \%$  u agregace vyvolané ADP a o  $100 \pm 9 \%$  u agregace vyvolané AA. Antiagregační aktivita chloroformového extraktu čistého latexu o finální koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) byla  $100 \pm 12 \%$  (COL),  $81,33 \pm 9 \%$  (ADP) a  $67 \pm 8,5 \%$  (AA).

## 8 SOUHRN

Z široké skupiny strukturně rozdílných látek přírodního původu (popř. rostlinných extraktů) a jejich syntetických analogů byly vyhledávány takové látky, které by vykazovaly výrazný antioxidační účinek a které by zároveň disponovaly jinými, terapeuticky využitelnými účinky (antiagregační aktivitou). Radikál zhášecí aktivita látek a extraktů byla měřena pomocí modifikovaného DPPH testu využívajícího programovatelného SIA (sekvenční injekční analýza) systému. Výrazný radikál zhášecí účinek vykázaly látky typu polyfenolů, zejména kyselina gallová ( $EC_{50} = 0,0025 \pm 0,002$  mg/ml) a ethyl-gallát ( $EC_{50} = 0,0038 \pm 0,001$  mg/ml). Také čistý latex *Croton lechleri* vykázal radikál zhášecí aktivitu ( $EC_{50} = 0,0347 \pm 0,018$  mg/ml). Z testovaných methylkumarinů vykázaly excelentní antioxidační aktivitu *ortho*-dihydroxy-4-methylkumariny, konkrétně 7,8-dihydroxy-4-methylkumarin a jeho deriváty ( $EC_{50} = 24,9 \pm 2,7$   $\mu$ M). Antioxidační aktivita byla dále testována pomocí FRAP metody modifikované za využití mikrodestiček typu P 400  $\mu$ l. Z testovaných kumarinů vykázaly rovněž (stejně jako v DPPH testu) *ortho*-dihydroxy-4-methylkumariny výrazný antioxidační účinek.

Antiagregační aktivita byla hodnocena *in vitro* na lidských trombocytech v plazmě bohaté na destičky (PRP, platelets rich plasma;  $250 \times 10^9$  destiček/l). Použitá koncentrace extraktu pro testování byla 500  $\mu$ g/ml PRP. Jako agonisté agregace byly užity kyselina arachidonová (AA; koncentrace v kyvetě 0,5 mM), adenosindifosfát (ADP; konc. 10  $\mu$ M) a kolagen (COL; konc. 2  $\mu$ g/ml). Latex *Croton lechleri* snižoval agregační aktivitu činitelů při celkové koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) o  $100 \pm 14$  % u agregace vyvolané (COL), o  $100 \pm 11$  % u agregace vyvolané (ADP) a o  $100 \pm 9$  % u agregace vyvolané (AA). Antiagregační aktivita chloroformového extraktu čistého latexu o finální koncentraci 0,5 mg/ml (PRP) byla  $100 \pm 12$  % (COL),  $81,33 \pm 9$  % (ADP) a  $67 \pm 8,5$  % (AA). Ze skupiny testovaných kumarinů vykázala nejvyšší antiagregační aktivitu skupina 5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu a jeho C3 derivátů. *Ortho*-dihydroxy-4-methylkumariny vykázaly antiagregační aktivitu zhruba 10x nižší v porovnání s ASA u ADP indukované agregace a 20x nižší účinek v porovnání s ASA u AA indukované agregace.

## 9 SUMMARY

The effort to find compounds with significant antioxidant properties and with some other therapeutically useful biological activity (e.g. anti-platelet activity) from the wide group of structurally different naturally occurring compounds (or plant extracts) or their synthetic derivatives, was the purpose of this work. Radical Scavenging activity of tested compounds or plant extracts was measured by modified DPPH test using program SIA (sequential injection analysis). Significant radical scavenging activity exhibited polyphenols, namely gallic acid ( $EC_{50} = 0,0025 \pm 0,002$  mg/ml) and ethyl-gallate ( $EC_{50} = 0,0038 \pm 0,001$  mg/ml). Also the pure latex of *Croton lechleri* exhibited significantly radical scavenging activity ( $EC_{50} = 0,0347 \pm 0,018$  mg/ml). From the group of tested methylcoumarins, the excellent antioxidant activity exhibited *ortho*-dihydroxy-4-methylcoumarins, especially 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin and its derivatives ( $EC_{50} = 24,9 \pm 2,7$   $\mu$ M). Further was the antioxidant activity tested by FRAP methods modified to used micropalates P 400  $\mu$ l. This spectrophotometric method based on ability of compounds to reduce  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$ , confirmed the antioxidant activity of *ortho*-dihydroxy-4-methylcoumarins.

The antiplatelet activity of pure compounds and herbal extracts was assayed *in vitro* on the model of human platelets rich plasma (PRP;  $250 \times 10^9$  platelets/L) at a concentration of 500  $\mu$ g/mL PRP. Arachidonic acid (AA; final concentration in cuvette was 0,5 mM), adenosine diphosphate (ADP; final conc. 10  $\mu$ M) and collagen (COL; final conc. 2  $\mu$ g/mL) were used as agonists of platelet aggregation. Pure sap of *Croton lechleri*: at final conc. 0,5 mg/ml of medium (PRP) decreased platelet aggregation by  $100 \pm 14$  % (COL),  $100 \pm 11$  % (ADP) and  $100 \pm 9$  % (AA). Chloroform extract from Croton's sap: at final concentration 0,5 mg/ml of medium (PRP) decreased platelet aggregation by  $100 \pm 12$  % (COL),  $81,33 \pm 9$  % (ADP) and  $67 \pm 8,5$  % (AA).

From the group of tested coumarins the highest anti-aggregation activity exhibited the group of 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin and its C3 derivatives. *Ortho*-dihydroxy-4-methylcoumarins exhibited anti-platelet activity approximately 10x lower compared to ASA, when the aggregation was induced by ADP and 20x lower, when the aggregation was induced by AA.

# 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Arnao M.B., Cano A., Alcolea J.F., Acosta M.: Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem. Anal.*, 12, 2001, 138-143.

Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M.: Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1998, 1355-1363.

Aruoma O.I.: Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.*, 523-524, 2003, 9-20.

Balasundram N., Sundram K., Samman S.: Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 2006, 191-203.

Belinky P. A., Aviram M., Mahmood S., Vaya J.: Structural aspects of the inhibitory effect of glabridin on LDL oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1998, 1419-1429.

Bennett J.S.: Novel platelet inhibitors. *Annu. Rev. Med.*, 52, 2001, 161-184.

Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 1996, 70-76.

Benzie I.F., Strain J.J.: Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, 299, 1999, 15-27.

Bondet V., Brand-Williams W., Berset C.: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical Method. *Leben. Wissenschaft Tech. Food Sci. Tech.*, 30, 1997, 609-615.

Born G.V.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194, 1962, 927-929.

Bravo L.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56, 1998, 317-333.

Cai Y. Z.; Sun M.; Corke H.: Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2003, 2288-2294.

- Cai Y.Z., Mei S., Jie X., Luo Q., Corke H.: Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, 78, 2006, 2872-2888.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 1997, 749-760.
- Daglia M., Papetti A., Gregotti C., Berte F., Gazzani G.: *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2000, 1449-1454.
- Dapkevicius A., Van Beek T.A., Niederlander H.A.: Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *J. Chromatogr. A.*, 912, 2001, 73-82.
- Dikalov S., Jiang J., Mason R.P.: Characterization of the high-resolution ESR spectra of  $O_2^{\cdot -}$  adducts of DEPMPO and DMPO. Analysis of conformational exchange. *Free Radic. Res.*, 39, 2005, 825-836.
- Dugas A. J. Jr., Castaneda-Acosta J., Bonin G. C., Price K. L., Fischer N. H., Winston G. W.: Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 63, 2000, 327-331.
- Du Toit R., Volsteedt Y., Apostolides Z.: Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicol.*, 166, 2001, 63-69.
- Einbond L.S., Reynertson K.A., Luo X.D., Basile M.J., Kennelly E.J.: Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem.*, 84, 2004, 23-24.
- Espin J.C., Soler-Rivas C., Wichers H.J.: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2000, 648-656.
- Facino R.M., Carini M., Franzoi L., Pirola O., Bosisio E.: Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmacol. Res.*, 22, 1990, 709-721.
- Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1721, 2005, 174-184.
- Firuzi O., Mladenka P., Petrucci R., Marrosu G., Saso L.: Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, 2004, 801-807.
- Freitas I., Griffini P., Bertone V., Bertone R., Fenoglio C., Millery R., Vairetti M.: In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological



tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp. Gerontol*, 37, 2002, 591-602.

Frost M.T., Halliwell B., Moore P.K.: Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem. J.*, 345, 2000, 453-458.

Fylaktakidou K.C., Hadjipavlou-Litina D.J., Litinas K.E., Nicolaidis D.N.: Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.*, 10, 2004, 3813-3833.

Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G.: Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Prot.*, 64, 2001, 120-131.

Giulivi C., Boveris A., Cadenas E: The steady-state concentrations of oxygen radicals in mitochondria In: D.L. Gilbert and C.A. Colton, Editors, *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, 77–102.

Gosh M., Wang H.D., McNeill R.: Tiron exerts effects unrelated to its role as a scavenger of  $O_2^{\cdot -}$  : effects on  $Ca^{2+}$  binding and vascular responses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 80, 2002, 755-760.

Guo J.T., Lee H.L., Chiang S.H., Lin F.I., Chang, C.Y.: Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *J. Food Drug Anal.*, 9(2), 2001, 96-101.

Guerrero M.F., Puebla P., Carron R., Martin M.L., San Roman L.: Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 2002, 1373-1378.

Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 1994, 845–850.

Halliwell B., Whiteman M.: Measuring RS and oxidative damage *in vivo* and in the cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142, 2004, 231-255.

Huang D., Ou B., Prior R.L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2005, 1841-1856.

Husain S. R., Cillard J., Cillard P.: Hydroxyl radical scavenging activity of Flavonoids. *Phytochem.*, 26, 1987, 2489-2491.

Che-Ming Teng, Huey-Lin Li, Tian-Shung Wu, Shio-Chyn Huang, Tur-Fu Huang: Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. *Thromb. Res.*, 66, 1992, 549-557.

Chrono-Log Co. *Dokumentace k agregometru Chrono-log 500-Ca*. vyd. Chrono-Log Co., USA, 1996.

Ingerman-Wojenski C.M., Silver M.J.: A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb. Haemost.*, 51, 1984, 154-156.

Ischiropoulos H.: Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 2003, 776-783.

Iwakami S., Wu J.B., Ebizuka Y., Sankawa U.: Platelet activating factor (PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes. *Chem. Pharm. Bull.*(Tokyo), 40, 1992, 1196-1198.

Jahodář L. Rostlinné jedy. In Hrdina V. et al. *Přírodní toxiny a jedy*. Galen, Praha 2004, str. 22-90.

Jun D., Fusek J., Opletal L.: Disertační práce-Látky přírodního původu ovlivňující trombocytární agregaci u člověka (*in vitro*), 2005.

Kostova I.: Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 5, 2005, 29-46.

Kostova I.: Synthetic and natural coumarins as antioxidants. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 6, 2006, 365-374.

Kumar S.K., Hager E., Pettit C., Gurulingappa H., Davidson N.E., Khan S.R.: Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J. Med. Chem.*, 46, 2003, 2813-2815.

Landolfi R., Mower R.L., Steiner M.: Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1984, 1525-1530.

Lu Y., Foo L.Y.: Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, 75, 2001, 197-202.

Masamoto Y., Ando H., Murata Y., Shimoishi Y., Tada M., Takahata K.: Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2003, 631-634.

Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A.: Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384, 1996, 240-242.

Morazzoni P., Bombardelli E.: *Silybum marianum* ( *Cardus marianus* ). *Fitoterapia*, 66, 1995, 6-42.

Mower R.L., Landolfi R., Steiner M.: Inhibition in vitro of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1984, 357-363.

Nakamura T., Nishi H., Kokusenya Y., Sato T.: Antioxidative activity estimation of methanol extracts of crude drugs by electrochemical detection-high performance liquid chromatography (ECD-HPLC) and correlation with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities. *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 1998, 1388-1392.

Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y.: Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 21, 1996, 895-902.

Ng T.B., Liu F., Wang Z.T.: Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.*, 66, 2000, 709-723.

Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P.: Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, 43, 1997, 1209-1214.

O'Brien J. R.: Platelet aggregation. Part II. Some results from a new method of study. *J. Clin. Pathol.*, 15, 1962, 452-455.

Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L.: Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2001, 4619-4626.

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 3122-3128.

Parmar V.S., Jha H.N., Sanduja S.K., Sanduja R.: Trigocoumarin-a new coumarin from *Trigonella foenum-graecum*. *Z. Naturforsch*, 37b, 1982, 521-523.

Paulova, H., Bochorakova, H., and Taborska, E.: In vitro methods for estimation of the antioxidant activity of natural compounds. *Chem. Listy*, 98, 2004, 174-179.

Paulova H., Bochorakova H., Slanina J., Taborska E.: Evaluation of hydroxyl radical-scavenging activity of baicalin using HPLC Metod. *Pharm. Pharmacol. Lett.*: 10(1), 2000, 27-30.

Pedersen C.B., Kyle J., Jenkinson A.M., Gardner P.T., Mcphail D.B., Duthie G.G.: Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54, 2000, 405-408.

Petronelli A., Roda E., Briganti M., Morselli-Labate A.M., Barbara L.: Effect of administration of sylimarin on serum lipid levels. *Clin. Ter.*, 99, 1981, 471–482.

Pi-Jen Tsai, McIntoshb J., Pearceb P., Camdenb B., Jordan B.R.: Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Res. Inter.*, 4, 2002, 351-356.

Podczasy J. J., Lee J., Vucenik I.: Evaluation of whole-blood lumiaggregation. *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis*, 3, 1997, 190-195.

Polasek M., Skala P., Opletal L., Jahodar L.: Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, 2004, 754-758.

Raj H.G., Sharma R.K., Garg B.S., Parmar V.S., Jain S.C., Goel S., Tyagi Y.K., Singh A., Olsen C.E., Wengel J.: Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 3: A novel mechanism for the inhibition of biological membrane lipid peroxidation by dioxygenated 4-methylcoumarins mediated by the formation of a stable ADP-Fe-inhibitor mixed ligand complex. *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 1998, 2205-2212.

Ramsewak R.S., Dewitt D.L., Nair M.G.: Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomed.*, 7, 2000, 303-308.

Rapta P., Misik V., Stasko A., Vrabel I.: Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1995, 901-908.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B.: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.*, 22, 1995, 375-383.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 1996, 933-956.

Rietjens I.M., Martena M.J., Boersma M.G., Spiegelberg W., Alink G.M.: Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 2005, 131-158.

Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W.: Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits - effect of environment and variety on composition. *Food Chem.*, 66, 1999, 401-436.

Roginsky V., Lissi E. A.: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92, 2005, 235-254.

Ruby A.J., Kuttan G., Babu K.D., Rajasekharan K.N., Kuttan R.: Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.*, 94, 1995, 79-83.

Sirridge M.: Laboratory evaluation of the bleeding patient. *Clin. Lab. Med.*, 4, 1984, 285-301.

Shibata T., Nagayama K., Tanaka R., Yamaguchi K., Nakamura T.: Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A<sub>2</sub>s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *J. Appl. Phycol.*, 15, 2003, 61-66.

Štípek S., Borovanský J., Čejková J., Homolka J., Klener P., Lukáš M., Špičák J., Tesař V., Zeman M., Zima T., Žák A.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Grada Publishing a.s. 2000.

Tarpey M.M., Wink D.A., Grisham M.B.: Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, 2004, R431-444.

Tiew P., Ioset J.R., Kokpol U., Chavasiri W., Hostettmann K.: Antifungal, antioxidant and larvicidal activities of compounds isolated from the heartwood of *Mansonia gagei*. *Phytother. Res.*, 17, 2003, 190-193.

Tzeng S.H., Ko W.C., Ko F.N., Teng C.M.: Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res.*, 64, 1991, 91-100.

Van Der Sluis A.A., Dekker M., Verkerk R., Jongen W.M.: An improved, rapid *in vitro* method to measure antioxidant activity. Application on selected flavonoids and apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2000, 4116-4122.

Xu Y.C., Leung S.W., Yeung D.K., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M., Man R.Y.: Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochem.*, 68, 2007, 1179-1188.

Yamanaka N., Oda O., Nagao S.: Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.*, 405, 1997, 186-190.

Yoshioka H., Ohashi Y., Akaboshi M., Senba Y., Yoshioka H.: A novel method of measuring hydroxyl radical-scavenging activity of antioxidants using gamma-irradiation. *Free Radic. Res.*, 35, 2001, 265-271.

Yun B.S., Lee I.K., Ryoo I.J., Yoo I.D.: Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*. *J. Nat. Prod.*, 64, 2001, 1238-1240.

Unno T., Yayabe F., Hayakawa T., Tsuge H.: Electron spin resonance spectroscopic evaluation of scavenging activity of tea catechins on superoxide radicals generated by a phenazine methosulfate and NADH system. *Food Chem.*, 76, 2002, 259.

Williamson G., Manach C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1, 2005, 243–255.

## 11 SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ

REHAKOVA Z., KOLECKAR V., CERVENKA F., JAHODAR L., SASO L., OPLETAL L., JUN D., KUCA K.: DPPH radical scavenging activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues measured by SIA Metod. *Toxicol. Mechan. Methods*, 18(5), 2008, 413-418.

REHAKOVA Z., KARLICKOVA J., JAHODAR L.: Slunečnice roční (*Helianthus annuus*)-Obsahové látky a biologická aktivita. *Chem. Listy*, 102, 2008, 116-123.

SHALOVA I.N.; CECHALOVA K.; REHAKOVA Z.; DIMITROVA P.; OGNIBENE E.; CAPRIOLI A.; SCHMALHAUSEN E.V.; MURONETZ V.I.; SASO L.: Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1770(5), 2007, 826-32.

KOLECKAR V, BROJEROVA E, REHAKOVA Z., KUBIKOVA K, CERVENKA F, KUCA K, JUN D, HRONEK M, OPLETALOVA V, OPLETAL L.: *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug Chem. Toxicol.*, 31(1), 2008, 27-35.

KOLECKAR V., OPLETAL L., BROJEROVA E., REHAKOVA Z., CERVENKA F., KUBIKOVA K., KUCA K., JUN D., POLASEK M., KUNES J., JAHODAR L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of screening study of 88 plant extracts from the European *Asteraceae* and *Cichoriaceae*. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 23(2), 2007, 218-224.

STODULKA P., KOLECKAR V., JUN D., KUCA K., REHAKOVA Z., KUBIKOVA K., JAHODAR L., KUNES J., OPLETAL L.: High-performance Liquid Chromatography Analysis of Four *Leuzea carthamoides* Flavonoids. *J. Chromatograph. Sci.*, 46(2), 2008, 162-164.

KOLECKAR V., KUBIKOVA K., REHAKOVA Z., KUCA K., JUN D., JAHODAR L., OPLETAL L.: Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health: *Mini-Rev. Med. Chem.*, 8, 2008, 436-447.

## 12Konference-postery, přednášky

MLADENKA P., ZATLOUKALOVA L., MACAKOVA K., REHAKOVA Z., KUMAR PRASAD A., PARMAR P.S., SASO L., HRDINA R.: *In vitro* iron chelation activity of selected polyphenolic compounds. EP HAR 2008 Congress – Manchester, Great Britain, July 12-17, 2008, Fundam Clin Pharmacol, 2008; 22 (suppl. 2) S. 58.

MACAKOVA K., MLADENKA P., REHAKOVA Z., ZATLOUKALOVA L., HRDINA R., OPLETAL L., KARLICKOVA J., JAHODAR L.: Ferrous and ferric chelation activity of selected natural flavonoids. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF – Athens, Greece, August 3-8, 2008; Planta Med, 2008; 74 S. 946 [PA33]

REHAKOVA Z., CERVENKA F., KUBIKOVA K., KARLICKOVA J., JAHODAR L., SASO L.: *Evaluation of the antioxidant activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues*. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, September 2-6, 2007, Graz, Austria; Planta Med 2007;73 S. 975 [P486].

KUBIKOVA K., OPLETAL L., KOLECKAR V., POLASEK M., JAHODAR L., REHAKOVA Z., KARLICKOVA J.: *Free radical scavenging activity of mushrooms from order Polyporales*. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, September 2-6, 2007, Graz, Austria; Planta Med 2007;73 s. 974 [P483].

KARLICKOVA J., JAHODAR L., BUCHTA V., REHAKOVA Z., KUBIKOVA K.: *Antifungal activity of Helianthus annuus L.* 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, September 2-6, 2007, Graz, Austria; Planta Med 2007;73 s. 879 [P175].



REHAKOVA Z.: *Biologická aktivita kumarinů rostlinného původu a jejich syntetických analogů*. Abstrakt Česká a slovenská farmacie 56(4), 2007, 207.

REHAKOVA Z., KARLICKOVA J, JAHODAR L, KOLECKAR V, DRESLER J, NOVOSADOVA Z: *Pharmacognostic study of Helianthus annuus L-* Conference Proceedings, DPhG Jahrestagung – Joint Meeting 2006, Marburg, Germany, October 5-7, 2006, 107.

CERVENKA, F., REHAKOVA, Z., BROJEROVA, E., KOLECKAR, V., VYTLACILOVA, J., JAHODAR, L., *Evolvulus alsinoides – Phytochemical analysis*, Conference Proceedings, DPhG Jahrestagung – Joint Meeting 2006, Marburg, Germany, October 5-7, 2006, 106.

KOLECKAR V, BROJEROVA E, OPLETAL L, REHAKOVA Z, KUBIKOVA K, CERVENKA F, KUNES J, JUN D, JAHODAR L, POLASEK M: *Antioxidative and antiaggregating flavonoids from Leuzea carthamoides-* Conference Proceedings, DPhG Jahrestagung – Joint Meeting 2006, Marburg, Germany, October 5-7, 2006, 105.

REHAKOVA Z., JAHODAR L., BROJEROVA E., KOLECKAR V., KARLICKOVA J., OPLETAL L.: *Anti-platelet and antioxidant activity of the latex from Croton lechleri (Sangre de dragon)(Euphorbiaceae) -1<sup>st</sup> International Mediterranean pharmacy congress in Mersin 2005, Turkey, October 28-31, 128.*

## **13Studijní pobyty**

Leden-květen 2006, Department of Human Pharmacology and Physiology, University La Sapienza, Roma, Italy