

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



METODA STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍHO/ANTIRADIKÁLOVÉHO
PŮSOBENÍ APLIKOVATELNÁ VE VYHLEDÁVACÍM VÝZKUMU
PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Doktorská disertační práce

Mgr. Vít Kolečkář

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Oborová rada: Farmakognosie

Hradec Králové

2010

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odbornou pomoc při provádění experimentů, během sepisování této práce a také za vytvoření vhodných podmínek pro odborný růst. Dík patří mé spolupracovnici Mgr. Elišce Brojerové za pomoc během společného postupu izolace rostlinných metabolitů a provedení biologických experimentů, a také PharmDr. Zuzaně Řehákové PhD., za spolupráci během testování biologických aktivit izolovaných látek. Dále děkuji celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemných podmínek pro práci.

Disertační práce vznikla za podpory grantů:

Centrum pro výzkum struktury a mechanismu účinku potenciálních léčiv (LN00B125/2003). Screening přírodních látek na antioxidační a trombocytárně antiagregační aktivitu (IGA UK 124/2005/B-BIO). Prostředky specifického výzkumu na UK v Praze, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové (SVV-2010-261-002). Výzkumný záměr Ministerstva školství České republiky (MSM 0021620822).

Vít Kolečkář

V Hradci Králové 2010

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

Vít Kolečkář

V Hradci Králové 2010

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK | 6 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| Antioxidanty, volné radikály | 10 |
| Antioxidační enzymy | 12 |
| Antioxidační neenzymové proteiny | 12 |
| Nízkomolekulární endogenní antioxidanty | 12 |
| Exogenní syntetické antioxidanty | 14 |
| Exogenní přírodní antioxidanty | 14 |
| Fenolické kyseliny | 16 |
| Flavonoidy | 16 |
| Kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny) | 17 |
| Oxidační stres u diabetu a aterosklerózy | 19 |
| Diabetes mellitus | 19 |
| Ateroskleróza | 20 |
| Trombocytární agregace a její ovlivnění | 21 |
| Hemostáza | 21 |
| Antiagregační látky | 22 |
| Měření antioxidační aktivity přírodních látek | 23 |
| 3. CÍL PRÁCE | 26 |
| 4. MATERIÁL A METODY | 28 |
| Chemikálie | 29 |
| Příprava sloupce polyamidu | 30 |
| Příprava sloupce silikagelu | 30 |
| Tenkovrstvá chromatografie | 30 |
| Odpařování frakcí | 31 |
| Sušení extraktů a izolovaných látek | 31 |
| Měření teploty tání | 31 |
| UV spektrofotometrie | 31 |
| NMR analýza | 31 |
| MS analýza | 31 |
| Příprava rostlinných extraktů | 32 |
| Detekční činidla pro TLC | 32 |
| DPPH-SIA test | 32 |
| FRAP test | 34 |
| Antiagregační test | 35 |
| Kvantitativní analýza izolovaných látek | 36 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY | 37 |
| Antioxidační analýza 87 extraktů | 38 |
| Extrakce listů <i>L. carthamoides</i> | 41 |
| Antioxidační aktivita frakcí získaných sloupcovou kapalinovou chromatografií | 43 |
| Látka LC-1 (hispidulin) ze spojené frakce 4 | 47 |
| Látka LC-2 (eriodiktyol) ze spojené frakce 5 | 47 |
| Látka LC-3 (patuletin) a LC-4 (kys. 4-hydroxybenzoová) ze spojené frakce 6 | 48 |
| Látka LC-5 (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová) ze spojené frakce 8 | 49 |
| Látka LC-6 (patuletin-3'-β-D-xylofuranosid) ze spojené frakce 9 | 50 |

| | |
|---|-----|
| Látka LC-7 (6-hydroxykemferol-7- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetyl- β -D-glukopyranosid)) ze spojené frakce 10 | 54 |
| Látka LC-8 (eriodiktyol-7- β -D-glukopyranosid) ze spojené frakce 11..... | 54 |
| Výsledky DPPH testu | 54 |
| Výsledky FRAP testu..... | 56 |
| Výsledky antiagregačního testu | 57 |
| Výsledky kvantitativní analýzy | 57 |
| 6. DISKUSE..... | 58 |
| Biologická aktivita přírodních látek | 59 |
| Kardioprotektivní působení polyfenolů | 61 |
| Antineoplastické působení polyfenolů | 63 |
| <i>In vivo</i> studie polyfenolů..... | 64 |
| Antioxidační aktivita čeledí Asteroideae a Cichorioideae | 67 |
| DPPH-SIA antioxidační screening rostlinných extraktů | 68 |
| <i>Leuzea carthamoides</i> – obsahové látky, biologické účinky | 69 |
| Izolace antioxidačních látek z parchy saflorové..... | 70 |
| Flavonoidy a jejich biologické působení | 72 |
| Nežádoucí účinky flavonoidů | 73 |
| Antioxidační analýza izolovaných látek | 74 |
| Vztah mezi strukturou a antioxidační aktivitou flavonoidů..... | 75 |
| Antiagregační analýza izolovaných látek | 77 |
| Kvantitativní analýza | 78 |
| Závěr | 78 |
| 7. ABSTRAKT..... | 81 |
| 8. ABSTRACT..... | 84 |
| 9. LITERATURA | 87 |
| 10. SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ..... | 97 |
| Práce vztahující se k disertační práci | 98 |
| Postery a abstrakty | 98 |
| Ústní prezentace | 99 |
| Publikace v českých časopisech | 99 |
| Publikace v zahraničních časopisech | 99 |
| Ostatní práce..... | 100 |
| Postery a abstrakty | 100 |
| Ústní prezentace | 101 |
| Publikace v českých časopisech | 101 |
| Publikace v zahraničních časopisech | 101 |

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK

| | |
|------|---|
| AA | arachidonová kyselina |
| ABTS | 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonová kyselina) |
| ADH | antidiuretický hormon |
| ADP | adenosindifosfát |
| AGE | pokročilé produkty glykace |
| ASA | kyselina acetylsalicylová |
| BHT | 3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxytoluen |
| COL | kolagen |
| COX | cyklooxygenasa |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DPPH | difenylpicrylhydrazyl |
| ESR | elektronová spinová rezonance |
| FMD | flow-mediated dilation |
| FNC | frakce nefenolických látek |
| FPC | frakce fenolických látek |
| FRAP | ferric reducing antioxidant power |
| FSH | folikuly stimulující hormon |
| GSH | glutathion |
| HDL | lipoproteiny o vysoké hustotě |
| IL | interleukin |
| LC-1 | hispidulin |
| LC-2 | eriodiktyol |
| LC-3 | patuletin |
| LC-4 | kyselina 4-hydroxybenzoová |
| LC-5 | kyselina 3,4-dihydroxybenzoová |
| LC-6 | patuletin-3'- β -D-xylofuranosid |
| LC-7 | 6-hydroxykemferol-7-O-(6'-O-acetyl- β -D-glukopyranosid) |
| LC-8 | eriodiktyol-7- β -D-glukopyranosid |
| LH | luteinizační hormon |
| LDL | lipoproteiny o nízké hustotě |
| LOX | lipooxygenasa |
| ML | matečný louh |

| | |
|------------------|---|
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid-fosfát |
| NF-κB | nukleární faktor-κB |
| NO | oxid dusnatý |
| NOS | synthasa oxidu dusnatého |
| PAF | faktor aktivující destičky |
| PGI ₂ | prostaglandin I ₂ |
| PGH ₂ | prostaglandin H ₂ |
| PKC | proteinkinasa C |
| PON-2 | paraoxonasa-2 |
| PPP | plazma chudá na destičky |
| PRP | plazma bohatá na destičky |
| Rf | retenční faktor |
| RNS | reaktivní formy dusíku |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SIA | sekvenční injekční analýza |
| SOD | superoxiddismutasa |
| TEAC | trolox equivalent antioxidant capacity |
| TNF-α | tumor nekrotizující faktor-α |
| TPTZ | tri(2-pyridyl)-s-triazin |
| Tris | 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol |
| TROLOX | 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina |
| TXA ₂ | tromboxan A ₂ |
| TXB ₂ | tromboxan B ₂ |
| VLDL | lipoproteiny o velmi nízké hustotě |
| v/v | objemová procenta |
| w/w | hmotnostní procenta |

2. TEORETICKÁ ČÁST

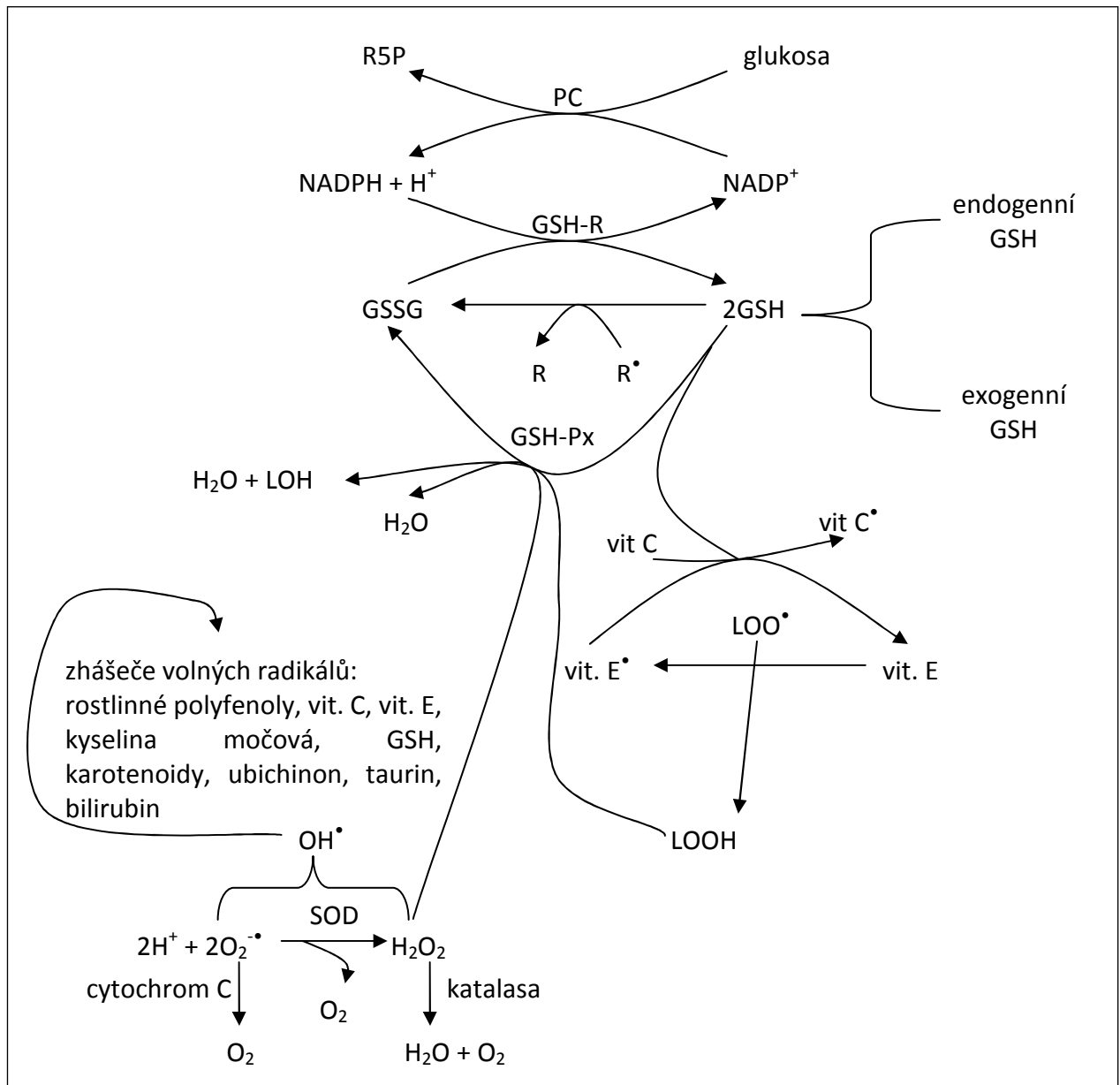
Antioxidanty, volné radikály

Antioxidanty lze definovat jako látky, které při působení v nízkých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit, signifikantně inhibují nebo zpomalují oxidační destrukci těchto látek (Štípek 2000). Díky spojování vývoje a vzniku řady lidských nemocí s působením volných radikálů a oxidačním stresem, získaly antioxidanty velkou vědeckou pozornost zejména z důvodu jejich potenciálního léčebného využití (Cook a Samman 1996; Kolečkář, Brojerová et al. 2007). ROS a RNS se účastní řady fyziologických funkcí (prostředníci přenosu energie, faktory imunitní ochrany, signální molekuly buněčné regulace), ale za určitých okolností se mohou stát škodlivými a organismus poškozovat. Jejich role v patogenezi různých chorobných stavů je však do značné míry proměnlivá a mnohdy nedostatečně objasněna. Všeobecně se předpokládá, že pro správnou funkci biologických systémů je nutné udržet rovnováhu mezi tvorbou a zánikem ROS a RNS (Štípek 2000).

Některé nemoci mohou být přímo způsobeny oxidačním stresem. Jedná se např. o nádorové bujení vyvolané radiačním zářením, které generuje vysoce reaktivní hydroxylové radikály štěpením molekul vody. U nemocí jako je revmatoidní artritida není oxidační stres prvotním vyvolávajícím faktorem, ale přispívá k jejímu rozvoji. Volné radikály mají význam např. v patogenezi stárnutí, u různých kardiovaskulárních chorob, nádorových onemocněních nebo diabetu 2. typu (Cos et al. 2003).

Zdrojem ROS a RNS jsou biochemické, fotochemické nebo radiační reakce endogenního i exogenního původu. Zdroji ROS mohou být některé léčiva (např. chemoterapeutikum bleomycin) nebo přechodné prvky (např. železo, měď), které snadno podléhají redoxním reakcím. Mezi ROS a RNS se řadí jednak volné radikály, např. radikál oxidu dusnatého, superoxidový, hydroxylový, peroxylový nebo alkoxylový radikál a jednak látky neradikálové povahy, např. NO, H₂O₂, HClO nebo O₃. K zachování oxidoredukční rovnováhy a zamezení zvýšené tvorby ROS a RNS využívá organismus různých mechanismů umožňujících vychytávání (tzv. "scavengery", "zhášeče" nebo "lapače") již existujících ROS (RNS) endogenními a exogenními antioxidanty, zamezování novotvorby radikálů regulací enzymů, které je produkují, využití podpory antioxidantních enzymů nebo inaktivaci přechodných kovů. Příklady eliminačních cest volných radikálů jak enzymovou, tak neenzymovou cestou jsou znázorněny na obr. 1. Ze schématu je patrné, že jednotlivé složky systému na sebe často navazují.

Na antioxidační ochraně se podílejí také obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul (Štípek 2000).



Obr. 1. Eliminační cesty volných radikálů. GSSG oxidovaná forma glutathionu; GSH redukovaná forma glutathionu; GSH-Px glutathionperoxidasy; GSH-R glutathionreduktasy; LOH hydroxylované lipidy; LOO[•] lipidové peroxy-radikály; LOOH lipidové hydroperoxy; PC pentosový cyklus; OH[•] hydroxylový radikál; O₂^{•-} superoxidový radikál; R[•] volné radikály; R látka neradikálové povahy; R5P ribulosa-5-fosfát; SOD superoxidodismutasa; vit. E vitamin E; vit. C vitamin C; vit. C[•] radikálová forma vitaminu C

Antioxidační enzymy

K významným antioxidačním enzymům patří SOD, glutathionperoxidasy, glutathiontransferasy a katalasy. SOD se podílí na odstranění přebytečného superoxidového radikálu, který by mohl být redukován na velmi reaktivní hydroxylový radikál (obr. 1.) (Štípek 2000).

Oxidačním stresem vzniklé intracelulární hydroperoxydy mastných kyselin a fosfolipidové hydroperoxydy jsou odstraňovány glutathionperoxidasami. Skupina enzymů zvaných glutathiontransferasy se podílí také na odstraňování produktů lipidové peroxidace. Katalasa umožňuje dismutaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík (obr. 1.) (Marinho et al. 1997; Ursini et al. 1995).

Jako kofaktory antioxidačních enzymů se uplatňují některé stopové prvky. Významnou roli má zinek, selen nebo měď. Zinek a měď jsou kofaktory superoxidodismutasy, selen je kofaktorem glutathionperoxidasy (Štípek 2000).

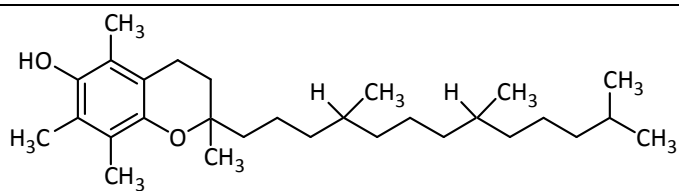
Antioxidační neenzymové proteiny

Za vysokomolekulární neenzymové endogenní antioxidanty lze považovat transferrin, laktoferrin, ferritin, ceruloplazmin a albumin, které vážou přechodné prvky. Prooxidačně aktivní hem a hemoglobin jsou vychytávány hemopexinem resp. heptaglobinem (Štípek 2000).

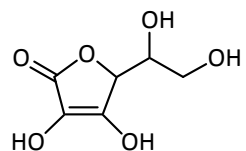
Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

K nízkomolekulárním antioxidantům se řadí např. kyselina askorbová (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), ubichinon (koenzym Q), retinol (vitamin A), thioly (např. tripeptid glutathion), kyselina močová, kyselina lipoová, melatonin nebo bilirubin (obr. 1 a obr. 2).

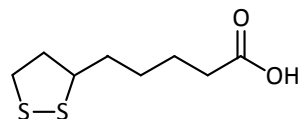
Kyselina askorbová zhasí radikály a regeneruje tokoferol. Vzniklý méně reaktivní askorbylový radikál je přeměněn za účasti glutathionu zpět na askorbát. Tokoferol brání oxidaci lipidů membrán tím, že přeměňuje lipidové peroxy-radikály na hydroperoxydy, které jsou odstraněny glutathionperoxidasou. Ubichinon zhasí volné radikály a regeneruje askorbát. Glutathion, kromě regenerace tokoferolu a askorbátu, chrání sulfhydrylové skupiny cysteinu, ubichinonu a proteinů, a je substrátem glutathionperoxidasy. Kyselina močová vychytává alkoxylový radikál a kyselinu chlornou



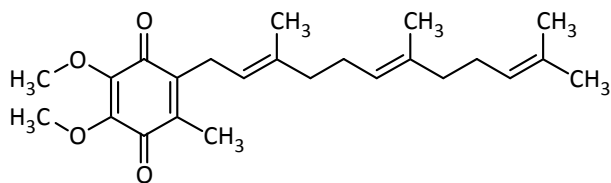
α -tokoferol



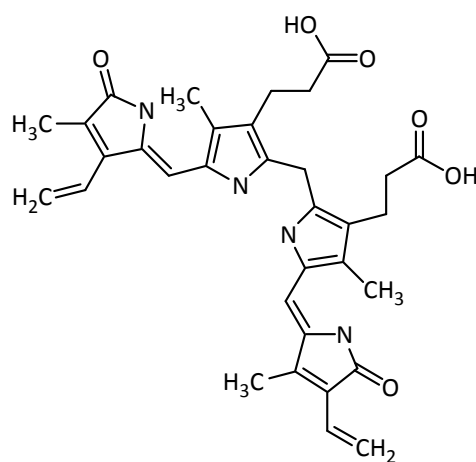
kyselina askorbová



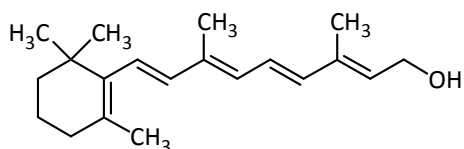
kyselina lipoová



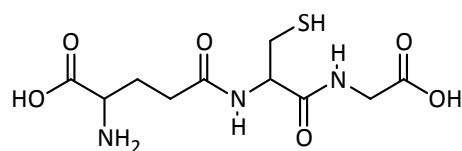
koenzym Q



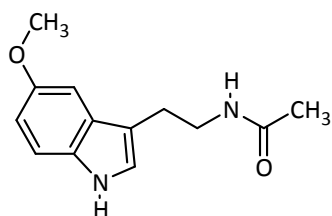
bilirubin



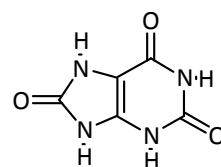
retinol



glutathion



melatonin



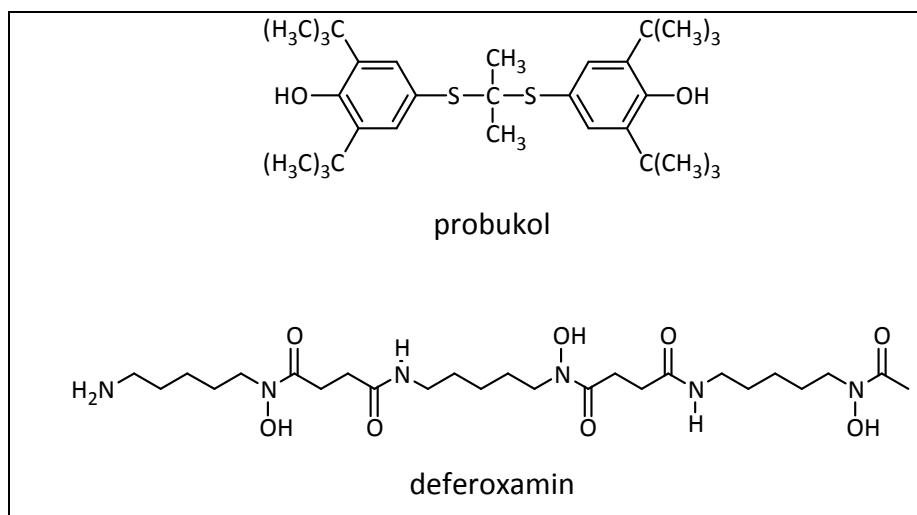
kyselina močová

Obr. 2. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

a váže železo a měď (Štípek 2000). Kyselina lipoová eliminuje radikály a podílí se na regeneraci tokoferolu, askorbátu nebo glutathionu (Packer et al. 1995). Melatonin vykazuje kromě hormonálních účinků také silnou antioxidační aktivitu. Snadno prochází hematoencefalickou bariérou a na rozdíl např. od askorbátu nepodléhá opakovaným redoxním reakcím a nepůsobí tak prooxidačně (Hardeland 2005; Tan et al. 2000). Bilirubin je silným lapačem RNS (Mancuso et al. 2006).

Exogenní syntetické antioxidanty

Mezi syntetické antioxidanty patří např. přídatné látky do potravin BHA (směs izomerů 2-*t*-butyl-hydroxyanizolu a 3-*t*-butyl-hydroxyanizolu), BHT (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxytoluen), PG (propylgallát) a některá léčiva, např. hypolipidemikum probukol nebo chelátor železa deferoxamin (obr. 3) (Štípek 2000).



Obr. 3. Syntetické antioxidanty

Exogenní přírodní antioxidanty

K antioxidantům přírodního původu patří zejména látky fenolického charakteru, zvané polyfenoly. Jsou to sekundární metabolity rostlin s řadou fyziologických funkcí (ovlivnění růstu a reprodukce rostlin, ochrana rostlin před patogeny a predátory). Polyfenoly jsou široce vědecky zkoumány z důvodu možného využití v prevenci a terapii zejména tzv. civilizačních chorob. Přírodní antioxidanty působí proti zánětům, zvýšené srážlivosti krve, mikrobům, aterogenezi, kardioprotektivně nebo vasodilatačně. Jejich zdraví prospěšné účinky se mnohdy dávají do souvislosti

s vysokou antioxidační aktivitou. Polyfenoly jsou významným zdrojem antioxidantů obsažených v mnoha potravinách jako např. ovoce, zelenina, zelený čaj, víno, kakao nebo čokoláda (Balasundram et al. 2006; Kolečkář, Kubíková et al. 2008; Manach et al. 2005).

Přírodní fenolické látky zahrnují více než 8000 látek, od jednoduchých fenolických sloučenin až po strukturně složitě polymerní látky charakteru tříslovin (tabulka 1). Jednotlivé sloučeniny se často vyskytují jako konjugáty ve formě různých esterů nebo glykosidů. Z uvedených skupin (tabulka 1) jsou v potravinách nejhojněji zastoupeny fenolické kyseliny, flavonoidy a kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny) (Balasundram et al. 2006).

Základem radikály zhášecího působení polyfenolů je jejich schopnost poskytnout elektron nebo vodík radikálu, za současného vytvoření stabilnější, méně reaktivní radikálové struktury. Svým chelatačním působením mohou inaktivovat přechodné prvky, které tím ztrácí schopnost katalyzovat radikálové reakce. Dalším mechanismem působení je inhibice prooxidačních enzymů, jako jsou např. xanthinoxidasa nebo NOS (Kolečkář, Kubíková et al. 2008; Vaya a Aviram 2001).

Tabulka 1. Hlavní skupiny rostlinných polyfenolů

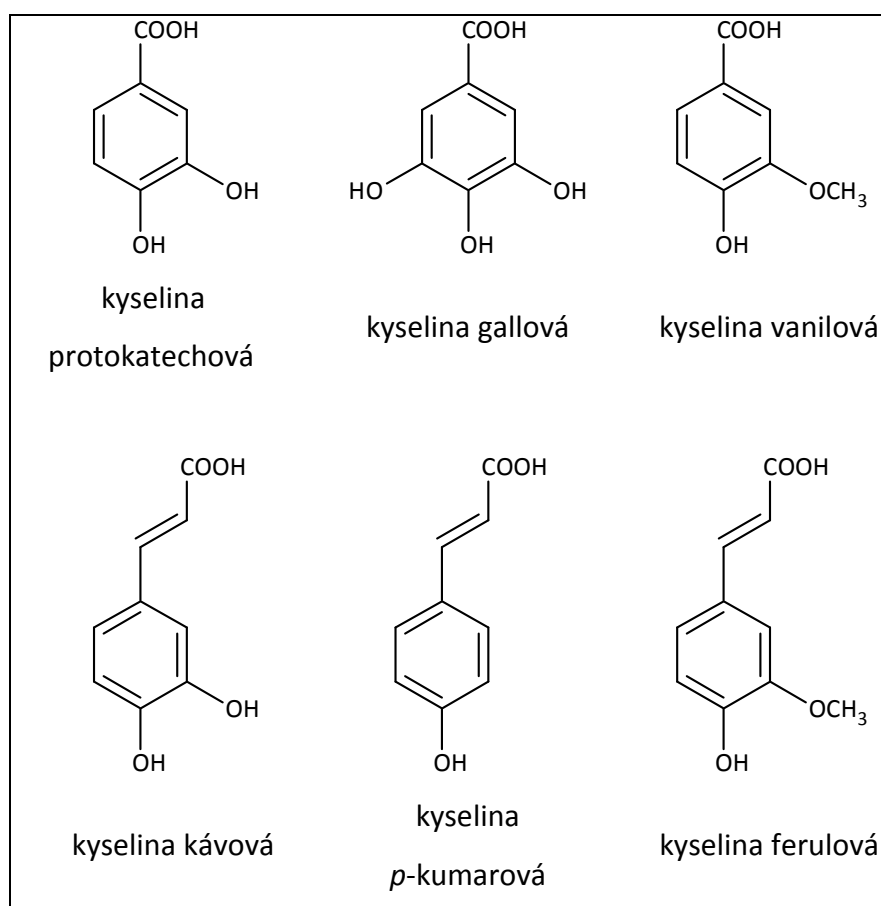
| Skupina | Struktura |
|---|-------------------|
| jednoduché fenoly, benzochinony | C_6 |
| hydroxybenzoové kyseliny | C_6-C_1 |
| acetofenony, fenylacetové kyseliny | C_6-C_2 |
| hydroxyskořicové kyseliny, fenylpropanoidy (kumariny) | C_6-C_3 |
| naftochinony | C_6-C_4 |
| xanthony | $C_6-C_1-C_6$ |
| stilbeny, anthrachinony | $C_6-C_2-C_6$ |
| flavonoidy, isoflavonoidy | $C_6-C_3-C_6$ |
| lignany, neolignany | $(C_6-C_3)_2$ |
| biflavonoidy | $(C_6-C_3-C_6)_2$ |
| ligniny | $(C_6-C_3)_n$ |
| kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny) | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |

Fenolické kyseliny

Mezi hydroxybenzoové kyseliny patří např. kyselina gallová, protokatechová nebo vanilová. K hydroxyskořicovým kyselinám se řadí např. kyselina kávová, ferulová nebo *p*-kumarová (obr. 4).

Antioxidační aktivita fenolických kyselin závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin. Monohydroxysubstituované fenolické kyseliny jsou velmi slabé antioxidanty. Sloučeniny s více hydroxyly mají vyšší antioxidační aktivitu (Balasundram et al. 2006).

Bylo zjištěno, že fenolické kyseliny zabraňují např. peroxidaci lipidů a proteinů, vykazují železo redukční a chelatační schopnosti, zabraňují oxidaci LDL, a zhasí ABTS⁺, DPPH nebo peroxidový radikál (Zhou et al. 2006).



Obr. 4. Fenolické kyseliny

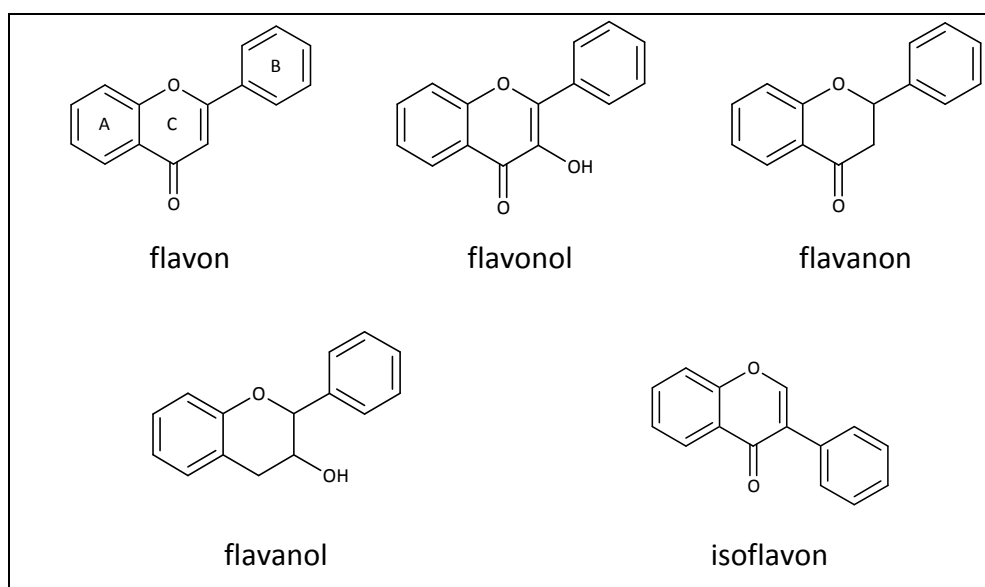
Flavonoidy

Podle struktury se flavonoidy dělí do několika skupin (např. flavony, isoflavony, flavonoly, flavanony, nebo flavan-3-oly (katechiny)) (obr. 5).

Obecně platí, že antioxidační aktivita flavonoidů roste s počtem hydroxylů na aromatických jádrech. Důležitá strukturní kritéria pro vysokou antioxidační účinnost jsou:

- 1) *ortho*- dihydroxy uspořádání na B- nebo A- kruhu,
- 2) hydroxyl nebo galloyl v poloze C-3 na C- kruhu v kombinaci s dvojnou vazbou mezi C-2 a C-3, a
- 3) dvojná vazba mezi C-2 a C-3 v konjugaci s oxoskupinou v poloze C-4 na C- kruhu (Soobrattee et al. 2005; Cai et al. 2006).

Flavonoidy jsou silné zhášeče DPPH, hydroxylového, superoxidového a peroxylového radikálu, vykazují redukční a chelatační schopnosti, inhibují lipidovou peroxidaci nebo snižují aktivitu LOX (Cook a Samman 1996; Firuzi et al. 2005).

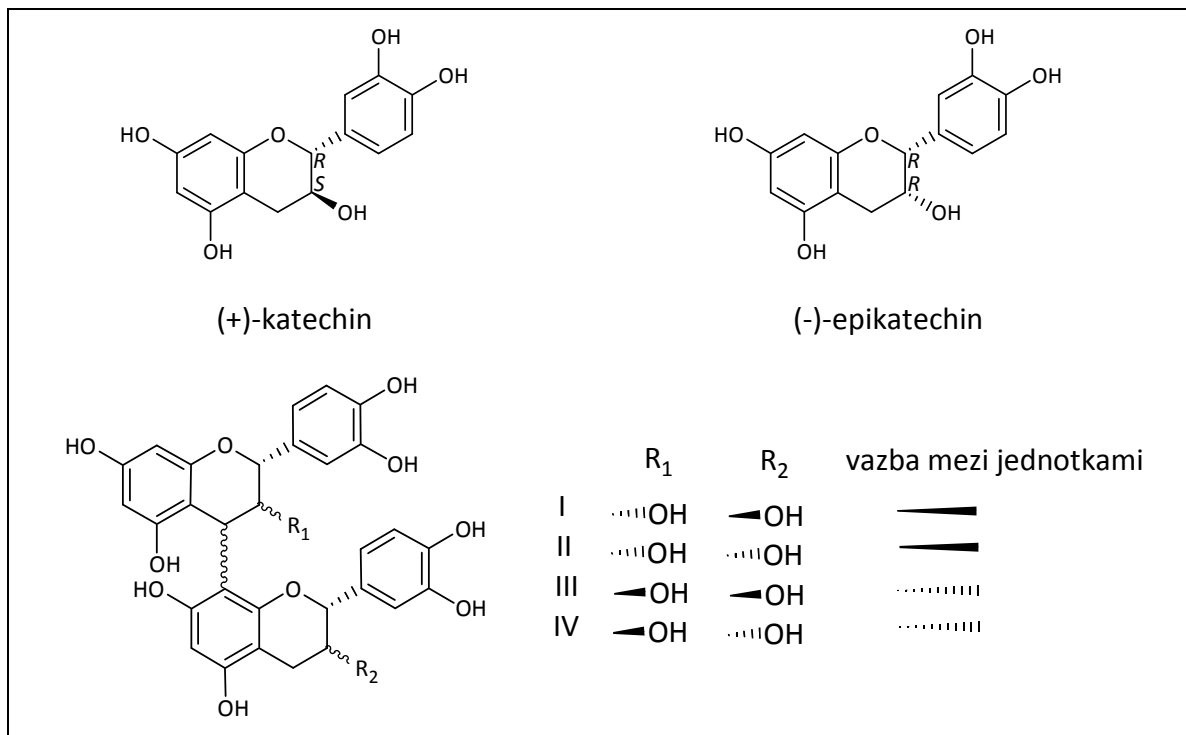


Obr. 5. Příklad flavonoidních struktur

Kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny)

Kondenzované třísloviny jsou oligomerní nebo polymerní sloučeniny vycházející z flavan-3-olů (katechinů). Základní strukturní jednotkou kondenzovaných tříslovin jsou deriváty flavan-3-olu (+)-katechin a (-)-epikatechin (obr. 6). U kondenzovaných tříslovin existuje velká strukturní rozmanitost, která je způsobena různým počtem a polohou hydroxylů, stereochemií na chirálních centrech, nebo typem a polohou

mezimolekulových vazeb. Proanthocyanidiny jsou členěny do několika skupin, z nichž nejpočetnější jsou procyanidiny skupiny B (k méně známým proanthocyanidinům se řadí např. prodelfinidiny nebo propelargonidiny (Kolečkář, Kubíková et al. 2008).



Obr. 6. Základní strukturní jednotky kondenzovaných tříslovin: (+)-katechin a (-)-epikatechin a procyanidiny skupiny B: (I) procyanidin B-1 (epikatechin-(4β→8)-katechin); (II) procyanidin B-2 (epikatechin-(4β→8)-epikatechin); (III) procyanidin B-3 (katechin-(4α→8)-katechin); (IV) procyanidin B-4 (katechin-(4α→8)-epikatechin)

Pro proanthocyanidiny platí, že antioxidační aktivita roste s počtem hydroxylů, zvláště jsou-li v *ortho*-uspořádání, a s navázáním kyseliny gallové. Dále je ovlivněna také velikostí molekuly, když roste od monomerů k trimerům, pak ale opět klesá (Cai et al. 2006).

Proanthocyanidiny eliminují např. NO, DPPH, ABTS⁺, superoxidový, hydroxylový nebo peroxylový radikál, chelatují kovy a inhibují prooxidační enzymy jako jsou NOS nebo LOX (Cos et al. 2003).

Oxidační stres u diabetu a aterosklerózy

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je v současnosti jedním z nejvýznamějších faktorů, který výrazně přispívá k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění v západní populaci. Oxidační stres se podílí na rozvoji metabolických poruch provázejících diabetes mellitus, které přispívají k rozvoji aterosklerózy, a přispívá také k rozvoji inzulinové rezistence (Wolff et al. 1991). V krvi diabetických pacientů byla zjištěna vyšší hladina ROS a lipoperoxidů (Giugliano et al. 1996). Zdrojem volných radikálů mohou být COX, 15-LOX nebo NOS, která při nedostatku substrátu, nebo kofaktorů pro vznik NO, vytváří ROS. Dalším významným zdrojem ROS při diabetes mellitus a inzulinové rezistenci může být zvýšená aktivita PKC indukovaná neesterifikovanými mastnými kyselinami nebo hyperglykemií. Stimulace PKC vede ke zvýšené aktivitě NADPH oxidasy, která je považována za hlavní zdroj volných radikálů. Výrazný podíl na zvýšení oxidačního stresu může mít také hyperglykemie spojená s oxidací glukosy (Baynes et al. 1999; Tomkin 2001). AGE, které v průběhu patofyziologie diabetu vznikají, mají významný dopad na rozvoj kardiovaskulárních komplikací diabetu. Po vazbě AGE na receptory na makrofágu, nebo na endotelových buňkách v cévách dochází k uvolnění cytokinů: IL-1, IL-6, IL-18 a TNF- α , které mohou působit na trombocyty a negativně ovlivnit fibrinolytický systém. V buňkách endotelu mohou cytokiny indukovat syntézu E selektinu a adhezních molekul pro leukocyty a významně tak ovlivňovat interakci arteriální stěny s cirkulujícími elementy. Hyperglykemie tak podpoří adhezi leukocytů k endotelu zvýšením exprese VCAM-1 a dalších adhezních molekul na povrchu buněk a aktivuje vaskulární hladkou svalovinu. Důsledkem je zvýšení tonu stěn artérií, větší proliferace buněk hladké svaloviny a ztluštění intimy už v časně fázi aterogeneze. AGE mají také schopnost indukovat tvorbu specifického receptoru (RAGE), který vyvolá aktivaci NF- κ B a intracelulární oxidační stres (Masopust et al. 2005; Esposito et al. 2002).

K rozvoji komplikací v poškozeném oběhovém systému v důsledku diabetes mellitus může přispívat i zvýšená lipoperoxidace v důsledku vyšší citlivosti malých částic LDL k oxidativním změnám. Vyšší plazmatické koncentrace lipoperoxidačních produktů byly pozorovány při zhoršené glukosové toleranci, u diabetiků 2. typu a experimentálních modelů inzulinové rezistence. Provedené studie prokázaly, že oxidační stres může přispívat k rozvoji inzulinové rezistence (Ceriello et al. 1998;

Paolisso et al. 1994).

Ateroskleróza

K velmi závažným postižením kardiovaskulárního systému se řadí ateroskleróza. Toto systémové onemocnění je z klinického hlediska důležité zejména u srdečních věnčitých tepen, extrakraniálních mozkových tepen, ale také např. v ledvinách. Na patogenezi se podílí řada procesů zahrnujících rozvoj chronického zánětu stěny artérií, jako odpověď na poškozování stěny cévy v nejvíce namáhaných místech. To způsobuje nejdříve dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokininů, adhezních molekul a růstových faktorů. Aktivované endotelové buňky přitahují do místa léze monocyty/makrofágy a T-lymfocyty z krevní cirkulace a buňky hladké svaloviny ze stěny cév. Subendotelový prostor se postupně zvětšuje. Současné zvýšení permeability endotelové výstelky umožňuje pronikání lipoproteinových částic do tohoto prostoru, dochází v nich k lipoperoxidaci působením ROS a RNS, a uvolněný cholesterol je pohlcován makrofágy za vzniku pěnových buněk. Stěna cévy se v místě poškození zesiluje a dostává prokoagulační vlastnosti. Celý proces směřuje k tvorbě ateromu (Masopust et al. 2005).

Endotel je dynamický endokrinní systém, který reguluje vaskulární tonus, lokální homeostázu, zánětlivé a proliferační procesy. Uvolňuje rovněž NO, který ovlivňuje vazodilataci, inhibuje trombocytární agregaci a tvorbu trombů, expresi adhezních molekul a oxidační stres. Rizikové faktory aterosklerózy, jako jsou diabetes mellitus, hypercholesterolemie, hypertenze, nebo kouření cigaret poškozují endotelovou funkci (Egashira 2002).

Na vývoji ateromu se podstatným způsobem podílejí trombocyty, které se významně uplatňují v hemokoagulaci. Hlavním regulátorem jejich tvorby a konečné diferenciaci je trombopoetin. Megakaryopoeza potřebuje pro optimální proliferaci ještě přítomnost IL-3 a faktoru kmenových buněk, na další normální vývoj působí také IL-6 a IL-11 (Trojan et al. 1994).

Oxidační stres se na agregaci trombocytů významně podílí. Působením ROS a RNS dochází ke strukturálním změnám na trombocytární membráně, zejména k ovlivnění struktur s obsahem mastných kyselin. Bylo prokázáno, že aplikace α -tokoferolu výrazně snížila lipidovou peroxidaci, tlumila agregaci a inhibovala adhezi trombocytů

na tkáňové struktury, navozovala protizánětlivý účinek monocytů a zlepšila funkce endotelu (Hartus et al. 2002).

Trombocytární agregace a její ovlivnění

Hemostáza

Krevní destičky jsou významnými faktory procesu vedoucího k zástavě krvácení. Tento proces se skládá z vazokonstrikce, nahromadění destiček v místě poranění a vytvoření hemostatické zátky, srážení krve (vzájemná reakce plazmatických faktorů, končí vytvořením fibrinu a definitivního trombu) a zahojení poranění (odstranění trombu fibrinolýzou, zahojení za pomoci fibroblastů a hladkých svalových buněk).

V místě poškození začne probíhat vazokonstrikce, která je reakcí na poranění. Dochází k uvolňování TXA_2 (navození vazokonstrikce a tvorba aktivovaných destiček). Největší vazokonstrikce nastává ale vlivem myogenní reakce cév na poranění (Martínková et al. 1986).

Dochází k adhezi destiček, změně jejich tvaru, agregaci a sekreci obsahu granul. Adheze je zprostředkována COL (stimuluje trombocyty) a vWF (váže se na receptory destiček). Vlivem adheze mění destičky tvar, do okolí jsou uvolňovány dlouhé a tenké výběžky – filopodie. Shlukování destiček se děje díky jejich aktivátoru TR, který vzniká v místě poranění cévy. Tohoto procesu se účastní řada dalších látek a dochází k agregaci. Mediátorem procesu srážení je fibrinogen, který se váže na destičkové receptory (nutná přítomnost Ca^{2+} a Mg^{2+}). Z membrány destiček se uvolňuje také AA, které je metabolizována na endoperoxidy a TXA_2 . Dále dochází k ireverzibilní agregaci, která je spojena se secernací granul destiček a uvolněním ADP. Proces agregace je dále ovlivněn trombospondinem, vzrůstajícím množstvím TR, adrenalinem, vazopresinem a PAF, a je inhibován např. NO nebo PGI_2 (mají také vazodilatační efekt). Agregace trombocytů se děje pod vlivem zpětné vazby, která zahrnuje ADP, serotonin a další mediátory uvolňované z destiček i endotelu (Trojan et al. 1994).

Hemokoagulace je komplexní děj, který probíhá za účasti proteinů, fosfolipidů a iontů. Dochází k přeměně krve na nerozpustný gel. V celé kaskádě navzájem se navazujících dějů dochází k zesilovacímu účinku, kdy aktivace nanogramů enzymů na počátku vyústí v přeměnu miligramů fibrinogenu na fibrin (pro všechny reakce je nutná přítomnost Ca^{2+}). Koagulační děje můžeme rozdělit na systém vnitřní (všechny

faktory jsou obsaženy v plazmě) a zevní (začíná uvolněním tkáňového tromboplastinu). Oba systémy spolu konvergují při tvorbě faktoru Xa. Další sled dějů, vedoucí k vzniku fibrinu, lze označit za společný. Celý proces srážení krve lze rozdělit do třech základních fází: vznik protrombin konvertujícího enzymu, vznik TR a vlastní tvorba fibrinu (Trojan et al. 1994).

Fibrinová sraženina je po určitém čase odstraněna enzymatickým štěpením fibrinu plazminem. Tento fibrinolytický systém se skládá z neúčinného plazminogenu, účinného plazminu, a aktivátorů a inhibitorů plazminogenu (Trojan et al. 1994).

Antiagregační látky

Proces srážení krve je nežádoucím jevem u různých kardiovaskulárních poruch (např. nestabilní angina pectoris, profylaxe po infarktu myokardu, nebo profylaxe okluzí po chirurgickém bypassu). Z těchto důvodů jsou syntetické a přírodní látky ovlivňující destičkovou agregaci testovány z hlediska využití v prevenci a terapii kardiovaskulárních nemocí (Facino et al. 1990; Ling et al. 2007).

V současnosti je nejvíce používaným léčivem ASA, která ovlivňuje agregaci prostřednictvím TXA_2 (tvoří se zejména v destičkách), který agregaci zvyšuje a prostacyklinu (tvoří se zejména v endotelu), který ji snižuje. COX katalyzuje přeměnu AA na PGH_2 (prekursor prostaglandinů, tromboxanu a prostacyklinu). COX má dvě formy: konstituční COX-1 a indukovanou COX-2. ASA inhibuje ireversibilně COX jak v trombocytech, tak destičkách. Protože se COX v endotelu syntetizuje rychle, schopnost tvorby prostacyklinu je porušena jen přechodně. Trombocyty jsou ale v důsledku nulové *de novo* syntézy enzymu postiženy do konce své životnosti. ASA bývá dávkována tak, aby byla umožněna regenerace syntézy prostacyklinu. Současná inhibice tvorby PGE_2 je nežádoucím efektem, protože se odstraňuje příznivý vliv na ochranu žaludeční sliznice. Tento problém byl snížen u selektivních inhibitorů COX-2 (oxikamy, koxiby). Z přírodních látek tak např. působí některé withanolidy. Aplikovány byly také tzv. duální inhibitory AA (likofenon), který inhibuje jak COX, tak 5-LOX (Masopust et al. 2005; Jayaprakasam a Nair 2003).

K dalším antiagregačním léčivům patří např. tiklopidin, klopidogrel, indobufen (reverzibilní blokáda COX), dipyridamol (inhibice enzymu fosfodiesterasy), sulfipyrazon (reverzibilní inhibice COX a inhibice adheze trombocytů na kolagen)

(Lüllman et al. 2002; Suchopár et al. 1997).

K přírodním látkám ovlivňujícím agregaci trombocytů patří některé kumariny (Hoult a Payá 1996), flavonoidy (Mojžíšová a Kuchta 2001), katechiny (Kang et al. 1999), kondenzované třísloviny (Kolečkář, Kubíková et al. 2008) nebo alkaloidy (Chia et al. 1999). Antiagregační aktivita polyfenolů je pravděpodobně zprostředkována současným ovlivněním několika různých biochemických procesů. Jedná se např. o antagonistické působení na receptor pro PAF, kolagenový receptor, tromboxanový receptor, agonistické působení na receptor pro ADP, inhibici tvorby tromboxanu, zvýšení produkce cyklických nukleotidů nebo schopnost aktivovat PKC (Cook a Samman 1996; Teng a Ko 1998). Antioxidační aktivita polyfenolů přispívá k jejich antiagregačním efektům. Polyfenolické látky se mohou vázat na membránu trombocytů a působit tam proti volným radikálům, které podporují agregaci. Flavonoidy také obnovují biosyntézu endoteliálních prostacyklinů, která je potlačena volnými radikály (Cook a Samman 1996).

Měření antioxidační aktivity přírodních látek

Při měření antioxidační aktivity přírodních látek se využívá celá řada metod. Existují různé metody pro různé typy vzorků a testovaných látek. Metody se liší také typem použitého radikálu (využívají syntetické radikály nebo radikály tělu vlastní). Existují jednoduché *in vitro* metody, metody využívající složitějších tkáňových systémů, nebo je antioxidační aktivita hodnocena na zvířatech nebo lidech. Antioxidační metody se liší také např. způsobem instrumentace (různé způsoby detekce, využití HPLC atd.)

Podle cíle hodnocení mohou být metody stanovení antioxidační aktivity rozděleny do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály a na metody hodnotící redoxní účinnost antioxidantů.

K základním metodám hodnotícím schopnost eliminovat volné radikály se řadí metoda využívající $ABTS^{•+}$, jehož úbytek se sleduje spektrofotometricky. Označuje se také jako metoda TEAC z důvodu srovnání výsledné antiradikálové aktivity vzorku s aktivitou syntetického antioxidantu troloxu. V reakční směsi se $ABTS^{•+}$ generuje oxidací ABTS, např. pomocí systému $ABTS/H_2O_2$ /peroxidasa nebo $ABTS$ /methmyoglobin/ H_2O_2 . $ABTS^{•+}$ se může generovat během vlastního měření, nebo již může být v reakční směsi přítomen. Metoda je použitelná jak v hydrofilním tak

lipofilním prostředí (Re et al. 1999; Rice-Evans et al. 1995).

U DPPH metody reaguje vzorek s DPPH radikálem za vzniku DPPH-H. Reakce je sledována spektrofotometricky. Metoda je používána v různých modifikacích, např. v kombinaci s HPLC, SIA, TLC nebo ESR (Bondet et al. 1997; Espin et al. 2000; Kolečkář et al. 2007; Nanjo et al. 1996; Polášek et al. 2004).

Metoda ORAC hodnotí schopnost látky zpomalit, nebo zastavit produkci generovaných kyslíkových radikálů. Detekce je založena na sledování úbytku β -fukoerythrinu nebo fluoresceinu po kontaktu s radikály. Generovány mohou být jak hydroxylové tak peroxylové radikály (Cao et al. 1997). Jiné metody hodnotící eliminaci hydroxylového radikálu využívají při jeho generování např. Fentonovu reakci nebo UV fotolýzu H_2O_2 . Detekce je prováděna na základě reakce radikálu např. s kyselinou salicylovou nebo deoxyribosou. Poté jsou stanoveny reakční produkty hydroxylované kyseliny salicylové, nebo látky vzniklé reakcí degradačních produktů deoxyribosy s thiobarbiturovou kyselinou (Paulová et al. 2004).

Při hodnocení eliminace superoxidového radikálu se radikál generuje neenzymaticky reakcí 5-methylfenaziniummethylsulfátu s NADH nebo systémem xanthin/xanthinoxidasa. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky. Známy jsou i další způsoby detekce, např. ESR metoda, nebo kombinace HPLC a chemiluminiscence (Paulová et al. 2004).

Řada metod je zaměřena na hodnocení peroxidace lipidů. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat iniciační kyslíkové radikály, sekundárně vzniklé radikálové meziprodukty (peroxyly, alkoxyly), nebo mohou působit také jako látky chelatuující přechodné kovy. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů, od méně složitých, 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 (Paulová et al. 2004).

Metoda FRAP hodnotí redoxní účinek antioxidantů. Je založena na redukcí komplexu Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) antioxidanty ve vzorku. Nárůst absorbance se sleduje spektrofotometricky (Firuzi et al. 2005).

Cyklická voltametrie hodnotí schopnost látek odštěpovat elektrony. Na elektrodu

se vkládá napěťový impuls a sledují se proudové odezvy v roztoku studované látky (Firuzi et al. 2005).

3. CÍL PRÁCE

- shromáždění (sběr, nákup) vzorků různých morfologických částí rostlin z čeledí Asteroideae a Cichorioideae; potvrzení identity vzorků získaných sběrem doc. RNDr. L. Opletalem, CSc.; příprava sumárních lyofylovaných extraktů podle standardizovaného postupu,
- provedení antioxidačního screeningu sumárních extraktů pomocí nově vyvinuté metody využívající vychytávání DPPH radikálu a SIA metody,
- vyhodnocení výsledků antioxidačního screeningu a výběr taxonu pro izolaci antioxidačně účinných sekundárních metabolitů,
- zajištění dostatečného množství rostlinného materiálu vybraného taxonu; provedení fytochemické studie s cílem získat nejvíce antioxidačně účinné látky a identifikovat je,
- stanovení antioxidační aktivity izolovaných látek pomocí DPPH-SIA metody a FRAP testu,
- vyhodnocení antiagregační aktivity izolovaných látek za použití agonistů agregace,
- stanovení obsahu izolovaných látek v rostlině.

4. MATERIÁL A METODY

Chemikálie

acetonitril gradient grade LiChrosolv

agregační agonisté (AA, ADP, COL) (Sigma-Aldrich)

amoniak 25% č.

2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Tris) p. a.

citran sodný 3,6%

dimethylsulfoxid bezvodý p. a.

ethanol 95% č.

ethyl-acetát p. a.

ethyl-formiát p. a.

ethylmethylketon p. a.

1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl radikál (95%) (DPPH) (Sigma-Aldrich)

β -glukosidasa (Sigma-Aldrich)

hydroxid sodný p. a.

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (trolox) (Sigma-Aldrich)

chlorid železitý hexahydrát p. a.

chloroform p. a.

L-askorbová kyselina ČL 2006

kyselina acetylsalicylová ČsL 3

kyselina chlorovodíková 36% p. a.

kyselina mravenčí 85% p. a.

kyselina octová p. a.

kyselina sírová 96% p. a.

methanol p. a.

octan sodný č.

kvercetin (Sigma-Aldrich)

síran železnatý heptahydrát p. a.

toluen p. a.

tri(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma-Aldrich)

vanilin č.

voda superčistá (získaná reverzní osmózou)

xylosa č.

sušidlo: silikagel perly (Sigma-Aldrich)

Příprava sloupce polyamidu

Polyamid (Nylon N6) byl převrstven koncentrovanou kyselinou octovou, povařen a ponechán vychladnout. K suspenzi vyloučeného práškového polyamidu byla přidána voda, polyamid byl odsát a znovu promyt vodou. K vodné suspenzi umístěné do široké chromatografické kolony byl přidáván 1% amoniak. Po důkladném promytí byla kolona promyta vodou a 50% methanolem. Suspenze byla po 3 hodinách stání zfiltrována a ponechána v zapnuté digestoři. Ještě vlhký polyamid byl stěrkou protlačen přes síto (0,63 mm). Po vysušení byl polyamid přesítován na velikost 0,1 – 0,2 mm, promyt vodou (70 – 80 °C) a dekantován. Po třetím promytí a dekantaci se polyamid převrstvil ethanolem (95%) a nechal stát po dobu 1 dne. Poté byl znovu odsát a vysušen stáním v zapnuté digestoři po dobu 3 dnů.

Chromatografická kolona byla utěsněna gázou v dolní části a naplněna suspenzí polyamidu v destilované vodě. Na povrch adsorbentu byl nalit vzorek rozpuštěný v destilované vodě.

Příprava sloupce silikagelu

Obchodní preparát silikagelu byl přesítován na frakci 0,1 – 0,2 mm, přečištěn chloroformem, methanolem a vysušen. Dále byl aktivován v sušárně při 160 °C po dobu 4 hodin. Po vychladnutí byla k silikagelu přidána destilovaná voda (silikagel : voda 9 : 1) a směs byla míchána po dobu 1 hodiny.

Chromatografická kolona s vatovou přepážkou v dolní části byla naplněna suspenzí připraveného silikagelu v rozpouštědle. Na povrch adsorbentu byl nanesen roztěr silikagelu a vzorku (poměr 2 : 1). Roztěr byl připraven rozpuštěním vzorku v ethylacetátu, přidáním silikagelu (silikagel : vzorek 2 : 1), promísením a odpařením ethylacetátu na vodní lázni. Roztěr byl vysušen ve vakuovém exsikátoru (24 hod).

Tenkvrstvá chromatografie

Tenkvrstvá chromatografie byla prováděna na deskách Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck AG, Darmstadt, Německo). Komory N byly syceny mobilní fází minimálně půl hodiny

před vložením chromatogramu, který byl nejprve promyt mobilní fází, odvětrán a poté připraven k nanášení vzorku.

Odpařování frakcí

Frakce a extrakty získané během izolace byly odpařovány na vakuové odparce (50 °C, 1,33 kPa) za použití difuzní membránové vývěvy Vacuubrand MZ 2C.

Sušení extraktů a izolovaných látek

Vysušování rostlinných extraktů a izolovaných látek bylo prováděno v exsikátoru, za vyloučení světla, při normální teplotě a tlaku 0,66 kPa pomocí silikagelu po dobu 12 hodin. Před použitím byl silikagel vysušen v sušárně při 160 °C po dobu 3 hodin.

Měření teploty tání

Teplota tání izolovaných látek byla měřena na bodotávku Boetius. Látky byly nejprve vysušeny ve vakuovém exsikátoru po dobu 24 hodin.

UV spektrofotometrie

Izolované látky byly rozpuštěny v ethanolu nebo methanolu a následná analýza byla provedena na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Praha, Česká Republika).

NMR analýza

Izolované látky byly rozpuštěny v DMSO. NMR analýza byla provedena na Katedře anorganické a organické chemie (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové) na přístroji VARIAN Mercury – Vx BB 300 spektrometr (Varian, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, USA): ¹H-NMR 300 MHz a ¹³C-NMR 75.46 MHz.

MS analýza

Hmotnostní spektrometrická analýza izolovaných látek byla provedena na Ústavu technologie potravin (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně) na přístroji HP 1100 LC system (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) vybaveným quadrupólovým detektorem a kolonou Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm, Zorbax, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany). ESI-MS spektra byla hodnocena v pozitivním modu. Látky byly rozpuštěny v methanolu. Pro analýzu byla využita metoda popsaná

ve studii Klejduse et al. (2001).

Příprava rostlinných extraktů

Vzorky rostlin (tab. 2) byly sbírány na různých místech České Republiky během roku 2001 a 2002. Rostlinný materiál (přibližně 5 g) byl sušen při pokojové teplotě, rozdrobněn na kousky velikosti 5 mm a rozemlet v elektrickém mlýnku po dobu 15 sekund na směs o velikosti částic přibližně 0,1 mm.

5 g rozdrobněné drogy bylo extrahováno 75 ml ethanolu (70%, w/w) v ultrazvukové lázni Sonorex Super 10P (Bandelin) při stupni 10 po dobu 30 min za laboratorní teploty. Extrakt byl poté zfiltrován a rostlinný materiál znovu promyt 3 × 10 ml ethanolu (70%, w/w). Filtráty byly spojeny, částečně odpařeny (50 °C), ochlazeny a přefiltrovány přes malý sloupec čištěné křemeliny (Hyflo Super Cel) v Pasteurově pipetě. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce (50 °C) do sirupové konzistence, zamrazen v tenké vrstvě na stěně lyofilizační nádoby pomocí kapalného dusíku a umístěn do lyofilizačního zařízení po dobu 3 hod. Lyofilizace byla provedena na přístroji Freezone 1 (Biotech, Praha), při -50 °C a tlaku 10^{-2} torr. Dosušení lyofilizovaných extraktů bylo provedeno v exsikátoru. Vysušený extrakt byl převeden do 10 ml lahvíček, převrstven argonem a hermeticky uzavřen. Lahvičky byly skladovány v mrazicím zařízení při teplotě -23 až -27 °C až do začátku antioxidačního měření.

Detekční činidla pro TLC

vanilin-kyselina sírová

DPPH-SIA test

Metoda je založena na reakci DPPH[•] s antioxidantem. Dochází ke zhášení DPPH[•] projevující se snížením intenzity fialového zbarvení DPPH roztoku a poklesem jeho absorbance, měřené při $\lambda = 525$ nm. Pokles absorbance je úměrný koncentraci antioxidantu ve vzorku (Bondet et al. 1997).

Pro účely antioxidačního screeningu rostlinných extraktů i čistých látek byla klasická DPPH metoda automatizována pomocí programovatelného SIA systému (Polášek et al. 2004; Řeháková et al. 2008). Schéma SIA systému je zobrazeno na obr. 7. Analytický systém byl tvořen přístrojem FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) vybaveným 2,5 ml pístovým čerpadlem, šesticestným prepínacím ventilem, USB2000-

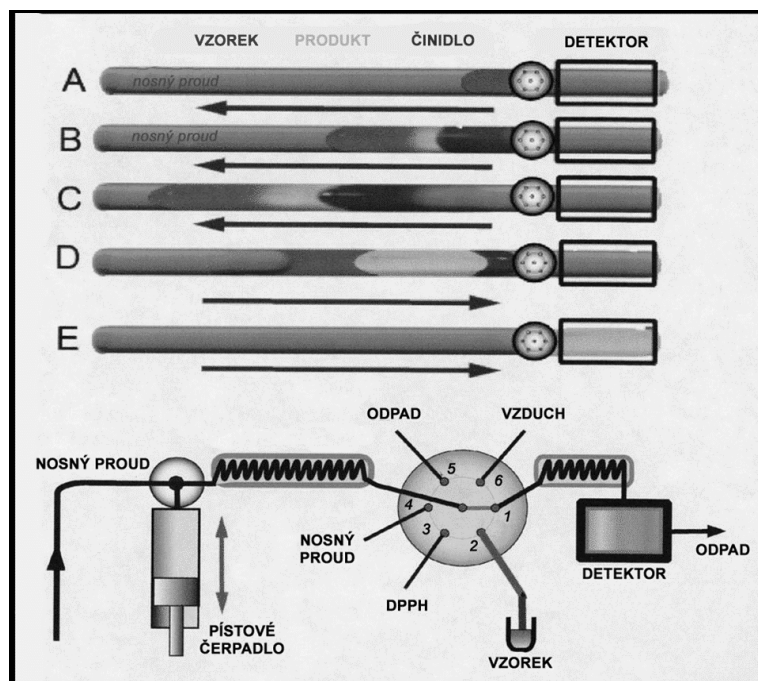
UV/VIS spektrofotometrem s LS-1 světelným zdrojem (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtokovou celou. Objem mísící cívky byl 0,6 ml, průměr 0,72 mm (Watrex, Praha, Česká Republika).

Základní roztoky lyofilizovaných rostlinných extraktů čeledí Asteroideae a Cichorioideae a extraktů získaných z *Leuzea carthamoides* v průběhu fytochemické studie byly připraveny rozpuštěním přibližně 1 mg vzorku v ethanolu (50%, v/v) tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg sušiny.ml⁻¹. Rozpouštění proběhlo v ultrazvukové lázni při stupni 10 po dobu 10 min za laboratorní teploty. Základní roztoky určené pro screening 87 rostlinných vzorků byly dále zředěny ethanolom (50%, v/v) na koncentrace 0,5 mg.ml⁻¹, 0,25 mg.ml⁻¹, 0,1 mg.ml⁻¹ a 0,05 mg.ml⁻¹. Vzorky extraktů získaných během izolační studie z *L. carthamoides* byly naředěny navíc na koncentrace 0,025 mg.ml⁻¹, 0,01 mg.ml⁻¹ a 0,005 mg.ml⁻¹. Roztoky izolovaných látek byly připraveny obdobným způsobem na koncentrace 10 μM, 50 μM, 100 μM, 250 μM, 500 μM a 750 μM. Jako nosný proud byl použit ethanol (50%, v/v). Roztok DPPH byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 100 ml ethanolu (50%, v/v). Pro každou koncentraci vzorku bylo provedeno trojí měření.

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

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

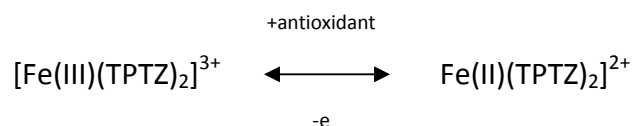
kde A₀ je absorbance samotného DPPH roztoku bez vzorku a A_x je absorbance DPPH roztoku po přidání a promíchání se vzorkem. U každého vzorku byla změřena a vypočtena hodnota Q pro danou koncentraci. Výsledná hodnota Q pro danou koncentraci byla vypočtena jako průměr ze tří provedených měření. V programu GraphPad Prism (Version 3.02 for Windows) byla sestrojena křivka závislosti Q na koncentraci vzorku (GraphPad Software, San Diego, USA). Z této křivky byl vypočten parametr EC₅₀ (koncentrace odpovídající 50 % aktivity Q). U izolovaných látek jsou hodnoty EC₅₀ uvedeny se směrodatnou odchylkou, odvozenou ze tří antioxidačních analýz každé látky.



Obr. 7. Schéma SIA systému

FRAP test

FRAP test je spektrofotometrická metoda založena na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Železnaté ionty tvoří s TPTZ modře zbarvený komplex, který je spektrofotometricky detekován při $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Firuzi et al. 2005).



Spektrofotometrické měření bylo provedeno na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami Brand 400 μl (Fisher Scientific, Pardubice) přístrojem Anthos 2010 (Eugendorf, Rakousko).

Pro přípravu FRAP roztoku bylo použito 10 ml acetátového pufru (300 mM, pH 3,6), 1 ml roztoku hexahydrátu chloridu železitého (20 mM) rozpuštěného ve vodě a 1 ml TPTZ (10 mM) rozpuštěného v roztoku chlorovodíku (40 mM). Na mikrotitrační destičky bylo čtyřnásobně napipetováno 25 μl roztoku testované látky (heptahydrátu síranu železnatého) v methanolu, nebo acetátový pufr v koncentračním rozmezí 10 – 200 μM . Do třech jamek byl přidán FRAP roztok (175 μl) zahřátý na teplotu 37 $^{\circ}\text{C}$ a do čtvrté jamky se přidal acetátový pufr. Do dalších tří jamek bylo napipetováno 25 μl

acetátového pufru s 175 µl FRAP roztoku. Absorbance byla monitorována v časových intervalech od 4 do 120 minut. Redukční schopnost testovaných látek v čase t byla uvedena jako FRAP hodnota $_t$ vypočtená podle vzorce (Firuzi et al. 2005):

$$\text{FRAP hodnota}_t(\text{M}) = \left(\frac{a_t \text{ test. látka}}{a_t \text{ Fe}^{2+}} \right) \times 10^{-5}$$

kde $a_t \text{ test. látka}$ je změna absorbance vztažená k testovanému vzorku v čase t (4. nebo 60. minuta) o výsledné koncentraci 10 µl a $a_t \text{ Fe}^{2+}$ je změna absorbance vztažená k heptahydrátu síranu železnatého ve stejném čase a stejné koncentraci. Všechna měření byla třikrát opakována. Výpočty byly provedeny v programu SigmaPlot 2002 Verze 8.0 pro Windows (Systat Software Inc., San Jose, USA).

Antiagregační test

Měření antiagregační aktivity izolovaných látek bylo provedeno *in vitro* s lidskými trombocyty. Jako agonisté agregace byly použity AA, ADP a COL.

Krev pro analýzu pocházela od zdravých dobrovolníků, nekuřáků, kteří neužívali nejméně 10 dnů před odběrem žádné léky ovlivňující agregaci trombocytů. Ke krvi byla přidána antikoagulační přísada – 3,8% citran sodný. PRP byla získána jako supernatant odstředěním (10 min při 240 × g; centrifuga U-32R, Boeco, Hamburg, Germany) 20 ml odebrané krve. PPP byla připravena odstředěním (15 min při 600 × g) zbylého podílu. Počet trombocytů v PRP byl nastaven na $2,5 \times 10^8$ trombocytů.ml⁻¹ za použití PPP od stejného dárce. Pokud nebylo dosaženo požadovaného počtu trombocytů, bylo nutno použít krev jiného dárce. Absorbance PRP byla vzata jako 0% úroveň agregace, absorbance PPP jako úroveň 100%. Testovaný vzorek byl rozpuštěn v 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,4). Do 490 µl PRP přenesených do kyvety přístroje byl přidán po 3 minutách míchání vzorek (10 µl) nebo samotný pufr. Po 5 minutách byl do kyvety přidán jeden z agonistů agregace. Výsledná koncentrace agonistů v kyvetě byla pro AA 0,5 mM; ADP, 10 µM; COL, 2 µg.ml⁻¹ (Nieuwenhuis et al. 1987).

Proces agregace destiček byl sledován za použití agregometru značky Chrono-log 500-Ca (Chrono-Log Co., USA) připojeného k počítači (program Aggro/Link Software, verze 4.75, Chrono-Log Co.) v souladu s metodou popsanou Bornem (Born 1962).

Jednotlivá měření byla třikrát opakována. Velikost antiagregační aktivity

izolovaných látek byla popsána hodnotou EC_{50} (koncentrace vyvolávající 50% inhibici agregace), vypočtenou v programu GraphPad Prism (Version 3.02 for Windows).

Kvantitativní analýza izolovaných látek

Pro kvantitativní analýzu izolovaných látek byl použit HPLC systém složený z gradientové pumpy P200 (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA), dávkovacího ventilu 7125 – 10 μ l (Rheodyne, Cotati, USA), detektoru UV1000 (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA) a programu CSW Chromatography Station 1.5 DataApex, Praha, Czech republic). Jako chromatografická kolona byla použita – Nucleosil 100 – 5C18 AB, 125 \times 4 mm I.D. (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Mobilní fáze byla tvořena z 10 % acetonitrilu a 90 % acetátového pufru (pH 4,8). Použit byl izokratický průtok mobilní fáze – 1 ml.min⁻¹. Detekce byla provedena při vlnové délce λ = 260 nm. Měření bylo provedeno při pokojové teplotě (23°C).

Sumární extrakt pro HPLC analýzu byl připraven povařením 0,5 g rozemletých suchých listů *L. carthamoides* po dobu 30 minut ve 20 ml ethanolu (95%) pod zpětným chladičem. Extrakt byl přefiltrován a rostlinný materiál promyt 2 \times 3 ml ethanolu (95%) a znovu přefiltrován. Filtráty byly spojeny. Rostlinný materiál byl znovu povařen po dobu 30 minut a postup byl zopakován. Oba filtráty byly spojeny a odpařeny na vakuové odparce (60 °C). Extrakt byl rozpuštěn ve směsi acetonitril : voda (1 : 1, v/v) a centrifugován (10 000 rpm, 5 min). Supernatant byl oddělen, přefiltrován přes HPLC filtr (Target HPLC Syringe Filter, 0,45 μ m) a aplikován do HPLC systému. Tímto způsobem byly připraveny tři vzorky. Izolované látky byly rozpuštěny ve směsi acetonitril : voda (1 : 1, v/v) v koncentracích 240 μ g.ml⁻¹, 120 μ g.ml⁻¹ a 30 μ g.ml⁻¹ a aplikovány do HPLC systému. Všechna měření byla opakována třikrát. Výsledné hodnoty procentuálního zastoupení izolovaných látek byly vztaženy k sušině listů p. saflorové.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

Antioxidační analýza 87 extraktů

Výsledky screeningu (DPPH-SIA test) sumárních extraktů připravených z rostlin čeledí Cichorioideae a Asteroideae jsou uvedeny v tabulce 2. Rozmezí hodnot EC_{50} testovaných vzorků se pohybovalo od $0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$ (nejvíce aktivní extrakt připravený z listů *L. carthamoides*) do $0,542 \text{ mg.ml}^{-1}$ (nejméně aktivní extrakt připravený z květů *Centaurea cyanus*). Na základě těchto výsledků byly pro fytochemickou studii vybrány listy *L. carthamoides* (Kolečkář, Opletal et al. 2008).

Tabulka 2. Výsledky antioxidačního DPPH testu (EC_{50} ; mg.ml^{-1}) různých částí rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae

| Rostlina | EC_{50} (mg.ml^{-1}) |
|--|--------------------------------------|
| <i>Achillea collina</i> (kvetoucí nať) | 0,142 |
| <i>Achillea millefolium</i> (kvetoucí nať) | 0,095 |
| <i>Achillea millefolium</i> (květenství) | 0,173 |
| <i>Achillea nobilis</i> (kvetoucí nať) | 0,117 |
| <i>Achillea ptarmica</i> (kvetoucí nať) | 0,057 |
| <i>Achillea ptarmica</i> (květenství) | 0,073 |
| <i>Antennaria dioica</i> (kvetoucí nať) | 0,096 |
| <i>Arctium lappa</i> (květenství) | 0,245 |
| <i>Arctium lappa</i> (listy) | 0,221 |
| <i>Arctium tomentosum</i> (kvetoucí nať) | 0,216 |
| <i>Arnica montana</i> (kvetoucí nať) | 0,113 |
| <i>Artemisia absinthium</i> (nať bez květů) | 0,160 |
| <i>Artemisia dracunculus</i> (nať bez květů) | 0,088 |
| <i>Artemisia pontica</i> (nať bez květů) | 0,053 |
| <i>Artemisia vulgare</i> (kvetoucí nať) | 0,109 |
| <i>Bellis perennis</i> (květenství) | 0,257 |
| <i>Bidens tripartita</i> (kvetoucí nať) | 0,069 |
| <i>Calendula officinalis</i> (květenství) | 0,505 |
| <i>Calendula officinalis</i> (nať bez květů) | 0,412 |
| <i>Centaurea cyanus</i> (květenství) | 0,542 |

Tabulka 2, pokračování. Výsledky antioxidačního DPPH testu (EC_{50} ; $mg \cdot ml^{-1}$) různých částí rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae

| Rostlina | EC_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$) |
|--|-------------------------------------|
| <i>Centaurea jacea</i> (kvetoucí nať) | 0,144 |
| <i>Centaurea triumpheti</i> (kvetoucí nať) | 0,208 |
| <i>Chamaemelum nobile</i> (květenství) | 0,251 |
| <i>Chrysanthemum leucanthemum</i> (kvetoucí nať) | 0,060 |
| <i>Cichorium intybus</i> (květenství) | 0,211 |
| <i>Cirsium acaule</i> (listy) | 0,193 |
| <i>Cirsium arvense</i> (kvetoucí nať) | 0,174 |
| <i>Cirsium canum</i> (kvetoucí nať) | 0,308 |
| <i>Cirsium heterophyllum</i> (kvetoucí nať) | 0,137 |
| <i>Cirsium oleraceum</i> (květenství) | 0,168 |
| <i>Cirsium oleraceum</i> (listy) | 0,156 |
| <i>Cirsium vulgare</i> (kvetoucí nať) | 0,266 |
| <i>Cnicus benedictus</i> (kvetoucí nať) | 0,262 |
| <i>Cota tinctoria</i> (kvetoucí nať) | 0,049 |
| <i>Echinacea purpurea</i> (listy) | 0,061 |
| <i>Echinops sphaerocephalus</i> (kvetoucí nať) | 0,088 |
| <i>Erigeron canadensis</i> (kvetoucí nať) | 0,071 |
| <i>Erigeron strigosus</i> (květenství) | 0,199 |
| <i>Eryngium caeruleum</i> (kvetoucí nať) | 0,439 |
| <i>Eupatorium cannabinum</i> (kvetoucí nať) | 0,112 |
| <i>Galinsoga ciliata</i> (kvetoucí nať) | 0,246 |
| <i>Gnaphalium uliginosum</i> (kvetoucí nať) | 0,090 |
| <i>Helianthus annuus</i> (květenství) | 0,224 |
| <i>Helianthus annuus</i> (listy) | 0,117 |
| <i>Hieracium aurantiacum</i> (kvetoucí nať) | 0,174 |
| <i>Hieracium cespitosa</i> (kvetoucí nať) | 0,129 |
| <i>Hieracium laevigatum</i> (kvetoucí nať) | 0,233 |
| <i>Hieracium murorum</i> (kvetoucí nať) | 0,132 |

Tabulka 2, pokračování. Výsledky antioxidačního DPPH testu (EC_{50} ; $mg \cdot ml^{-1}$) různých částí rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae

| Rostlina | EC_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$) |
|--|-------------------------------------|
| <i>Inula helenium</i> (kvetoucí nať) | 0,087 |
| <i>Inula hirta</i> (kvetoucí nať) | 0,049 |
| <i>Inula oculus-christi</i> (kvetoucí nať) | 0,182 |
| <i>Inula racemosa</i> (listy) | 0,079 |
| <i>Inula salicifolia</i> (kvetoucí nať) | 0,048 |
| <i>Lactuca serricola</i> (kvetoucí nať) | 0,188 |
| <i>Leontodon lecipidus</i> (kvetoucí nať) | 0,201 |
| <i>Leuzea carthamoides</i> (listy) | 0,046 |
| <i>Matricaria discoidea</i> (kvetoucí nať) | 0,450 |
| <i>Matricaria discoidea</i> (květenství) | 0,174 |
| <i>Chamomilla recutita</i> (nať bez květů) | 0,384 |
| <i>Chamomilla recutita</i> (květenství) | 0,152 |
| <i>Petasites hybridus</i> (květenství) | 0,059 |
| <i>Petasites hybridus</i> (listy) | 0,050 |
| <i>Pilosella caespitosa</i> (kvetoucí nať) | 0,134 |
| <i>Pyretrum corymbosum</i> (kvetoucí nať) | 0,076 |
| <i>Scorzonera hispanica</i> (kvetoucí nať) | 0,268 |
| <i>Senecio fuchsii</i> (kvetoucí nať) | 0,121 |
| <i>Senecio jacobaea</i> (kvetoucí nať) | 0,183 |
| <i>Senecio jacobaea</i> (květenství) | 0,278 |
| <i>Senecio jacobaea</i> (nať bez květů) | 0,207 |
| <i>Senecio vulgaris</i> (kvetoucí nať) | 0,214 |
| <i>Silybum marianum</i> (listy) | 0,135 |
| <i>Solidago canadensis</i> (kvetoucí nať) | 0,096 |
| <i>Solidago canadensis</i> (květenství) | 0,084 |
| <i>Solidago canadensis</i> (nať bez květů) | 0,120 |
| <i>Solidago gigantea</i> (kvetoucí nať) | 0,079 |
| <i>Solidago gigantea</i> (květenství) | 0,061 |

Tabulka 2, pokračování. Výsledky antioxidačního DPPH testu (EC_{50} ; $mg \cdot ml^{-1}$) různých částí rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae

| Rostlina | EC_{50} ($mg \cdot ml^{-1}$) |
|---|-------------------------------------|
| <i>Solidago gigantea</i> (nať bez květů) | 0,142 |
| <i>Sonchus oleraceus</i> (kvetoucí nať) | 0,389 |
| <i>Tanacetum vulgare</i> (kvetoucí nať) | 0,098 |
| <i>Tanacetum vulgare</i> (květenství) | 0,251 |
| <i>Tanacetum vulgare</i> (listy) | 0,054 |
| <i>Taraxacum officinalis</i> (květenství) | 0,192 |
| <i>Taraxacum officinalis</i> (listy) | 0,065 |
| <i>Tripleurospermum maritimum</i> (nať bez květů) | 0,267 |
| <i>Tripleurospermum maritimum</i> (květenství) | 0,258 |
| <i>Tussilago farfara</i> (květenství) | 0,125 |
| <i>Tussilago farfara</i> (listy) | 0,059 |

Extrakce listů *L. carthamoides*

Suché rozdrobněné listy (10,5 kg, velikost do 5 mm) parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*) byly zakoupeny z rostlinné farmy (Radka Šimáková, Ohnišov, Česká Republika), umístěny do perkolátoru (objem 50 l) a zality ethanolem (95%). Po dvacetčtyřhodinovém stání v klidu byla droga perkolována tak, aby za 2,5 hod vyteklo 5 litrů extraktu. Ethanol byl současně doplňován do perkolátoru. Bylo získáno 105 l extraktu, který byl odpařen na vakuové odparce při teplotě 50 °C do objemu 4,5 litrů. K zelenému viskóznímu extraktu s velkým množstvím chlorofylu byla přidána horká destilovaná voda (4,5 l). Extrakt byl zahřán na teplotu 80 °C, promíchán, ponechán zchladnout na teplotu 50 °C a přefiltrován přes buničitou vatu tak, aby chlorofyl zůstal v nalévací nádobě. Chlorofyl byl přelit 1 litrem horké vody (80°C), promíchán a extrakt opět přefiltrován. Oba extrakty byly spojeny (tzv. primární extrakt; 9 litrů).



Obr. 8. Kvetoucí nať *L. carthamoides* (Willd.) DC.

Primární extrakt byl vytřepán šestkrát chloroformem (poměr vodná fáze : chloroform 4 : 1). Hmotnost odpařeného vodného extraktu byla 967 g, hmotnost chloroformového odparku byla 110 g. Asi 10 mg jmenovaných extraktů bylo vysušeno v exsikátoru, zváženo, naředěno na určené koncentrace a připraveno pro DPPH analýzu. Zjištěné hodnoty EC_{50} : primární extrakt $0,138 \text{ mg.ml}^{-1}$; chloroformový extrakt $0,908 \text{ mg.ml}^{-1}$; vodný extrakt $0,103 \text{ mg.ml}^{-1}$. Schéma základního postupu fytochemické studie a hodnoty antioxidačních aktivit jednotlivých extraktů zjištěné DPPH testem jsou uvedeny na obr. 9.

Vodný extrakt byl rozpuštěn ve vodě a nalit na sloupec polyamidu:

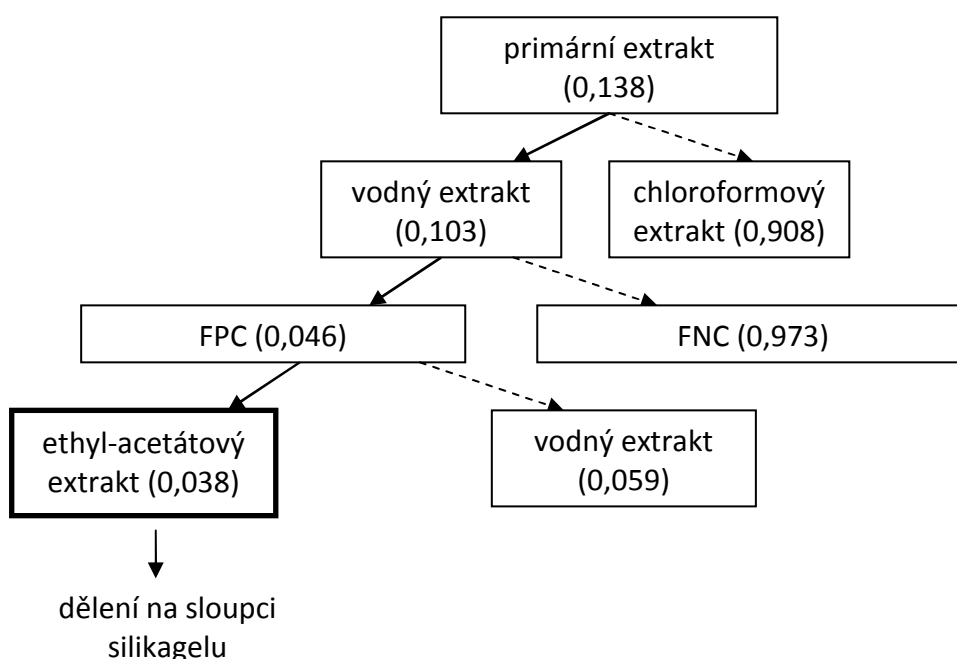
Vodný extrakt: 967 g, rozpuštěný v 6 570 ml vody

Adsorbent: polyamid 0,1 – 0,2 mm, 1 670 g, rozmíchaný v 4 860 ml vody

Dělicí lože: 15 × 31 cm

Dělicí kolona byla promyta 6 l vody. Žlutě zbarvený pás fenolických látek byl poté eluován 10 l ethanolu (95%). Vodná i ethanolová frakce byly jímány a odpařeny. Odpařená vodná frakce (NFC) vážila 631 g, odpařená ethanolová frakce (FPC) vážila 200 g. Po odebrání a vysušení vzorků (10 mg) obou frakcí byla stanovena antioxidační aktivita DPPH testem. Hodnoty EC_{50} : NFC $0,973 \text{ mg.ml}^{-1}$; FPC $0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$ (obr. 9).

FPC (200 g) byla rozpuštěna ve vodě (22 l) a vytřepána šestkrát ethyl-acetátem (vodná fáze : ethyl-acetát 4 : 1). Po odpaření a vysušení obou získaných extraktů bylo získáno 130 g vodného a 66 g ethyl-acetátového extraktu. Po provedení antioxidačního DPPH testu byly zjištěny hodnoty EC_{50} : vodný odparek $0,059 \text{ mg.ml}^{-1}$; ethyl-acetátový odparek $0,038 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 9. Schéma základního postupu fytochemické studie a hodnoty EC_{50} (mg.ml^{-1}) extraktů zjištěné DPPH testem

Antioxidační aktivita frakcí získaných sloupcovou kapalinovou chromatografií

Na sloupec adsorbentu byl nanesen roztěr vzniklý promícháním, odpařením a vysušením ethyl-acetátového odparku rozpuštěného v minimu ethyl-acetátu a adsorbentu.

Ethyl-acetátový odparek: 66 g

Adsorbent: silikagel Fluka 0,063 – 0,2 mm, 1926 g, + 10% vody

Dělicí lože: 6 × 130 cm
 Vrstva s extraktem: 6 × 15 cm
 Frakce: 250 ml
 Doba eluce frakce: 20 min
 Iniciační mobilní fáze: chloroform : ethanol 95 : 5
 Kontrolní TLC: z každé frakce byly přeneseny do mikrozkušavky asi 0,2 ml, které byly odpařeny proudem dusíku při 50 °C, rozpuštěny v kapce ethanolu a chloroformu a nanесeny na chromatografickou desku: Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 × 7,5 cm. Mobilní fáze: chloroform : ethanol 9 : 1 (spoj. frakce 1-8); chloroform : ethanol 8 : 2 (spoj. frakce 9-12). Detekce: UV při λ= 254 nm a λ= 366 nm; směs vanilin-kyselina sírová.

Tabulka 3. Sloupcová chromatografie

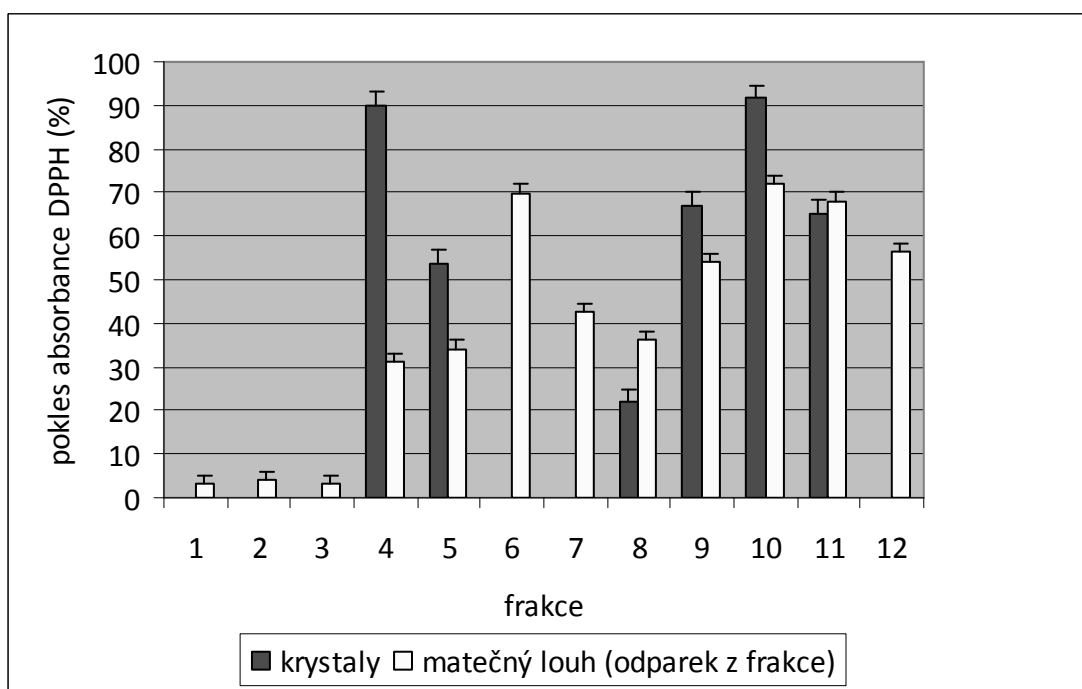
| Spojené frakce | Frakce | Složení eluční soustavy | Popis odpařené frakce |
|----------------|--------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 1 (1-7) | 1-7 | chloroform : ethanol 95 : 5 | světlý, olejovitý |
| 2 (8-11) | 8-11 | chloroform : ethanol 95 : 5 | sv. hnědý, olejovitý |
| 3 (12-31) | 12-14 | chloroform : ethanol 95 : 5 | tm. hnědý, olejovitý |
| | 15-18 | chloroform : ethanol 95 : 5 | |
| | 19-28 | chloroform : ethanol 92,5 : 7,5 | |
| | 29-31 | chloroform : ethanol 92,5 : 7,5 | |
| 4 (32-43) | 32-37 | chloroform : ethanol 92,5 : 7,5 | tm. hnědý, olejovitý, žluté krystaly |
| | 38-43 | chloroform : ethanol 90 : 10 | |
| 5 (44-51) | 44-51 | chloroform : ethanol 90 : 10 | růžový, narůžovělé krystaly |
| 6 (52-64) | 52-57 | chloroform : ethanol 90 : 10 | tm. hnědý, olejovitý |
| | 58-64 | chloroform : ethanol 90 : 10 | |
| 7 (65-78) | 65-78 | chloroform : ethanol 90 : 10 | tm. hnědý, olejovitý |
| 8 (79-98) | 79-88 | chloroform : ethanol 80 : 20 | hnědý, řídký, bílé krystaly |
| | 89-98 | chloroform : ethanol 80 : 20 | |

Tabulka 3, pokračování. Sloupcová chromatografie

| Spojené frakce | Frakce | Složení eluční soustavy | Popis odpařené frakce |
|----------------|---------|------------------------------|--------------------------------------|
| 9 (99-104) | 99-104 | chloroform : ethanol 70 : 30 | tm. hnědý, olejovitý, žluté krystaly |
| 10 (105-111) | 105-111 | chloroform : ethanol 70 : 30 | hnědý, řídký, žluté krystaly |
| 11 (112-139) | 112-118 | chloroform : ethanol 70 : 30 | sv. hnědý, řídký, bílé krystaly |
| | 119-125 | chloroform : ethanol 70 : 30 | |
| | 126-133 | chloroform : ethanol 60 : 40 | |
| | 134-139 | chloroform : ethanol 60 : 40 | |
| 12 (140-178) | 140-150 | chloroform : ethanol 50 : 50 | sv. hnědý, řídký |
| | 151-167 | chloroform : ethanol 50 : 50 | |
| | 168-178 | ethanol | |

Během provádění sloupcové kapalinové chromatografie byly získané frakce hodnoceny podle kontrolní TLC. Frakce se stejným kvalitativním složením byly spojeny dohromady a odpařeny do malého objemu tak, aby složky jednotlivých frakcí mohly krystalizovat. Bylo tak získáno 12 spojených frakcí, které byly pro optimální průběh krystalizace uskladněny na několik dnů do lednice. U frakce č. 4, 5, 8, 9, 10, 11 byly vzniklé krystaly odsány na fritě a opatrně promyty směsí chloroform – ethanol tak, aby nedošlo k jejich rozpuštění. Po krystalizaci byly spojené frakce odpařeny do sucha a vysušeny v exsikátoru. Získané krystaly byly také vysušeny v exsikátoru. Označení frakcí, složení eluční soustavy a popis frakcí je zobrazen v tabulce 3. Vysušené frakce a krystaly byly podrobeny DPPH testu. Pokles absorbance DPPH roztoku (%) u vzorků o koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹ je zobrazen na obr. 10.

Hmotnost vysušených frakcí, krystalů a hodnoty EC₅₀ jsou uvedeny v tabulce 4. Závěrečná TLC analýza frakcí byla provedena v této sestavě: pro spojené frakce 4-9 byla použita méně polární mobilní soustava: toluen : ethyl-formiát : kys. mravenčí (5 : 4 : 1). Pro frakce 10-12 byla zvolena polárnější mobilní fáze: ethyl-acetát : ethylmethylketon : kys. mravenčí : voda (5 : 3 : 1 : 1); chromatografické desky Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 × 10 cm. Detekce: UV při λ= 254 nm a λ= 366 nm; směs vanilin-kyselina sírová.



Obr. 10. Výsledky DPPH testu u frakcí získaných sloupcovou chromatografií při koncentraci $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$

Tabulka 4. Antioxidační analýza odpareků a krystalů ze sloupcové chromatografie

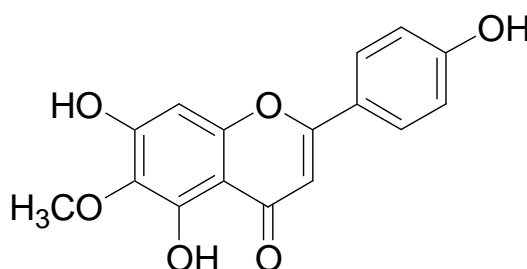
| Frakce | Fáze | Hmotnost (g) | EC ₅₀ (mg.ml ⁻¹) |
|--------------|----------|--------------|---|
| 1 (1-7) | ML | 0,010 | >1 |
| 2 (8-11) | ML | 0,033 | >1 |
| 3 (12-31) | ML | 0,212 | >1 |
| 4 (32-43) | krystaly | 0,360 | 0,025 |
| | ML | 0,631 | 0,190 |
| 5 (44-51) | krystaly | 0,287 | 0,073 |
| | ML | 0,925 | 0,160 |
| 6 (52-64) | ML | 1,370 | 0,041 |
| 7 (65-78) | ML | 2,248 | 0,225 |
| 8 (79-98) | krystaly | 0,356 | 0,924 |
| | ML | 0,451 | 0,263 |
| 9 (99-104) | krystaly | 0,203 | 0,057 |
| | ML | 1,002 | 0,087 |
| 10 (105-111) | krystaly | 0,327 | 0,021 |
| | ML | 6,375 | 0,038 |
| 11 (112-139) | krystaly | 2,437 | 0,029 |
| | ML | 7,376 | 0,044 |
| 12 (140-178) | ML | 3,661 | 0,063 |

Látka LC-1 (hispidulin) ze spojené frakce 4

Podle TLC analýzy (desky Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 × 12 cm; mobilní soustava – toluen : ethyl-formiát : kys. mravenčí (5 : 4 : 1)) bylo zjištěno, že krystaly ze spojené frakce 4 jsou směsí dvou látek s blízkým R_f. Rozdíl R_f obou látek byl 0,02.

Krystalová směs (360 mg) byla podrobena preparativní HPLC (Merck HPLC Preparative system: Knauer Preparative Pump K-1800, detektor DAF K-2700 (Knauer), Büchi Fraction Collector B-684, Termostat Knauer D-14163). Kolona: Purospher-Star RP18e, 250 × 10 mm, 5 μm (Merck, Praha, Česká Republika); detekce při vlnových délkách: λ = 365 a λ = 254 nm; průtok: 2,5 ml.min⁻¹; teplota: 23 °C; mobilní fáze: 80 % methanol/20 % voda; isokratický průtok.

Po provedení preparativní HPLC, odpaření rozpouštědla a vysušení bylo získáno 133 mg žluté práškovité látky označené jako LC-1: t. t. 289-292 °C; UV (EtOH) λ_{max} 275, 335; API-ES-MS: *m/z* 301 [M + H]⁺. Látka byla na základě NMR analýzy identifikována jako flavonoid hispidulin (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavon) (obr. 11). NMR spektrum látky se shodovalo s údaji z literatury (Nagao et al. 2002).



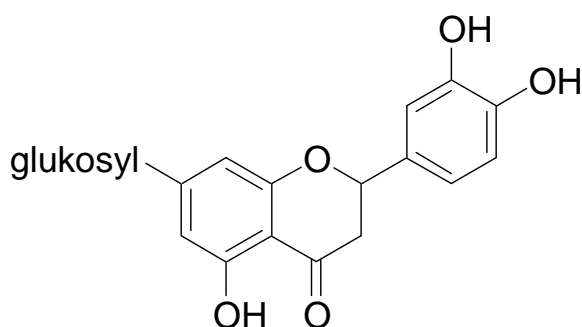
Obr. 11. Hispidulin

Druhá látka krystalové směsi se během provedení preparativní chromatografie a následného odpaření rozložila. Jednalo se pravděpodobně o flavonoidní látku, která zpolymerizovala a nebylo tak možné určit její strukturu.

Látka LC-2 (eriodiktyol) ze spojené frakce 5

Narůžovělé krystaly (287 mg) ze spojené frakce 5 byly rekrystalizovány ze směsi ethanol : chloroform (1 : 1), odsáty na fritě a vysušeny. Bylo získáno 172 mg bílé krystalické látky LC-2: t. t. 266-268 °C; UV (MeOH) λ_{max} 215, 288; API-ES-MS: *m/z* 289 [M + H]⁺. Látka byla na základě NMR analýzy identifikována jako flavonoid eriodiktyol (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanon) (obr. 12). NMR spektra byly porovnány

s údaji z literatury (Zhang et al. 2006).



Obr. 12. Eriodiktyol

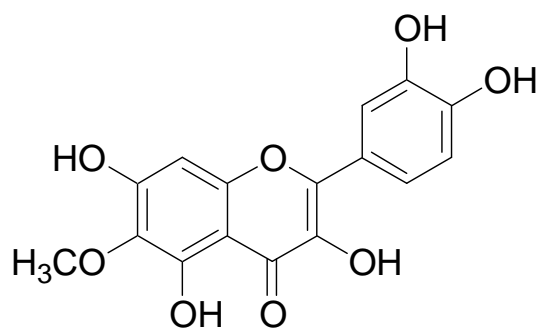
Látka LC-3 (patuletin) a LC-4 (kys. 4-hydroxybenzoová) ze spojené frakce 6

Spojená frakce 6 byla podrobena preparativní TLC. Chromatografické desky byly před nanesením vzorku promyty v chromatografické koloně směsí chloroform : ethanol (1 : 1). Na chromatografické desky byl pomocí pravítka nanesen skleněným perem utěsněným smotkem vaty pás (šířka 0,5 cm) vzorku rozpuštěného ve směsi chloroform : ethanol (1 : 1) tak, aby 1,5 mg odparku odpovídalo 1 cm pásu na chromatogramu. Po vyvinutí a vysušení chromatogramu byly rozdělené pásy látek seškrábnuty kopistkou. Látky byly vylučovány z adsorbentu ethanolem pomocí skleněné kolony utěsněné vatou, odpařeny a vysušeny v exsikátoru.

| | |
|---------------|--|
| Odparek: | 1,37 g |
| Adsorbent: | silikagel Fluka 0,1 – 0,2 mm, s fluorescenčním indikátorem, dezaktivovaný 10% vody; silikagel byl smísen s vodou v poměru 1 : 4, promíchán, stejnoměrně rozvrstven na skleněné desky (10 × 20 cm) a vysušen při pokojové teplotě (23 °C) |
| Mobilní fáze: | toluen : ethyl-formiát : kys. mravenčí (5,5 : 4 : 0,5) |
| Detekce: | $\lambda = \text{UV } 254$ a $\lambda = 366 \text{ nm}$ |

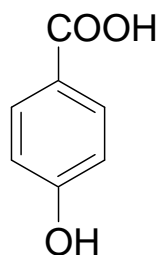
Preparativní TLC analýzou byly získány dvě látky:

A) Bylo získáno 188 mg žlutohnědé látky (obr. 13). Po rekrystalizaci látky ze směsi chloroform : ethanol (1 : 1), odsátí a vysušení bylo získáno 73 mg žluté krystalické látky LC-3: t. t. 260-262 °C; UV (MeOH) λ_{max} 259, 370; API-ES-MS: m/z 333 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Látka byla na základě porovnání NMR spekter s údaji z literatury identifikována jako flavonoid patuletin (3',4',5,7-pentahydroxy-6-methoxyflavonol) (Andrade et al. 1999).



Obr. 13. Patuletin

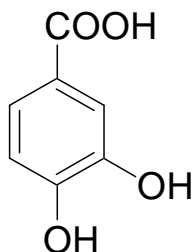
B) Po provedené preparativní TLC bylo získáno 257 mg šedě zbarvené látky. Po rekrystalizaci z methanolu, odsátí a vysušení bylo získáno 147 mg bílé krystalické látky (LC-4): t. t. 211-214 °C; UV (MeOH) λ_{\max} 253; API-ES-MS: m/z 138 [M + H]. Látka byla na základě NMR analýzy identifikována jako 4-hydroxybenzoová kyselina (obr. 14). NMR spektra byly porovnány s údaji z literatury (DellaGreca et al. 1999).



Obr. 14. Kyselina 4-hydroxybenzoová

Látka LC-5 (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová) ze spojené frakce 8

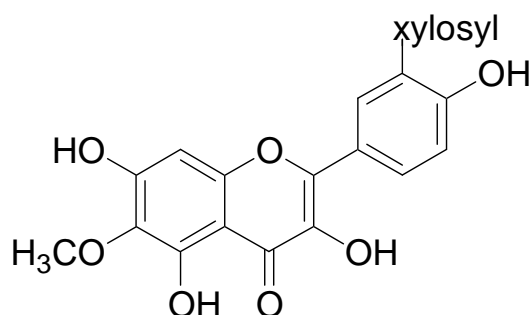
Krystaly (356 mg) ze spojené frakce 8 (79-98) byly rekrystalizovány z vody. Bylo získáno 240 mg bílé látky LC-5: t. t. 199-202 °C; UV (MeOH) λ_{\max} 258, 294; API-ES-MS: m/z 154 [M + H]⁺. Látka byla na základě porovnání změřených NMR spekter s údaji z literatury identifikována jako 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (obr. 15) (DellaGreca et al. 1999).



Obr. 15. Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová

Látka LC-6 (patuletin-3'-β-D-xylofuranosid) ze spojené frakce 9

Žluté krystaly (287 mg) spojené frakce 9 byly rekrystalizovány z methanolu, odsáty na fritě a vysušeny. Bylo získáno 203 mg žluté krystalické látky LC-6: t. t. 275-278 °C; UV (MeOH) λ_{\max} 264; API-ES-MS: m/z 465,1 [M + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,50 (1H, bs, OH-5), 10,79 (1H, bs, OH-7), 9,53 (1H, bs, OH-4'), 9,49 (1H, bs, OH-3), 7,91 (1H, d, $J=2,4$ Hz, H-2'), 7,77 (1H, dd, $J=8,7$ Hz, $J=2,4$ Hz, H-6'), 6,97 (1H, d, $J=8,7$ Hz, H-5'), 6,53 (1H, s, H-8), 5,59 (1H, bs, OH), 5,15 (2H, bs, OH), 4,77 (1H, d, $J=7,5$ Hz, CH-1''), 3,86-3,77 (1H, m, CH-5''), 3,74 (3H, s, OCH₃), 3,47-3,18 (4H, m, CH-2'', CH-3'', CH-4'', CH-5''); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 146,4 (C-2), 135,9 (C-3), 176,4 (C-4), 151,5 (C-5), 131,1 (C-6), 151,9 (C-7), 94,0 (C-8), 157,5 (C-9), 103,6 (C-10), 123,7 (C-1'), 116,4 (C-2'), 145,0 (C-3'), 149,4 (C-4'), 116,9 (C-5'), 122,4 (C-6'), 103,1 (C-1''), 73,3 (C-2''), 76,1 (C-3''), 69,6 (C-4''), 66,0 (C-5''), 60,2 (OCH₃). Flavonoid byl podle NMR analýzy označen jako patuletin-3'-β-D-xylofuranosid (obr. 16) (Kolečkář et al. 2010).



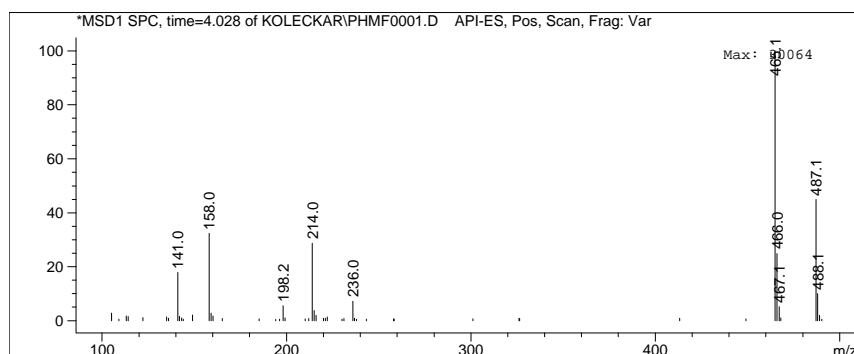
Obr. 16. Patuletin-3'-β-D-xylofuranosid

Obr. 17 ukazuje hmotnostní spektra patuletin-3'-β-xylofuranosidu s měnícím se podílem protonovaného aglykonu patuletinu o hmotě 333 při různých ionizačních energiích. ¹H NMR a ¹³C NMR spektra jsou znázorněny na obr. 18 a 19.

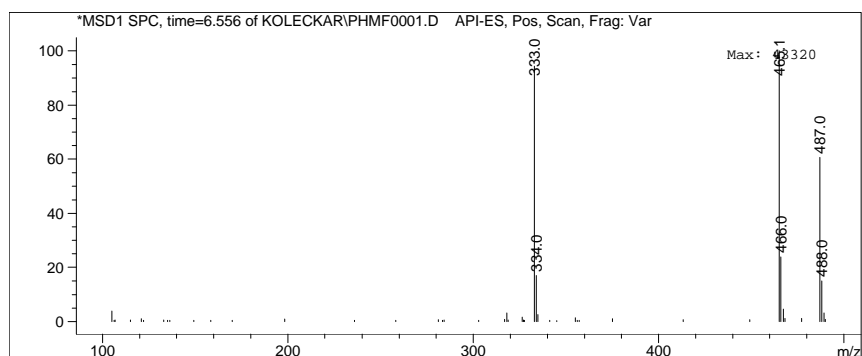
Pro potvrzení struktury flavonoidu byla provedena enzymatická hydrolýza rekrystalizované látky (30 mg). Ve 20 ml acetátového pufru (pH 5) bylo smícháno 30 mg flavonoidního glykosidu a 30 mg β-glukosidasy. Směs byla míchána po dobu 15 hodin při 37 °C a po ochlazení vytřepána ethyl-acetátem (4 × 7 ml). Obě fáze byly zfiltrány přes filtrační papír. Aglykon (10,2 mg) byl získán promytím organické fáze vodou (1 : 1) a následným odpařením a vysušením. Vodná fáze byla odpařena do sucha, promíchána za tepla (40 °C) s 10 ml methanolu, přefiltrována přes filtrační papír a odpařena do sucha. Poté byla rozpuštěna v 3 ml vody a nanesena na kolonku

Lichrolut® RP-18 (Merck, Česká Republika), která byla nejprve promyta methanolem a směsí methanol : voda (1 : 1). Cukerná složka byla následně eluována několika mililitry vody, odpařena a vysušena. Bylo získáno 25,6 mg bílé krystalické látky, která byla podle provedené NMR analýzy složena z cukru a příměsí octanu sodného. Aglykon byl podle NMR analýzy identifikován jako patuletin (Andrade et al. 1999). NMR spektra cukru se shodovala se spektry standardu xylosy.

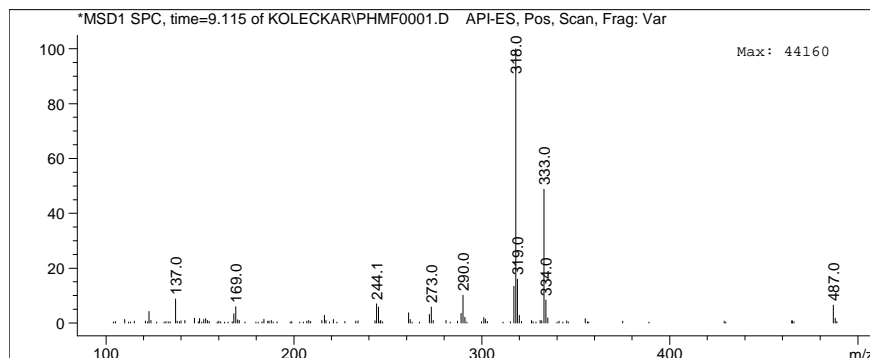
a)



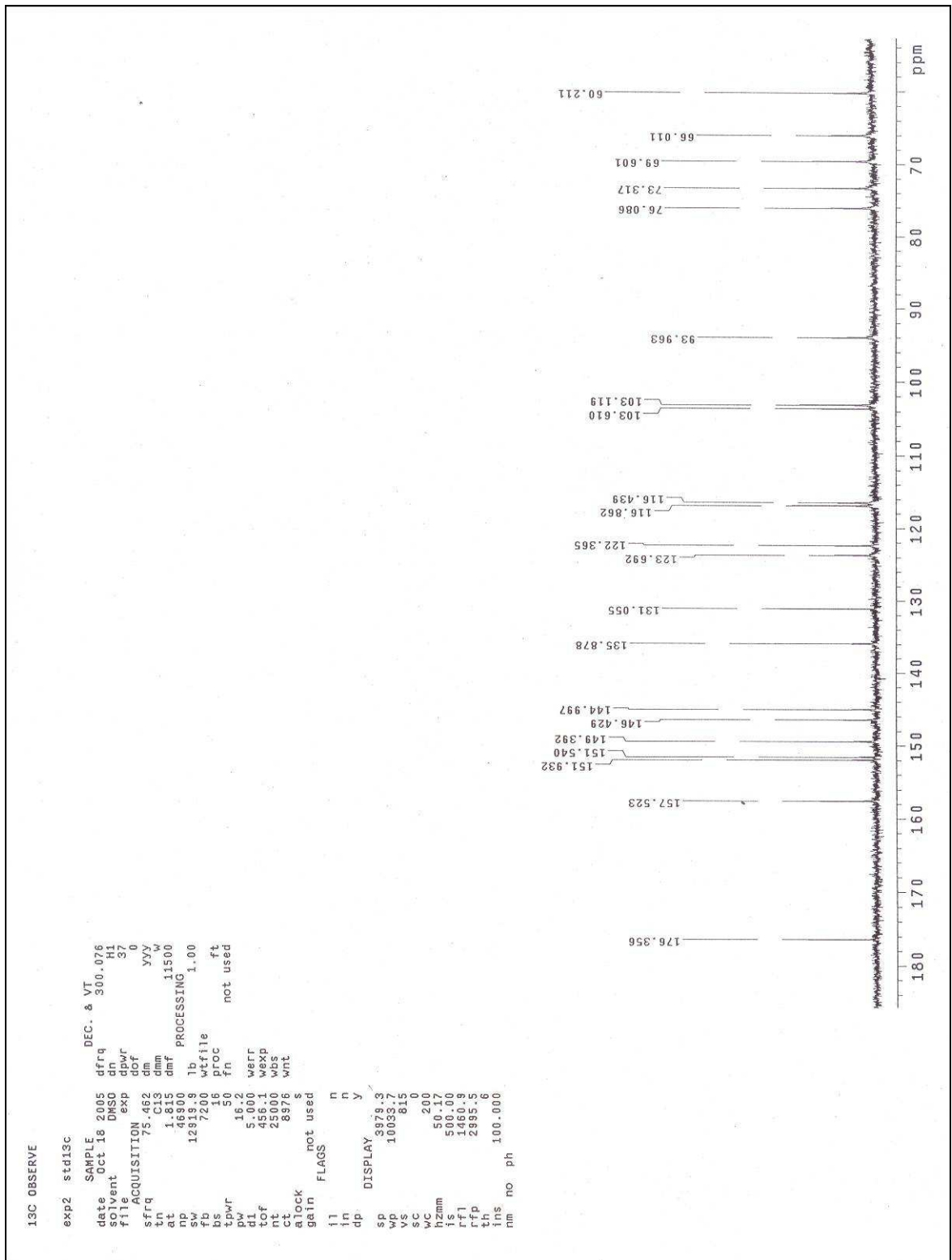
b)



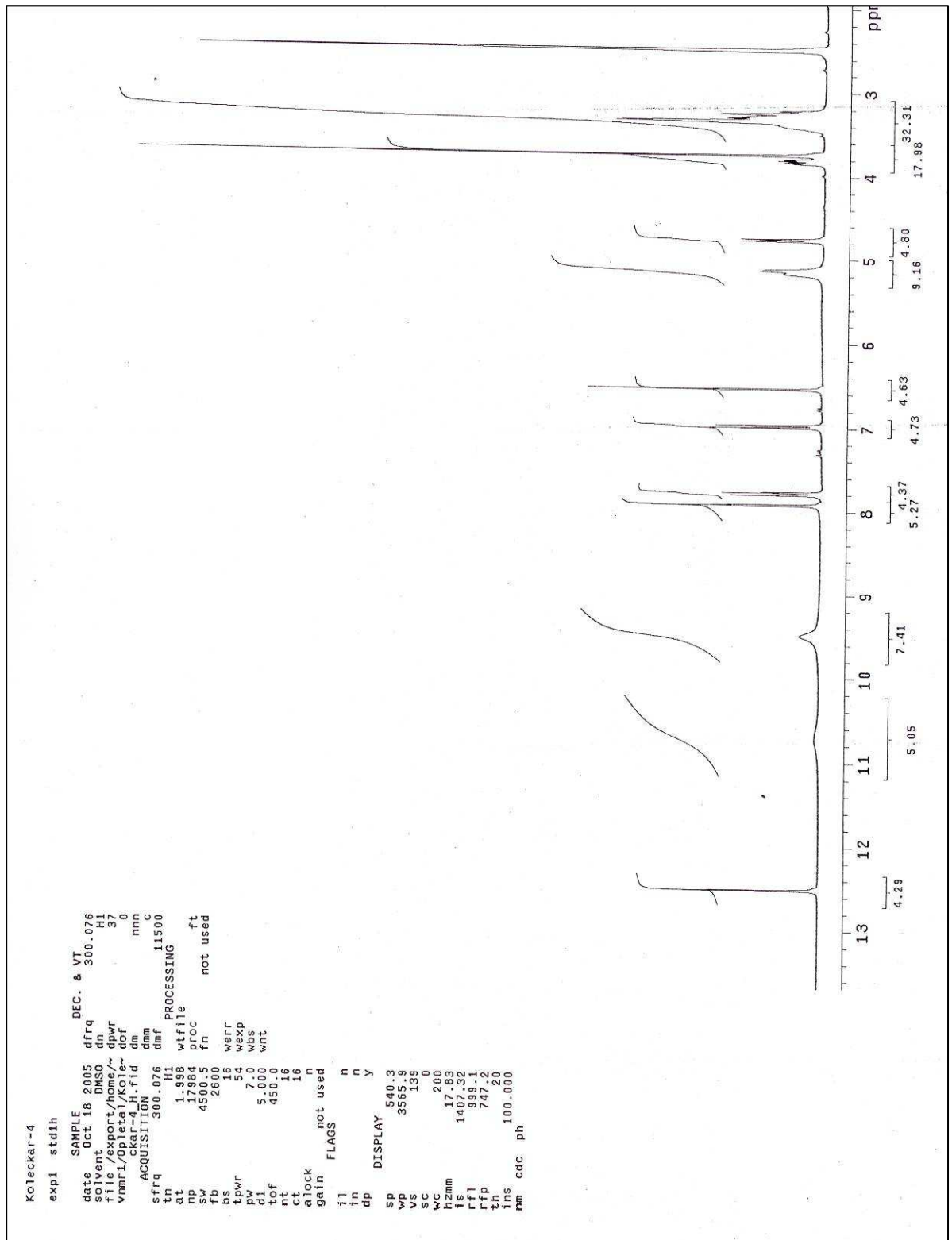
c)



Obr. 17. MS fragmentační spektra patuletin-3'-β-D-xylofuranosidu při různých ionizačních energiích: a) 100 V, b) 175 V, c) 250 V



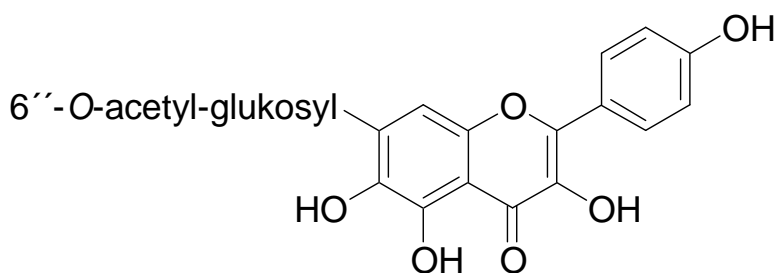
Obr. 18. ^{13}C NMR spektrum patuletin-3'- β -D-xylofuranosidu



Obr. 19. ^1H NMR spektrum patuletin-3'- β -D-xylofuranosidu

Látka LC-7 (6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl-β-D-glukopyranosid)) ze spojené frakce 10

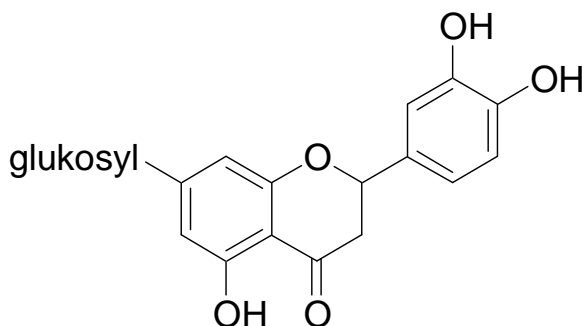
Žluté krystaly (160 mg) ze spojené frakce 10 byly rekrystalizovány z methanolu, odsáty na fritě a vysušeny. Bylo získáno 87 mg žluté krystalické látky LC-7: t.t. 175 - 177 °C; UV (MeOH) λ_{\max} 257, 275; API-ES-MS: m/z 507 $[M + H]^+$. Látka byla na základě porovnání změřených NMR spekter s údaji z literatury identifikována jako flavonoidní glykosid 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl-β-D-glukopyranosid) (Miliauskas et al. 2005).



Obr. 20. 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl-β-D-glukopyranosid)

Látka LC-8 (eriodiktyol-7-β-D-glukopyranosid) ze spojené frakce 11

Z methanolu bylo rekrystalizováno 220 mg látky získaných ze spojené frakce 11. Po odsátí krystalů na fritě a jejich vysušení bylo získáno 157 mg žluté krystalické látky LC-8. Teplota tání byla 151-153 °C; UV (MeOH) λ_{\max} 288; API-ES-MS: m/z 451 $[M + H]^+$. Látka byla na základě vyhodnocení změřených NMR spekter a porovnáním s údaji z literatury identifikována jako eriodiktyol-7-β-D-glukopyranosid (Mun'ím et al. 2003).

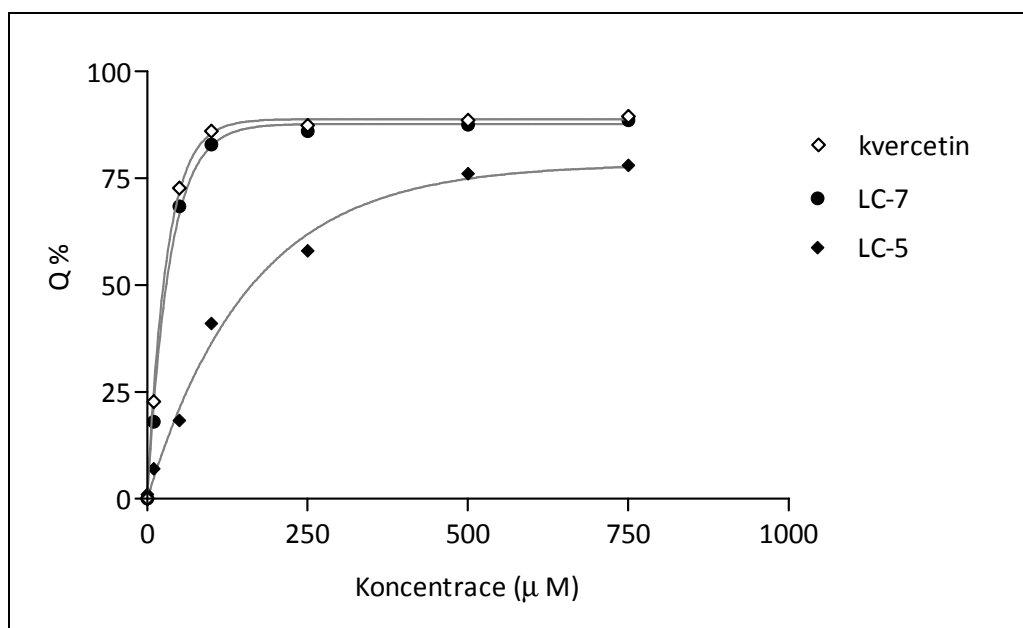


Obr. 21. Eriodiktyol-7-β-D-glukopyranosid

Výsledky DPPH testu

Hodnoty EC_{50} (μM) izolovaných látek a dvou standardů (trolox, kvercetin) jsou uvedeny v tabulce 5 (Kolečkář, Opletal et al. 2008). Graf závislosti antioxidační aktivity

na koncentraci dvou izolovaných látek s rozdílnou antioxidační aktivitou (LC-7, LC-5) a kvercetin je zobrazen na obr. 22.



Obr. 22. Příklady různých křivek závislosti poklesu absorpance DPPH roztoku (Q %) na koncentraci látky: flavonoidu LC-7, fenolické kyseliny LC-5 a kvercetin

Tabulka 5. Hodnoty EC_{50} (μM) izolovaných látek, troloxu a kvercetin

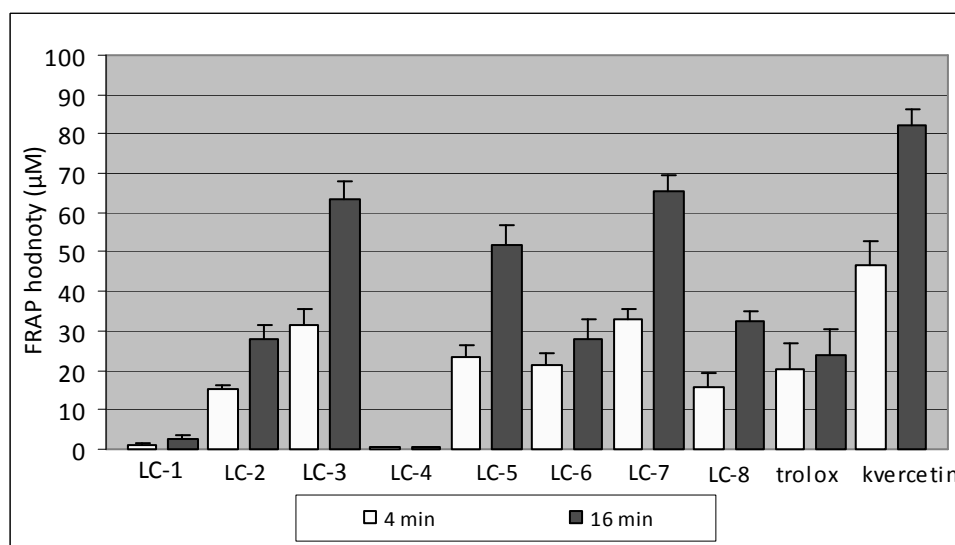
| Látka | EC_{50} (μM) |
|--|-----------------------|
| LC-1 (hispidulin) | $769,6 \pm 6,2$ |
| LC-2 (eriodiktyol) | $76,4 \pm 3,1$ |
| LC-3 (patuletin) | $33,1 \pm 2,4$ |
| LC-4 (kyselina 4-hydroxybenzoová) | >1000 |
| LC-5 (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová) | $53,7 \pm 2,7$ |
| LC-6 (patuletin-3'- β -xylofuranosid) | $56,0 \pm 3,0$ |
| LC-7 (6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl- β -D-glukopyranosid)) | $29,9 \pm 1,6$ |
| LC-8 (eriodiktyol-7- β -glukopyranosid) | $95,6 \pm 2,2$ |
| trolox | $27,8 \pm 1,1$ |
| kvercetin | $25,3 \pm 1,8$ |

Výsledky FRAP testu

Výsledky antioxidačních aktivit izolovaných látek a standardů (trolox, kvercetin) jsou uvedeny jako FRAP hodnoty v čase 4 a 60 min (tab. 6, obr. 23) (Kolečkář, Opletal et al. 2008).

Tabulka 6. FRAP hodnoty testovaných látek v čase 4 a 60 min

| Látka | FRAP hodnota 4 min (μM) | FRAP hodnota 60 min (μM) |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| LC-1 | $1,2 \pm 0,4$ | $2,6 \pm 0,9$ |
| LC-2 | $15,1 \pm 1,1$ | $27,9 \pm 3,8$ |
| LC-3 | $31,6 \pm 3,9$ | $63,6 \pm 4,2$ |
| LC-4 | 0 | 0 |
| LC-5 | $23,3 \pm 2,0$ | $52,0 \pm 4,5$ |
| LC-6 | $28,4 \pm 3,2$ | $35,8 \pm 4,6$ |
| LC-7 | $33,1 \pm 2,8$ | $65,3 \pm 5,0$ |
| LC-8 | $15,7 \pm 2,5$ | $32,7 \pm 4,3$ |
| trolox | $20,4 \pm 3,7$ | $23,7 \pm 2,2$ |
| kvercetin | $46,9 \pm 6,7$ | $82,2 \pm 7,0$ |



Obr. 23. Grafické znázornění FRAP hodnot testovaných látek v čase 4 a 60 min

Výsledky antiagregačního testu

Naměřené hodnoty EC₅₀ izolovaných látek a kyseliny acetylsalicylové jsou uvedeny v tabulce 7 (Kolečkář, Brojerová et al. 2008).

Tabulka 7. Hodnoty EC₅₀ testovaných látek

| Látka | EC ₅₀ (μM) | | |
|-------|-----------------------|------------|-------------|
| | ADP | COL | AA |
| LC-1 | 1060 ± 54 | 100 ± 24 | 522 ± 13 |
| LC-2 | > 1100 | 839,6 ± 41 | 861,1 ± 51 |
| LC-3 | > 1100 | 912,9 ± 37 | 1027,3 ± 55 |
| LC-4 | > 1100 | 928,0 ± 63 | > 1100 |
| LC-5 | > 1100 | 1048 ± 48 | > 1100 |
| LC-6 | > 1100 | > 1100 | > 1100 |
| LC-7 | > 1100 | > 1100 | > 1100 |
| LC-8 | > 1100 | > 1100 | > 1100 |
| ASA | > 1100 | 89 ± 10 | 18 ± 2 |

Výsledky kvantitativní analýzy

Výsledky kvantitativní analýzy jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Procentuální zastoupení izolovaných látek v sušině *L. carthamoides*

| Látka | Obsah v sušině (%) |
|-------|--------------------|
| LC-1 | 0,082 ± 0,003 |
| LC-2 | 0,103 ± 0,001 |
| LC-3 | 0,011 ± 0,002 |
| LC-4 | 0,061 ± 0,003 |
| LC-5 | 0,096 ± 0,001 |
| LC-6 | 0,043 ± 0,002 |
| LC-7 | 0,067 ± 0,004 |
| LC-8 | 0,574 ± 0,003 |

6. DISKUSE

Biologická aktivita přírodních látek

Antioxidační aktivita látek přírodního charakteru je celosvětově intenzivně sledována z důvodu její využitelnosti v prevenci a léčbě civilizačních onemocnění. Součástí výzkumu je např. hledání nových antioxidačně aktivních látek a zjišťování jejich účinků *in vitro* a *in vivo*, testování biologických aktivit látek již známých, zjišťování možných nežádoucích účinků, nebo hledání optimálních technologických postupů přípravy rostlinných extraktů. Nové výzkumy mohou směřovat k nalezení nových, bezpečnějších a účinnějších antioxidantů než těch, které jsou v současnosti nejvíce terapeuticky používány. Jedná se především o kyselinu askorbovou, tokoferoly (D,L- α -tokoferol) a karotenoidy (používán je zejména β -karoten). Vyhledávací výzkumy přírodních látek kladou důraz na látky popř. rostlinné extrakty, které by disponovaly nejen antioxidačním účinkem, ale zároveň dalšími terapeuticky využitelnými účinky (např. antiagregační, protizánětlivou nebo antineoplastickou aktivitou). Je potřeba zmínit, že v literatuře existuje jen málo prací, které současně hodnotí jak antioxidační tak antiagregační účinek přírodních i syntetických látek (Lei et al. 2003). Biologické účinky by měly na sebe navazovat v průběhu patofyziologického procesu a látky by měly být bezpečné při běžném použití. Komplexnost biologického působení přírodních látek je zde uvedena na příkladu proanthocyanidinů.

Proanthocyanidiny prokazují mnoho biologických účinků (Cos et al. 2003). Známá je např. jejich antineoplastická aktivita. Mechanismus tohoto působení však není zcela vysvětlen. Uplatňovat se může antioxidační aktivita. Kondenzované třísloviny mohou potlačit oxidační stres, který je významný v patogenezi zhoubného bujení a ovlivňuje apoptózu buněk. Indukce apoptózy a antitumorová aktivita oligomerních proanthocyanidinů byla prokázána např. u buněčné linie SNU-C4 kolorektálního karcinomu. Mezi významné vlastnosti proanthocyanidinů se řadí i jejich protizánětlivý účinek. Mechanismus tohoto působení ale také není zcela objasněn. Je to dáno komplexní povahou zánětlivých procesů a tím i mnoha možnostmi jejich ovlivnění. Řada prací, které se zabývaly protizánětlivým účinkem kondenzovaných tříslovin, hodnotily nejen jejich antioxidační působení, ale také vliv na NF- κ B, který je důležitým regulátorem genové exprese a podporuje transkripci mnoha zánětlivých mediátorů (např. IL-8, TNF- α). Z kondenzovaných tříslovin byla inhibice NF- κ B a snížení produkce oxidu dusnatého prokázány např. u dimerních procyanidinů, zatímco trimerní

procyanidin působil opačně. Tento výsledek ukazuje také na důležitost vlivu struktury a polymerace na aktivitu uvedených sloučenin. Antioxidační a protizánětlivé vlastnosti se podílí na kardioprotektivním účinku proanthocyanidinů. Známe jsou také jejich antimikrobiální účinky. *In vitro* testy potvrdily inhibici mnoha druhů bakterií jako např. *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Escherichia*, *Staphylococcus* nebo *Streptococcus*. V praxi se využívají na proanthocyanidiny bohaté brusinkové extrakty (*Vaccinium macrocarpon*) při léčbě infekcí močového ústrojí. Dochází k adhezi proanthocyanidinů na epitel močových cest a zabránění šíření *Escherichia coli* (Kolečkář, Kubíková et al. 2008).

Z přírodních zdrojů je sledován antioxidační účinek nejen u léčivých rostlin, ale zejména také potravin, jako jsou např. cereálie, ovoce nebo kořeniny (Slavin et al. 2003; Du Troit et al. 2001). Jako zdroje antioxidantů slouží také mořské organizmy a houby, zejména z oddělení Eumycota (Knyšova et al. 2002). Pozornost je také věnována specifickým typům přírodních látek. Známe jsou např. antioxidační účinky flavonoidů a procyanidinů ve vínu nebo zeleném čaji. Do středu zájmu se dále dostávají např. deriváty kurkuminu, rosmarinová kyselina, antioxidační látky zázvoru nebo betalainy z taxonů čeledi Amaranthaceae (Ali a Halim 2002; Petersen a Simmonds 2003; Zakaria-Rungkat a Naruhman 2003; Cai et al. 2003). Z karotenoidů je v poslední době kladen důraz na astaxanthin, který v preklinickém hodnocení dosahoval lepších terapeutických výsledků než ostatní látky této skupiny (Pashkow et al. 2008). Antioxidační aktivitou nemusí disponovat jen látky fenolické, resp. látky schopné účastnit se redoxních reakcí, ale také např. proteiny (viz Teoretická část) (Tekenaka a Tekenaka 2003).

Mezi nejvíce studované účinky polyfenolů se řadí působení na kardiovaskulární systém a nádorová onemocnění. Z dalších využívaných biologických účinků polyfenolů lze zmínit zvyšování pevnosti kostí u žen v menopauze. U isoflavonoidů bylo prokázáno zvýšení density kostí, zvýšení obsahu kostních minerálů, snížení výskytu nežádoucích pyridiniových vazeb v kostní hmotě nebo zvýšení obsahu osteocalcinu (Williamson a Manach 2005).

Kardioprotektivní působení polyfenolů

Základní mechanismy působení polyfenolů uplatněné při snižování kardiovaskulárních rizik jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9. Mechanismy působení přírodních polyfenolů uplatněné při ochraně před kardiovaskulárním poškozením

| |
|---|
| Antioxidanty |
| <ul style="list-style-type: none">• eliminace ROS (inhibice oxidace LDL a lipidové peroxidace)• chelatace přechodných kovů• inhibice transkripčních faktorů závislých na redoxním stavu• inhibice pro-oxidačních enzymů• indukce antioxidantních enzymů |
| Tvorba aterosklerotických lézí |
| <ul style="list-style-type: none">• redukce exprese adhezivních molekul• protizánětlivý účinek• redukce kapacity makrofágů k modifikovanému LDL |
| Trombocytární funkce |
| <ul style="list-style-type: none">• inhibice agregace trombocytů |
| Krevní tlak a cévní reaktivita |
| <ul style="list-style-type: none">• indukce endotelové relaxace pomocí NO |
| Plazmatické lipidy a lipoproteiny |
| <ul style="list-style-type: none">• redukce plazmatického cholesterolu a triglyceridů |

Účinek přírodních extraktů na rozvoj aterosklerotických lézí byl studován např. u myši (apolipoprotein E) a křečků. K redukci lézí došlo u zvířat krmených příměsí zeleného a černého čaje, extraktu z granátových jablek nebo vinné révy. Studie uvedly, že kromě antioxidantního působení se uplatňuje také protizánětlivý účinek polyfenolů. Výsledky těchto studií ale nemohou být extrapolovány na lidskou populaci, protože aplikované dávky byly mnohem vyšší než ty běžně uváděné u lidí (Manach et al. 2005).

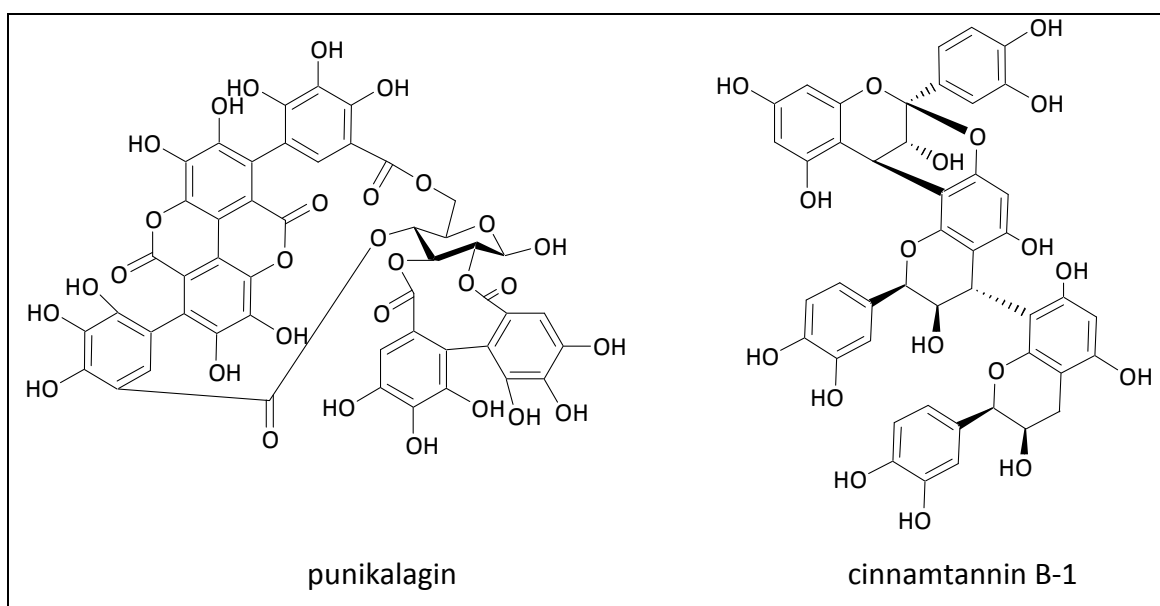
Mnoho studií potvrdilo schopnost polyfenolů redukovat *in vitro* oxidaci LDL. Bylo např. uvedeno, že katechiny a procyanidiny kávových zrn inhibovaly *in vitro* oxidaci lidského LDL v následujícím pořadí: procyanidin C-1 > procyanidin B-2 > (+)-katechin >

(-)-epikatechin. Velikost antioxidačního působení byla dána do souvislosti s počtem hydroxylových skupin (Kolečkář, Kubíková et al. 2008).

Jiná studie zkoumala vliv flavonoidu naringenu na tkáňovou antioxidační kapacitu a lipidovou peroxidaci u potkanů s ethanolem indukovanou hepatotoxicitou. Bylo zjištěno, že po podání naringenu došlo u potkanů ke snížení hodnot sérového aspartátu a alanin-transaminas, gamma-glutamyl-transpeptidas, tkáňových thiobarbiturových reaktivních látek, konjugovaných dienů, lipidových hydroperoxidů. Zvýšená byla aktivita SOD, katalas, GSH-peroxidas, GSH-reduktas, GSH-S-transferas, hodnota redukováného GSH, vit. C a E (Jayaraman et al. 2009).

Cílem jiné studie bylo hodnocení antioxidačního potenciálu extraktů a džusů z granátových jablek (*Punica granatum*). Bylo zjištěno, že významnou antioxidační složkou připravených nápojů byla hydrolyzovatelná tříslovina punikalagin (obr. 24), který inhiboval lipidovou peroxidaci indukovanou Fe^{2+} na liposomálním modelu.

Mezi antioxidačně aktivní kondenzované třísloviny patří např. trimerní cinnamtannin B-1 (obr. 24). Tato sloučenina byla izolována spolu s dalšími pěti proanthocyanidiny z brusinky (*Rhodococcum vitis-idaea*) ve studii, která hodnotila *in vitro* inhibici lipidové peroxidace. Z této skupiny proanthocyanidinů byl cinnamtannin B-1 vyhodnocen jako nejúčinnější (Kolečkář, Kubíková et al. 2008).



Obr. 24. Antioxidačně aktivní třísloviny

Bylo zjištěno, že intracelulární antioxidační enzym PON-2 hraje významnou roli v prevenci aterogeneze. Ovlivněním aktivity tohoto enzymu pomocí kvercetinu a isorhamnetinu bylo sledováno *in vitro* na myších makrofázích a *in vivo* na skupině obézních lidí s vysokým kardiovaskulárním rizikem (150 mg kvercetin/den, 42 dnů). U myších makrofágů (RAW364,7) došlo ke zvýšení exprese PON-2 (kvercetin, isorhamnetin), zatímco metabolit kvercetinu, kvercetin-3-glukuronid PON-2 *in vitro* neovlivnil. Aktivita enzymu nebyla ovlivněna ani *in vivo* u testovaných dobrovolníků (Boesch-Saadatmandi et al. 2009).

K významným úspěchům při výzkumu přírodních antioxidantů lze zařadit např. léčebné zavedení extraktu z kůry borovice přímořské (*Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica* D. del Villar, *Pinaceae*). Mezi hlavní účinné látky extraktu se řadí flavonoidy a procyanidiny. Tato borovice pochází z jižních oblastí Francie a v mnohých zemích je používána jako surovina pro kardioprotektivní přípravek (Pycnogenol®), který vyvolává např. vasorelaxační působení, inhibici angiotensin konvertujícího enzymu nebo zlepšení permeability kapilár. Komplexní výtažek vykazuje výraznější biologické aktivity než izolované složky, z čehož vyplývá, že obsahové látky působí synergicky. K celkovému antioxidačnímu potenciálu extraktu přispívá kromě schopnosti polyfenolů eliminovat radikály, také jejich schopnost regenerovat askorbylový radikál a chránit endogenní vitamín E a GSH před oxidačním poškozením (Packer et al. 1999).

Antineoplastické působení polyfenolů

In vitro studie prokázaly antineoplastickou aktivitu polyfenolů u mnoha různých buněčných linií, *in vivo* pak na zvířecích modelech a na lidské populaci. Bylo zjištěno, že přírodní polyfenoly jsou schopny působit antineoplasticky v různých fázích nádorového procesu. Kromě antioxidační aktivity se uplatňuje schopnost ovlivňovat různé buněčné procesy. Jako významná se jeví zejména možnost ovlivnění apoptózy. Přírodní polyfenoly působí na membránové a intracelulární receptory, moduluji signální cytoplazmatické procesy, interagují s enzymy ovlivňujícími promoční fázi nádorového procesu a tvorbu metastáz, působí na onkogeny a onkoproteiny, a reagují přímo nebo nepřímo s nukleovými kyselinami a nukleoproteiny (Kampa et al. 2007). *In vitro* cytotoxickou aktivitu proti nádorovým střevním buňkám (Colon205) prokázaly např. flavonoidy izolované z *Chrysanthemum morifolium*. Z šesti izolovaných látek byly

nejúčinnější luteolin a diosmetin (Xie et al. 2009). Antineoplastická aktivita dvanácti přírodních polyfenolů (tři stilbeny, dva flavonoidy, dva kumariny, neolignan a čtyři lignany) izolovaných z rodů *Euphorbia* a *Pycnanthus* byla testována na nádorových buňkách žaludku (EPG85-257), slinivky (EPP85-181) a střeva (HT-29). Ve studii byly využity atypické multi-rezistentní varianty nádorových buněk. Z testovaných látek prokázal nejvyšší cytotoxickou aktivitu flavonoid naringenin. Studie předpokládá, že některé přírodní polyfenoly by mohly být využity v léčbě multirezistentních nádorů (Duarte et al. 2010).

***In vivo* studie polyfenolů**

S lidskými dobrovolníky byly provedeny komplexní *in vivo* studie, které sledují změny různých biomarkerů. Tyto studie zohledňují různou míru absorpce, biologické dostupnosti a metabolizace polyfenolů. Z hlediska biologické účinnosti existuje u polyfenolů několik problémů. Polyfenoly jsou strukturně velmi rozmanitá skupina látek, v níž každá molekulová struktura může disponovat jinou biologickou dostupností. Výsledky jedné studie tak nelze automaticky přenést na jiný typ polyfenolu (rozdílná biologická dostupnost je např. i u různých flavonoidů). Dalším problémem je existence významné metabolizace jednotlivých látek. Sloučeniny z *in vitro* testů se v původní podobě v organismu téměř nevyskytují. Sójové isoflavonoidy jsou z potravy dobře absorbovány, zatímco např. u proanthocyanidinů vína nebo kakaa je absorpce menší. Glukosidy kvercetinu cibule jsou lépe absorbovány než rutin z čaje nebo jablek. U proanthocyanidinů klesá absorpce společně s mírou polymerizace. Kvercetin a jeho glykosidy se v plazmě téměř nevyskytují v původní formě, ale ve formě methylových nebo sulfátových konjugátů, nebo glukuronátů. Bylo např. zjištěno, že kvercetin podávaný v nižších dávkách je více methylován než v dávkách vyšších. Významnou roli v metabolismu polyfenolů hraje střevní mikroflóra, která štěpí polyfenolické konjugáty (např. flavonoidní glykosidy). Dále může docházet např. k absorpci volného polyfenolu do krve (ve volné formě nebo ve formě konjugované), nebo k rozštěpení molekuly na další metabolity (z flavonoidu může vzniknout např. fenolická kyselina) (Manach et al. 2005). Z flavonoidních látek byl v *in vivo* studiích zastoupen zejména kvercetin, popř. potraviny nebo doplňky stravy s jeho vysokým obsahem. Z dalších přírodních fenolických látek byly široce zkoumány isoflavonoidy,

jejichž biologické účinky jsou, narozdíl od flavonoidů, často zprostředkovány díky vazbě na estrogenní receptory (Williamson a Manach 2005).

V některých *in vivo* studiích, které hodnotily antioxidační vlastnosti polyfenolů, bylo uvedeno, že po 1 – 12 týdnech konzumace polyfenolů došlo ke zvýšení celkové antioxidační kapacity plazmy, koncentrace vit. C a E, β -karotenu a kyseliny močové, zatímco několik jiných studií tyto efekty nepotvrdilo. Podobně rozporuplné výsledky přinesly studie, které hodnotily koncentraci lipidových oxidačních produktů v plazmě a míru oxidace plazmového LDL. Rozdílné výsledky byly vysvětleny různou dobou eliminace různých polyfenolů z organismu (2 – 8 hod) (Manach et al. 2005).

Ve dvanácti *in vivo* studiích s různými polyfenoly (doba trvání 1 – 13 týdnů) byl hodnocen vliv na sérové lipidy. U šesti studií byla snížena hladina LDL, apolipoproteinu B a zvýšena hladina HDL a apolipoproteinu A-1. Zbýlých šest studií tyto výsledky nepotvrdilo (Manach et al. 2005).

In vivo studie s červeným vínem, grepovým džusem, kakaem a černým čajem vyhodnotily prospěšný účinek polyfenolů na endotel cév. U červeného vína bylo uvedeno, že pozitivní vliv na endotel cév je zprostředkován převážně polyfenoly a méně pak přímo ethanolem. Dealkoholizované víno mělo podobný účinek jako běžné červené víno, zatímco vodka byla v FMD testu (hodnotí dysfunkce endotelu pažní tepny) u dobrovolníků neúčinná (Manach et al. 2005).

Jednoznačné výsledky přinesly *in vivo* studie, které hodnotily vliv polyfenolů na srážení krve. Bylo zjištěno, že podávání červeného vína, čaje nebo kakaového prášku po dobu 2 – 4 týdnů zdravým dobrovolníkům zlepšilo hemostázu. Bylo uvedeno, že jmenované potraviny inhibovaly *ex vivo* COL a ADP indukovanou destičkovou agregaci (Manach et al. 2005).

Ačkoliv u mnoha *in vitro* studií byl prokázán protizánětlivý účinek polyfenolů, *in vivo* práce tak jednoznačné výsledky nepřinesly. Podávání černého a zeleného čaje, čajových katechinů, vína, grepového džusu a kaka ovlivnilo pouze několik krevních zánětlivých biomarkerů (cirkulující adhezivní molekuly, cytokyniny). Ve studiích bylo uvedeno, že příčinou bylo pravděpodobně jejich provedení na zdravých jedincích, a nedostatečné hodnocení imunitních markerů (Manach et al. 2005).

V *in vivo* studiích bylo uvedeno, že koncentrace přírodních polyfenolů v plazmě se pohybuje obvykle kolem 1 μ M, tedy v mnohem menší koncentraci než v případě

endogenních antioxidantů (150 – 450 μM). I z tohoto důvodu některé *in vivo* práce uzavírají, že přímé spojování schopnosti polyfenolů eliminovat ROS se snížením kardiovaskulárních rizik není tak jednoznačné, jak je v mnoha *in vitro* studiích uváděno. Bylo také např. prokázáno, že polyfenoly červeného vína snížily rozvoj aterosklerotických plátů u myší (apolipoprotein E deficitních) nezávisle na lipidové peroxidaci (Manach et al. 2005).

Výsledky několika klinických studií jsou shrnuty v tabulce 10 (Williamson a Manach 2005).

Tabulka 10. Vliv fenolických látek na vybrané biomarkery

| Látka | Hlavní složka | Dávka | Ovlivněný biomarker | Neovlivněný biomarker |
|--------------------------------|---------------------|--------------|--|---|
| extrakt z <i>Ginkgo biloba</i> | kvercetin | 120 – 320 mg | ↓ krevního tlaku; ovlivnění hladiny inzulinu; ↑ C-peptidu; ↓ volných radikálů; ↑ mentálních funkcí | jaterní funkce; plazmatické lipidy; koagulační testy |
| fenolický extrakt | kvercetin, kemferol | 30 mg | ↑ erytrocytové SOD aktivity; ↓ poškození DNA lymfocytů | plazmatický α -tokoferol a β -karoten |
| doplněk stravy | kvercetin | 30 – 500 mg | ↓ oxidačního poškození lymfocytové DNA; ↑ renálních funkcí; ↑ funkcí prostaty; ↑ odolnosti LDL k oxidaci | destičková agregace; produkce TXB_2 ; plazmatické hladiny vit. C, tokoferolu, SOD, selenu, LDL, HDL, cholesterolu; krevní tlak |
| sója | genistein, daidzein | 25 – 73 mg | ↑ doby folikulární fáze; ↓ hladiny LH a FSH v průběhu menstruačního cyklu; ↓ hladiny plazm. cholesterolu; ↑ kostní resorbce; ↑ sérový IL-6 u žen | sérový C-reaktivní protein, amyloid A a $\text{TNF-}\alpha$ |
| doplněk stravy | genistein | 54 mg | ↑ minerální denzity kosti stehenní a kostí bederní části páteře; pozitivní ovlivnění specifických kostních biomarkerů | - |
| doplněk stravy | směs isoflavonů | 62 – 132 mg | ↓ inzulinové rezistence; ↓ LDL, cholesterol a volný thyroxin; ↓ exkrece kostních resorbčních biomarkerů | HDL; VLDL; cholesterol; triglyceridy; váha; krevní tlak; kreatinin; steroidní hormony |

Antioxidační aktivita čeledí Asteroideae a Cichorioideae

Čeledi Asteroideae a Cichorioideae zahrnují velké množství celosvětově se vyskytujících rodů. Rostliny těchto čeledí jsou široce zkoumány z důvodů jejich potenciálních terapeutických účinků. Výzkumem taxonů těchto čeledí se víc než 10 let zabývala také pracovní skupina Katedry farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Ačkoliv je v současnosti publikována řada studií zabývajících se antioxidačními vlastnostmi jednotlivých zástupců těchto čeledí, neexistuje žádná studie porovnáující antioxidační aktivitu tak rozsáhlého spektra vzorků jako tato práce. Je třeba také zmínit, že řada studií je soustředěna na vyhodnocení antioxidační aktivity připravených frakcí bez toho, že by objasňovaly antioxidační agens a velikost jejich aktivity. Některé studie jsou zde uvedeny:

1) Antioxidační aktivita skupiny rostlin čeledi Asteroideae používaných v lidovém léčitelství ve Východní Anatolii byla vyhodnocena DPPH testem a oxido-redukčním testem. Největší schopnost eliminovat DPPH radikál prokázal methanolvý extrakt *Artemisia austriaca*, následován vodným extraktem *Artemisia austriaca*, vodným extraktem *Helichrysum arenarium* subsp. *rubicundum*, methanolvým extraktem *Achillea wilhelmsii*, vodným extraktem *Artemisia absinthium*, vodným extraktem *Achillea biebersteinii*, vodným extraktem *Cichorium intybus*, vodným extraktem *Achillea wilhelmsii* a vodným extraktem *Tripleurospermum oreades* var. *oreades* (Oezgen et al. 2004).

2) Neuroprotektivní působení podbělu lékařského (*Tussilago farfara*) bylo prokázáno ve studii, která se zabývala jeho protizánětlivými a antioxidačními účinky. Ethyl-acetátová frakce podbělu inhibovala oxidační poškození neuronů indukované peroxidem vodíku nebo systémy xanthin/xanthinoxidasa a Fe^{2+} /askorbová kyselina. Bylo také zjištěno, že ethyl-acetátová frakce inhibuje lipidovou peroxidaci v tkáňovém homogenátu z mozku a eliminuje DPPH radikál (Cho et al. 2005).

3) Vodný extrakt z čekanky obecné (*Cichorium intybus*) prokázal inhibici oxidace LDL, produkce kyseliny thiobarbiturové, degradace mastných kyselin a chránil α -tokoferol v LDL před oxidací katalyzovanou přechodnými kovy (Kim a Yang 1999).

4) Signifikantní antioxidační a antimikrobní aktivita byla zjištěna u silice z řebříčku obecného (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*). Silice působila proti DPPH radikálu ($IC_{50} = 1,56 \mu g \cdot ml^{-1}$), hydroxylovému radikálu ($IC_{50} = 2,7 \mu g \cdot ml^{-1}$), a inhibovala lipidovou

peroxidaci na krysím homogenátu z jater ($IC_{50} = 13,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Candan et al. 2003).

5) Ethanolový a ethyl-acetátový extrakt připravený z *Lactuca scariola* významně inhibovaly DPPH radikál. Ethyl-acetátová frakce byla rozdělena na sloupci silikagelu a byly z ní získány antioxidantně aktivní flavonoidy kvercetin-3-O- β -D-glukopyranosid, luteolin-7-O- β -D-glukopyranosid, luteolin, kvercetin a kemferol (Kim 2001).

DPPH-SIA antioxidantní screening rostlinných extraktů

Při výzkumu antioxidantů se využívá řada metod. U metod, které se užívají při testování velkých množství různorodých přírodních vzorků, jsou kladeny vysoké požadavky na jednoduchost provedení, krátkou dobu trvání analýzy a současně její vysokou reprodukovatelnost. Díky své dobré reprodukovatelnosti a jednoduchosti provedení se mezi nejčastěji používané antioxidantní testy řadí metoda využívající vychytávání DPPH radikálu. U původní DPPH metody trvá doba jednoho měření 20 – 30 minut a metoda je tak jen těžko použitelná pro měření velkých souborů vzorků. Pro screeningové účely tak byla vyvinuta metoda využívající aplikaci původní DPPH metody a SIA (Polášek et al. 2004). Mezi hlavní výhody této metody patří zkrácení doby analýzy (jedno měření trvá 5 minut), dosažené díky předem naprogramovanému automatickému měření. Vyhodnocení EC_{50} jednoho vzorku zahrnující přípravu pěti různých koncentrací testovaného vzorku v trojím provedení (výsledkem je průměr ze třech analýz) trvá kolem 30 minut. K dalším výhodám metody patří použití jen minimálního množství měřených vzorků (1 mg), snížení množství rozpouštědel a tím i výsledného odpadu.

Vzorky byly před vlastním měřením připraveny podle standardizovaného postupu. Pro extrakci byl zvolen 70 % ethanol, který dobře rozpouští většinu organických látek, ale výrazně neextrahuje látky anorganické. U nadzemních rostlinných drog se bylo nutné zbavit chlorofylu, který vykazuje antioxidantní vlastnosti a mohl by tak negativně ovlivnit antioxidantní měření. Jako sušící metoda byla použita lyofilizace, která umožnila šetrné vysušení.

Antioxidantní analýze předcházelo shromáždění (sběr, nákup) 87 vzorků různých morfologických částí rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae. Jednalo se o běžné léčivé rostliny nebo divoce rostoucí rostliny, v hojném počtu, které dosud z tohoto pohledu nebyly sledovány. Pro antioxidantní analýzu bylo připraveno 87 sumárních

extraktů. 29 vzorků prokázalo v DPPH-SIA testu hodnotu EC_{50} nižší než $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$, která byla zvolena jako hodnota vymežující signifikantně aktivní vzorky. Tyto vzorky lze považovat za vhodné pro další antioxidační a izolační studie. Mezi nejvíce antioxidačně aktivní vzorky patřily *Leuzea carthamoides* ($EC_{50} = 0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$, listy), *Inula salicifolia* ($EC_{50} = 0,048 \text{ mg.ml}^{-1}$; kvetoucí nať), *Inula hirta* ($0,049 \text{ mg.ml}^{-1}$; kvetoucí nať), *Petasites hybridus* ($0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$; listy), *Artemisia pontica* ($0,053 \text{ mg.ml}^{-1}$; nať), *Tanacetum vulgare* ($0,054 \text{ mg.ml}^{-1}$; listy) a *Achillea ptarmica* ($0,057 \text{ mg.ml}^{-1}$; kvetoucí nať). *L. carthamoides* byla zvolena pro fytochemickou studii (Kolečkář, Opletal et al. 2008).

***Leuzea carthamoides* – obsahové látky, biologické účinky**

Parcha saflorová (*Leuzea carthamoides* (WILLD.) DC., Asteroideae) se v posledních letech stala významným taxonem, využitelným v humánní praxi i živočišné výrobě. Parcha saflorová je původem endemitem jižní Sibiře, ale v současné době je pěstována v celé Evropě. Hlavními obsahovými látkami celé rostliny jsou ekdysteroidy a flavonoidy, nadzemní část obsahuje navíc seskviterpenické laktony (guajanolidového typu), kořeny obsahují polyiny (Opletal et al. 1997).

Z ekdysteroidů (deriváty 5- β -cholest-6-on-7-enu) byl izolován 20-hydroxyekdyson, který je z kvantitativního hlediska hlavním ekdysteroidem. Jeho obsah se pohybuje u nati v rozmezí 0,1 % až 0,245 %. Z minoritních látek lze uvést např. inokosteron, 2-deoxyekdysteron, rapisterony, makisteron A, polypodin B nebo isovitexiron. Z řady biologických účinků ekdysteroidů lze uvést např. snížení hladiny cholesterolu, potlačení hyperglykémie nebo snížení proliferace sarkomu. Významný je také jejich anabolický efekt.

Z flavonoidních látek byl izolován např. apigenin, kemferol, kvercetagenin, kvercetin, methylethery kvercetinu, isorhamnetin, luteolin, hesperetin nebo epikatechin-gallát. Celkový obsah flavonoidů v drogách z parchy saflorové se pohybuje do 0,3 %. Flavonoidy prokázaly např. efekt antibakteriální, protizánětlivý, diuretický, hypotenzivní nebo antioxidační (Kokoška a Janovská 2009).

Guajanolidový typ seskviterpenických laktonů je v nati zastoupen cynaropikrinem, janerinem, chlorojanerinem, cebellinem a repdiolidem. Množství těchto látek se pohybuje v suchých listech až do 0,16 %. Guajanolidy jsou známy svou cytotoxickou a antitumorovou aktivitou (Opletal et al. 1997).

V současnosti již existuje několik studií, které uvedly antioxidační účinek parchy saflorové:

1) Schopnost eliminovat DPPH a ABTS radikál byla hodnocena u dvanácti vybraných léčivých rostlin (*Salvia sclarea*, *Salvia glutinosa*, *Salvia pratensis*, *Lavandula angustifolia*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea purpurea*, *Leuzea carthamoides*, *Juglans regia*, *Melilotus officinalis*, *Geranium macrorrhizum* a *Potentilla fruticosa*). Z rostlin byl připraven methanolový, ethyl-acetátový a vodný extrakt. DPPH eliminační aktivita extraktů byla hodnocena parametrem Q (%) ve dvou různých koncentracích, hodnota EC₅₀ uvedena nebyla. Z připravených extraktů parchy saflorové byl vyhodnocen jako antioxidačně nejúčinnější methanolový extrakt (Miliauskas et al. 2004).

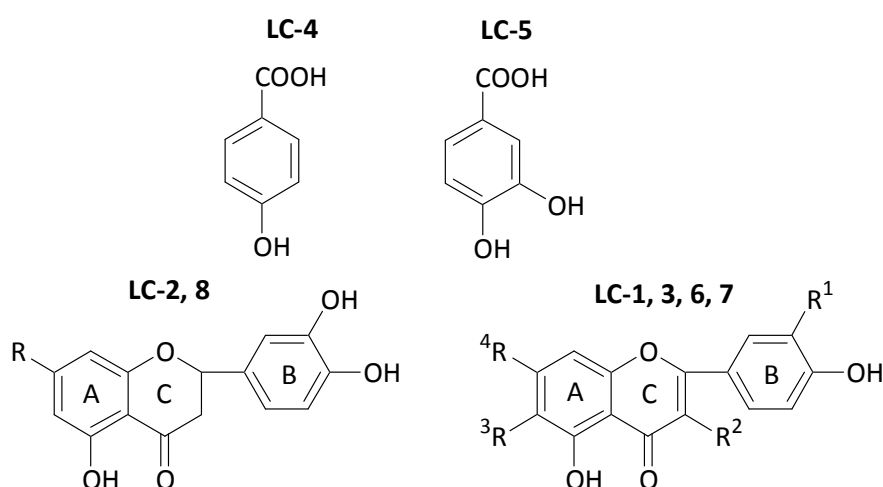
2) Pět flavonoidů, chlorogenová kyselina a β-ekdyson byly identifikovány z antioxidačně aktivních polárních frakcí připravených z parchy saflorové ve studii Miliauskase et al. (2006). Antioxidační aktivita frakcí byla vyhodnocena DPPH testem. Identifikace látek proběhla pomocí systému LC-DAD-SPE-NMR. Autoři článku shrnuli, že pro vyhodnocení antioxidačního účinku připravených extraktů a identifikovaných látek je potřeba provedení dalších testů.

3) Chloroformový, methanolový a vodný extrakt z parchy saflorové byl hodnocen z hlediska DPPH zhášecí aktivity v práci Biskupa a Lojkowske (2006). Vypočtené hodnoty IC₅₀ byly porovnány se známými antioxidanty. Hodnoty IC₅₀ byly 25 μg.ml⁻¹ pro vodný extrakt, 45 μg.ml⁻¹ pro methanolový extrakt, 190 μg.ml⁻¹ pro BHT, 4 μg.ml⁻¹ pro kyselinu askorbovou a 12 μg.ml⁻¹ pro α-tokoferol. Chloroformový extrakt byl hodnocen jako neaktivní.

Izolace antioxidačních látek z parchy saflorové

Během fytochemické studie byla testována DPPH eliminační aktivita připravených frakcí. Aktivnější frakce byla vždy vybrána pro další izolační postup. Významnou antioxidační aktivitu prokázal již primární ethanolový extrakt (EC₅₀ = 0,138 mg.ml⁻¹) a následný vodný výtřepek (EC₅₀ = 0,103 mg.ml⁻¹ (obr. 9, str. 43). Z důvodu fenolického charakteru přírodních antioxidantů byla během studie zvolena separace na sloupci polyamidu, která umožnila oddělení frakce fenolických látek od látek nefenolického charakteru. Frakce fenolických látek vykázala vysoký antioxidační účinek v DPPH testu

($EC_{50} = 0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$), zatímco nefenolická frakce byla téměř neaktivní ($EC_{50} = 0,973 \text{ mg.ml}^{-1}$). Fenolická frakce byla rozdělena na méně polární frakci ethyl-acetátovou ($EC_{50} = 0,038 \text{ mg.ml}^{-1}$) a polárnější vodnou ($EC_{50} = 0,059 \text{ mg.ml}^{-1}$). Obě frakce vykázaly vysokou DPPH zhášecí aktivitu. Ethyl-acetátová frakce byla vybrána z důvodu nižší hodnoty EC_{50} pro separaci na sloupci silikagelu. Vodná frakce byla vysušena a uschována pro případnou další antioxidační analýzu. Sloučeniny vodné frakce by měly být spíše glykosidického charakteru, zatímco v ethyl-acetátové frakci byly očekávány látky méně polární, neglykosidické.



| Látka | R | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ |
|-------|----------|----------------|----------------|------------------|-----------------------|
| LC-1 | - | H | H | OCH ₃ | OH |
| LC-2 | H | - | - | - | - |
| LC-3 | - | OH | OH | OCH ₃ | OH |
| LC-6 | - | xylosyl | OH | OCH ₃ | OH |
| LC-7 | - | H | OH | OH | O-6''-acetyl-glukosyl |
| LC-8 | glukosyl | - | - | - | - |

Obr. 25. Látky izolované z parchy saflorové

Z ethyl-acetátové frakce bylo izolováno osm sloučenin (šest flavonoidů a dvě fenolické kyseliny) (obr. 25): hispidulin (LC-1), eriodiktyol (LC-2), patuletin (LC-3), kyselina 4-hydroxybenzoová (LC-4), kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (LC-5), patuletin-3'- β -D-xylofuranosid (LC-6), 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl- β -D-glukopyranosid) (LC-7), eriodiktyol-7- β -D-glukopyranosid (LC-8). Obě fenolické kyseliny (LC-4, LC-5)

a flavonoidy LC-3 a LC-7 již byly popsány jako obsahové látky parchy saflorové (Miliauskas et al. 2005; Cekalinskaja 1978; Kokoška a Janovská 2009). Ostatní sloučeniny nebyly doposud z parchy saflorové izolovány. Patuletin-3'-β-D-xylofuranosid (LC-6) byl označen jako nová přírodní látka (Kolečkář et al. 2010).

Flavonoidy a jejich biologické působení

Flavonoidy tvoří velmi početnou skupinu přírodních látek. Více než 4000 látek bylo izolováno z mnoha druhů rostlin. Z potravin jsou obsaženy např. v ovoci (např. citrusy, jablka), zelenině (např. cibule, brokolice), semenech, ořeších, černém i zeleném čaji, kávě, pivu nebo červeném vínu. Denní příjem se pohybuje v závislosti na typu potravy od 50 mg do 1 g. Míra absorpce flavonoidů závisí na parametrech jako jsou: molekulová hmotnost, glykosylace, acylace, konjugace s jinými fenoly nebo rozpustnost ve vodě. Kromě antioxidačního působení vykazují také např. aktivitu antiagregační, antineoplastickou, protizánětlivou, antialergickou nebo gastroprotektivní (Cook a Samman 1996). Předpokládá se, že některé biologické účinky flavonoidů jsou odvozeny od jejich antioxidačního působení. Základem např. jejich kardioprotektivního působení je ochrana LDL před oxidací (antioxidační účinek), snížení schopnosti agregace trombocytů, navození relaxace cévní stěny a zlepšení funkcí endotelu (Maron 2004).

K základním mechanismům antioxidačního působení přírodních polyfenolů patří eliminace volných radikálů a chelatace přechodných kovů. Flavonoidy mohou také inhibovat enzymy podporující vznik radikálů.

Základem radikály zhasčícího působení flavonoidů je schopnost antioxidantu poskytnout elektron radikálu, za současného vytvoření stabilnější, méně reaktivní radikálové struktury (Kolečkář, Kubíková et al. 2008). Bylo zjištěno, že flavonoidy eliminují mnoho typů radikálů, jako např. DPPH, ABTS⁺, superoxidový nebo peroxylový radikál (Cook a Samman 1996; Jung et al. 2008).

Flavonoidy jsou schopny chelatovat přechodné kovy. Stejným mechanismem mohou působit také čajové katechiny nebo kondenzované třísloviny (Cook a Samman 1996; Kolečkář, Kubíková et al. 2008). Přechodné kovy, např. železo nebo měď mají v organismu řadu funkcí. Důležitou fyziologickou roli hrají jako kofaktory antioxidačních enzymů. Obvykle jsou navázány na proteiny, např. ferritin nebo ceruloplazmin.

Vyskytují-li se ale volně, mohou katalyzovat radikálové reakce. Jedná se např. o známou Fentonovu reakci:



Je prokázáno, že flavonoidy inhibují řadu enzymů. Jedná se např. o skupiny hydrolas, oxidoreduktas, DNA synthas, RNA polymeras nebo fosfokinas. Z hlediska antioxidačního působení flavonoidů se může uplatnit např. inhibice lipooxygenas nebo NOS (Cook a Samman 1996).

Nežádoucí účinky flavonoidů

Flavonoidy mohou způsobit určité nežádoucí účinky. Jedná se zejména o jejich možné pro-oxidační působení. Kvercetin a jiné flavonoidy při zhášecích reakcích vytváří reaktivní *o*-chinonové struktury, které mohou v dalších redoxních reakcích působit jako pro-oxidanty (Kolečkář, Kubíková et al. 2008). Z nežádoucích účinků jsou uváděny mutagení efekty, karcinogenita nebo genová toxicita (Balasundram et al. 2006).

Bylo zjištěno, že lidé konzumující více rostlinnou stravu patří k méně ohroženým populacím z hlediska rizika kardiovaskulárních chorob a rakoviny. Tento jev je dáván do souvislosti také s pravidelným přísunem přírodních polyfenolů. Bylo zjištěno, že průměrný denní příjem se u těchto lidí pohybuje u flavonolů kolem 70 mg a isoflavonů mezi 20 a 240 mg. Předpokládá se, že konzumace takových množství látek obsažených v potravinách pravděpodobně nezpůsobuje žádné nežádoucí efekty. Naproti tomu existují doplňky stravy ve kterých je toto množství překročeno více než dvacetinásobně (Skibola a Smith 2000). K lepšímu vyhodnocení možných nežádoucích účinků na lidskou populaci by bylo potřeba provést dlouhodobé klinické studie, monitorující toxické efekty flavonoidů. Takové studie v současnosti chybí. Práce, které hodnotí biologické účinky flavonoidů obvykle uzavírají, že přiměřená konzumace rostlinných extraktů bohatých na polyfenoly nebo potravin s vysokým obsahem polyfenolů jsou zdraví prospěšné.

Při aplikaci vyšších dávek flavonoidů byly prokázány také interakce s jinými léčivy. Mechanismem účinku může být např. flavonoidy způsobená indukce nebo inhibice enzymů podílejících se na metabolizaci léčiv (Galati a O'Brien 2004). Při *in vitro* hodnocení biologických účinků Pycnogenolu® bylo např. zjištěno, že tento na flavonoly bohatý extrakt zvyšuje antiagregační účinek ASA (Golanski et al. 2006).

Antioxidační analýza izolovaných látek

Pro vyhodnocení EC_{50} izolovaných látek a antioxidačních standardů (kvercetin, trolox) byl použit DPPH-SIA test (Polášek et al. 2004). Tato metoda byla původně vyvinuta pro rychlou analýzu velkých množství přírodních extraktů. Bylo proto nejprve nutné ověřit její účinnost při hodnocení antioxidační aktivity (EC_{50}) čistých substancí. Z těchto důvodů byla nejprve na pracovišti Katedry farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové vypracována studie, která hodnotila možnost využití DPPH-SIA testu při měření EC_{50} čistých látek. Antioxidační test byl aplikován na měření antioxidační aktivity skupiny 22 kumarinů. Na základě vyhodnocení vztahů mezi antioxidační aktivitou a chemickou strukturou testovaných látek a porovnáním výsledků s literaturou, byla prokázána použitelnost metody v antioxidačním hodnocení čistých substancí (Řeháková et al. 2008).

Všechny flavonoidy, kromě látky LC-1, prokázaly hodnotu EC_{50} nižší než 100 μM . Nejvyšší aktivitu prokázaly flavonoidy LC-7 ($EC_{50} = 29,9 \mu\text{M}$) a LC-3 ($EC_{50} = 33,1 \mu\text{M}$), jejichž schopnost eliminovat DPPH radikál byla téměř stejně vysoká jako u kvercetinu ($EC_{50} = 25,3 \mu\text{M}$) a troloxu ($EC_{50} = 27,8 \mu\text{M}$). Dále následovaly: LC-6 ($EC_{50} = 56,0 \mu\text{M}$), LC-2 ($EC_{50} = 76,4 \mu\text{M}$), LC-8 ($EC_{50} = 95,6 \mu\text{M}$) a (LC-1) ($EC_{50} = 769,6 \mu\text{M}$).

Pro vyhodnocení antioxidační aktivity izolovaných látek byl použit také FRAP test (Firuzi et al. 2005). Nejvyšší redukční aktivitu z izolovaných flavonoidů, vyjádřenou FRAP hodnotami v čase 4 a 60 min, prokázaly LC-7 (33,1 μM ; 65,3 μM) a LC-3 (31,6 μM ; 63,6 μM). Tyto dva flavonoidy byly vyhodnoceny jako nejúčinnější také v DPPH testu. K antioxidačně aktivním flavonoidům se řadily také LC-2 (15,1 μM ; 27,9 μM), LC-6 (28,4 μM ; 35,8 μM) a LC-8 (15,7 μM ; 32,7 μM). Flavonoidy LC-3, LC-6 a LC-7 prokázaly v obou časových intervalech vyšší FRAP hodnoty než trolox (20,4 μM ; 23,7 μM). Flavonoidy LC-2 a LC-8 prokázaly v porovnání s troloxem vyšší FRAP hodnotu pouze v čase 60 min. Flavonoid LC-1 redukční aktivitu neprokával. Žádný z izolovaných flavonoidů neprojevil ve FRAP testu tak vysokou antioxidační aktivitu jako kvercetin (46,9 μM ; 82,2 μM). Porovnáním výsledků obou testů je možno flavonoidy seřadit podle antioxidační aktivity do třech skupin: (LC-7, LC-3) > (L6, L2, L8) > L1.

Schopnost látky LC-7 eliminovat DPPH radikál byla prokázána ve studii Miliauskase et al. (2005), nicméně hodnota EC_{50} nebyla ve studii vyhodnocena.

Vysoká aktivita patuletinu LC-3 byla uvedena ve studii, která hodnotila antioxidační

účinky květů *Inula britannica*. Z květů *Inula britannica* bylo izolováno 11 flavonoidů, z nichž 8 (včetně patuletinu) prokázalo výraznou antioxidační aktivitu v DPPH testu (Park et al. 2000).

DPPH eliminační aktivita flavonoidu LC-2 byla testována ve studii Narvaez-Mastache et al. (2008). Studie uvedla, že látka je silný lapač DPPH radikálu s hodnotou $EC_{50} = 32,5 \mu\text{M}$. Tento výsledek je nižší než námi uvedená hodnota $EC_{50} = 76,4 \mu\text{M}$. Neshoda hodnot je pravděpodobně dána rozdílnou metodikou použitého DPPH testu.

Flavonoid LC-1 prokázal v DPPH testu velmi slabou schopnost eliminovat DPPH radikál. Také jiná studie vyhodnotila tento flavonoid jako antioxidačně neúčinný (Miura et al. 2002).

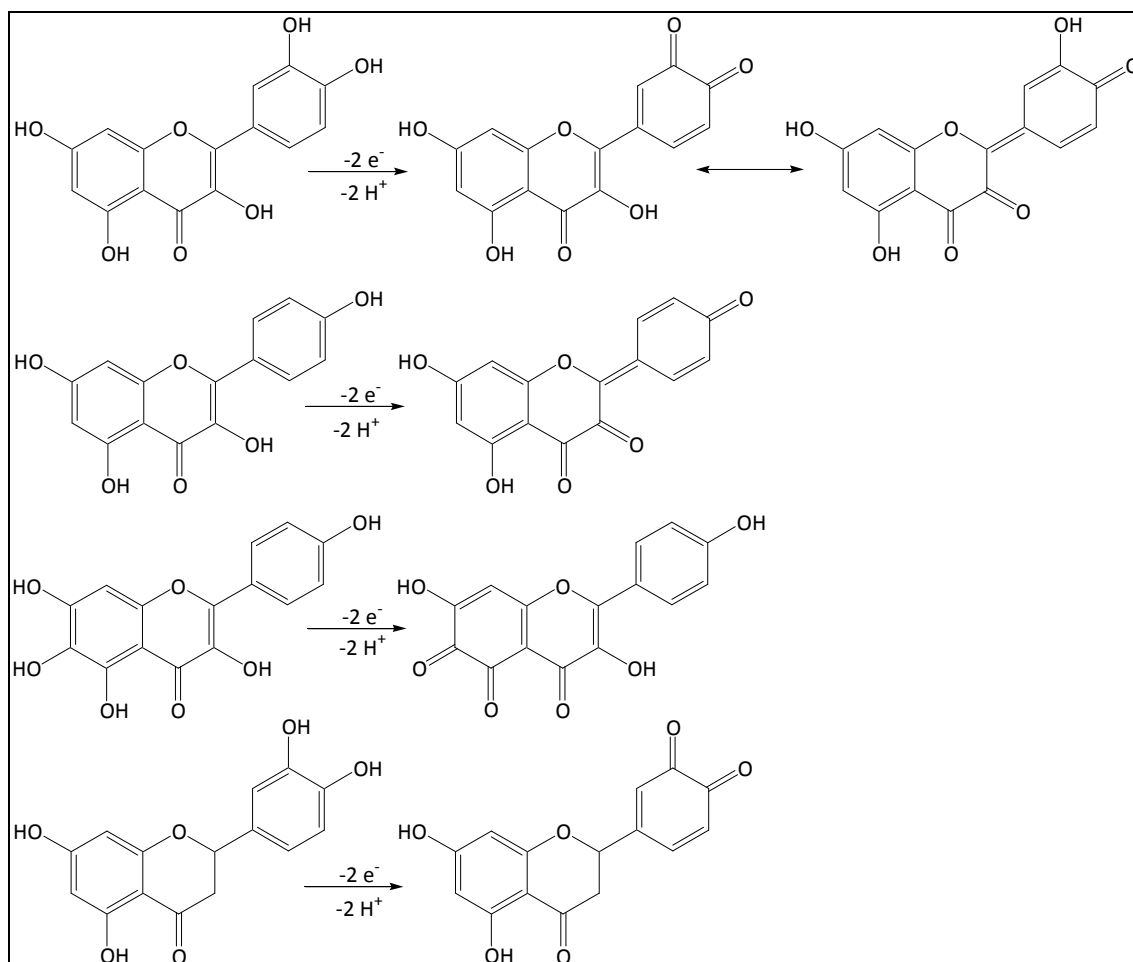
Kyselina 4-hydroxybenzoová (LC-4) byla vyhodnocena DPPH a FRAP testem jako antioxidačně neaktivní. Naproti tomu kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (LC-5) prokázala v obou testech relativně vysoké aktivity ($EC_{50} = 53,7 \mu\text{M}$; (23,3 μM ; 52,0 μM)). Tyto výsledky byly potvrzeny i dalšími studiemi, které se zabývaly hodnocením antioxidační aktivity fenolických kyselin, a které označily kyselinu 4-hydroxybenzoovou jako slabý a kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovou jako silný antioxidant (Cai et al. 2006; Villano et al. 2007).

Vztah mezi strukturou a antioxidační aktivitou flavonoidů

Řada studií se zabývala popisem vztahu antioxidační aktivity vs. struktura flavonoidů. Bylo zjištěno, že vysoká antioxidační schopnost látek závisí na strukturálních parametrech, jako jsou počet a poloha hydroxylů na B- nebo A- kruhu základního skeletu nebo kombinace hydroxylu na C-3 a oxo- skupiny na C-4 s dvojnou vazbou mezi C-2 a C-3. Antioxidační aktivita může být ovlivněna přítomností a typem cukerné složky. Methylace hydroxylů může antioxidační aktivitu snižovat (Cai et al. 2006; Soobrattee et al. 2005).

Nízkou aktivitu látky LC-1 lze vysvětlit absencí hydroxylu na C-3 a katecholového uspořádání na flavonovém skeletu. Hydroxyly v pozici C-5 a C-7 na A kruhu k antioxidační aktivitě nepřispívají (Firuzi et al. 2005). Katecholové uspořádání chybí také ještě v molekule glykosidu LC-6, ale narušil od LC-1, molekula obsahuje hydroxyl na C-3, který při reakci s radikálem umožňuje vznik stabilnější chinoidní struktury (van Acker et al. 2006). U eriodiktyolu LC-2 a jeho glykosidu LC-8 se při reakci s radikály

může uplatnit katecholové uspořádání hydroxylů na B-kruhu. Výraznou antioxidační aktivitu patuletinu LC-3 a glykosidu LC-7 lze vysvětlit přítomností všech strukturních parametrů, důležitých pro vznik stabilních flavonoidních oxidačních produktů (katecholového uspořádání na A resp. B kruhu, hydroxylu na C-3 a kombinaci oxo-skupiny na C-4 s dvojnou vazbou mezi C-2 a C-3) (Obr. 26).



Obr. 26. Různé možnosti vzniku flavonoidních struktur při radikálových reakcích

Porovnání DPPH eliminační aktivity flavonoidních aglykonů LC-2 a LC-3 s jejich korespondujícími glykosidy LC-6 a LC-8 přineslo následující výsledky. DPPH test prokázal nižší hodnotu EC_{50} u aglykonu LC-2 než jeho glykosidu LC-8 a také nižší hodnotu EC_{50} aglykonu LC-3 než jeho glykosidu LC-6. V obou případech jsou tak flavonoidní aglykony účinnějšími zhášeci DPPH radikálu v porovnání s korespondujícími glykosidy. V případě výsledků FRAP testu se jako výrazně silnější antioxidant projevil aglykon LC-3 než jeho glykosid LC-6. Antioxidační aktivita aglykonu LC-2 a jeho

glykosidu LC-8 byla přibližně stejná. V literatuře je udáváno, že glykosylace obvykle snižuje antioxidační aktivitu flavonoidů. Uvedla to např. studie, která prokázala vyšší TEAC hodnoty isoflavonoidů daidzeinu a genisteinu v porovnání s jejich korespondujícími glykosidy (Rice-Evans et al. 1996). Obecně platí, že antioxidační aktivita flavonoidů je ovlivněna jak počtem, tak typem a pozicí cukerných složek (Ioku et al. 1995).

Antiagregační analýza izolovaných látek

Existuje několik studií, které uvedly antiagregační působení taxonů z čeledí Asteroideae a Cichorioideae. Listový, stonkový a kořenový extrakt z *Chromolaena odorata* byl testován z hlediska inhibice vazby PAF k receptoru. Nejvyšší inhibiční účinek prokázal extrakt z listů, z kterého bylo následně izolováno jedenáct flavonoidů. Osm nejvíce aktivních flavonoidů inhibovalo vazbu PAF k receptoru z více než 50 % (Ling et al. 2007). Methanolový a chloroformový extrakt z listů *Artemisia dracunculus* významně inhibovaly trombocytární adhezi a agregaci na lamininem pokrytých destičkách (Shahriyary a Yazdanparast 2007). Tři flavonoidní glykosidy izolované z kvetoucí nati *Helichrysum italicum* snížily *in vitro* agregaci lidských trombocytů navozenou COL (Facino et al. 1990). Seskviterpenický lakton a čtyři flavonoidy, izolované z *Tanacetum microphyllum*, inhibovaly uvolňování TXB₂ z lidských trombocytů vyvolané kalciovým ionoforem. Nejvyšší aktivitu prokázaly flavonoidy santin a ermanin (Silván et al. 1998).

Trombocytární agregace (hodnota EC₅₀) izolovaných látek byla stanovena turbidimetrickou metodou (Born 1962). Pro srovnání byla stanovena také antiagregační aktivita standardu, kyseliny acetylsalicylové. Nejvyšší antiagregační aktivitu z izolovaných látek prokázal hispidulin (LC-1). Hodnoty EC₅₀ (μM) LC-1 pro jednotlivé agonisty byly: 1060 ± 54 pro ADP, 100 ± 24 pro COL, a 522 ± 13 pro AA. Schopnost LC-1 inhibovat agregaci navozenou COL byla téměř stejně vysoká jako v případě kyseliny acetylsalicylové, která prokázala hodnoty EC₅₀ (μM): 89 ± 10 pro COL, 18 ± 2 pro AA a agregaci navozenou ADP neovlivnila. K málo antiagregačně aktivním látkám patřily LC-2, LC-3, LC-4 a LC-5. Zbylé látky neprokázaly antiagregační účinek (Kolečkář, Brojerová et al. 2008). Antiagregační aktivita LC-1, LC-4 a LC-5 byla již v literatuře popsána (Yun-Choi et al. 1987; Bourdillat et al. 1988; Pyo et al. 2002).

Strukturní předpoklady pro vysoké antiagregační působení flavonoidů jsou kombinace dvojně vazby mezi C-2 a C-3, hydroxyly na C-3 a oxo- skupiny na C-4. Antiagregační aktivita flavonoidů naopak klesá s rostoucím počtem hydroxylyů v molekule a s glykosylací (Cook a Samman 1996).

Vliv hydroxylace a glykosylace na antiagregační působení flavonoidů potvrdila i tato studie. Antiagregační aktivitu prokázaly flavonoidy LC-2 a LC-3, zatímco od nich odvozené glykosidy LC-8 a LC-6 byly neaktivní. Nejvíce antiagregačně aktivní LC-1 je flavon s pouze třemi hydroxylovými skupinami, tedy s nejnižším počtem ze všech flavonoidů. Přesnější vyhodnocení vztahu mezi strukturou a antiagregační aktivitou izolovaných látek je problematické z důvodu jejich podobně nízké aktivity (kromě LC-1) a strukturní různorodosti (jedná se o flavon, flavanon, flavonol, flavonoidní glykosidy a fenolické kyseliny).

Kvantitativní analýza

Pro stanovení izolovaných látek byla vypracována nová analytická metoda (Stodůlka, Kolečkář et al. 2008). Metoda zahrnuje kromě optimalizovaných podmínek HPLC analýzy s UV detekcí také nejvhodnější způsob přípravy vzorků pro analýzu.

Nejvíce zastoupenou látkou v sušině byl flavonoidní glykosid LC-8 (0,574 %), následován od něj odvozeným flavonoidním aglykonem LC-2 (0,103 %). Všechny ostatní látky prokázaly hodnoty procentuálního zastoupení pod 0,1 %. Nejsilnější antioxidant (nejvyšší aktivita v obou antioxidačních testech), flavonoid LC-7, byl zastoupen v sušině z 0,067 %. Výsledky antioxidační a kvantitativní analýzy naznačují, že látky LC-7, LC-8 a LC-2 významně přispívají k vysoké antioxidační aktivitě parchy saflorové. Je pravděpodobné, že metoda je použitelná také pro analýzu ostatních fenolických látek parchy saflorové.

Závěr

Rostliny a jejich obsahové látky vykazují řadu zdraví prospěšných účinků. Některé z těchto účinků mohou být odvozeny od jejich antioxidační aktivity, která tak zůstává významným tématem vědeckých prací. Pro měření antioxidační aktivity bylo vyvinuto mnoho analytických metod, využitelných jak v *in vitro* tak *in vivo* modelech, které prokázaly vysoký antioxidační efekt mnoha přírodních látek. Řada prací prokázala vliv

struktury a její obměny na antioxidační aktivitu přírodních látek, a také od nich odvozených látek syntetických. V tématice antioxidační aktivity přírodních látek přesto zůstává řada otazníků, jako je např.: jak často, v jakém množství a v jaké formě je nejvhodnější přijímat přírodní látky; chybí dostatečné množství informací o jejich absorpci, metabolizaci a *in vivo* účinku; není dostatek údajů o případných nežádoucích efektech, popř. maximálních možných dávkách, které by nežádoucí účinky nevyvolávaly. Důležitým tématem zůstává detailnější objasnění souvislosti mezi antioxidační aktivitou látek a zjištěným biologickým účinkem.

Antioxidační test využívající zhášení DPPH radikálu a SIA se ukázal jako účinná a rychlá metoda, dobře aplikovatelná na široké spektrum vzorků. Metoda byla použita na rostliny čeledí Asteroideae a Cichorioideae, které doposud nebyly v takto širokém rozsahu analyzovány. Metoda umožnila rychlé vyhodnocení nejvíce aktivních vzorků (screening) a byla použita také během celé fytochemické studie s cílem získání nejvíce antioxidačně aktivních látek. Bylo prokázáno, že původně screeningová metoda umožňuje relevantní vyhodnocení EC_{50} izolovaných látek a je tak použitelná i pro odvozování vztahů mezi strukturou a aktivitou testovaných sloučenin.

Výsledkem fytochemické studie byla izolace 8 látek (včetně nově objevené přírodní látky) z nejvíce antioxidačně aktivního ethyl-acetátového extraktu parchy saflorové. Všechny látky byly podrobeny antioxidačnímu DPPH testu a FRAP testu. V obou testech prokázaly nejvyšší antioxidační aktivitu látky LC-3 a LC-7. Na základě výsledků antioxidační analýzy získaných extraktů a izolovaných látek, kvantitativní analýzy, a informací z literatury se dá předpokládat, že k vysoké antioxidační aktivitě rostliny přispívají zejména flavonoidy LC-7, LC-8 a LC-2. U vysoce antioxidačně aktivního flavonoidu LC-3 je příspěvek k celkové aktivitě rostliny problematický, z důvodu jeho nízkého procentuálního zastoupení v rostlině. Z hlediska komplexního vyhodnocení antioxidační aktivity izolovaných látek by bylo vhodné provedení dalších antioxidačních testů.

Bylo zjištěno, že některé izolované látky prokázaly antiagregační aktivitu, která nebyla doposud u parchy saflorové popsána. Tato aktivita byla nicméně vyhodnocena pouze u izolovaných látek (nejvyšší antiagregační aktivitu prokázal flavonoid LC-1). Celkový antiagregační rozbor rostliny, včetně připravených extraktů, proveden nebyl.

Výsledky provedených biologických testů prokázaly, že nejvíce antiagregačně aktivní hispidulin LC-1 nevykazuje antioxidační aktivitu. Ačkoliv je v literatuře uvedeno, že velikost antiagregační aktivity je podmíněna podobnými strukturními předpoklady jako v případě antioxidační aktivity (Cook a Samman 1996), výsledky této studie to plně nepotvrdily. V souladu s literaturou tato studie prokázala, že antiagregační aktivita klesá s počtem hydroxylů, zatímco u aktivity antioxidační je tomu naopak.

Je známo, že parcha saflorová disponuje řadou biologických účinků, nicméně, doposud nebyla provedena studie, která by komplexně hodnotila její antioxidační potenciál tak, jako tato práce. Získané výsledky ukazují na možné budoucí uplatnění parchy saflorové v prevenci nebo léčbě kardiovaskulárních problémů.

7. ABSTRAKT

Rostliny a jejich obsahové látky vykazují řadu zdraví prospěšných aktivit, včetně např. kardioprotektivního, protizánětlivého nebo antineoplastického účinku. Je známo, že řada těchto účinků je odvozena nebo souvisí s jejich antioxidačním působením. 87 extraktů připravených z různých částí rostlin čeledi Asteraceae (podčeledí Asteroideae a Cichorioideae) bylo podrobena antioxidačnímu DPPH testu využívajícího SIA metody. DPPH radikály eliminační aktivita všech testovaných vzorků byla popsána hodnotou EC_{50} . Na základě získaných výsledků byla pro následnou fytochemickou studii zvolena droga listy parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*) (hodnota EC_{50} extraktu z listů byla $0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$). Z antioxidačně nejaktivnějšího ethylacetátového odparku ($EC_{50} = 0,038 \text{ mg.ml}^{-1}$) bylo izolováno osm látek (šest flavonoidů a dvě fenolické kyseliny). Látky byly identifikovány jako hispidulin (LC-1), eriodiktyol (LC-2), patuletin (LC-3), kyselina 4-hydroxybenzoová (LC-4), kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (LC-5), patuletin-3'- β -xylofuranosid (LC-6), 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl- β -D-glukopyranosid) (LC-7), a eriodiktyol-7- β -glukopyranosid (LC-8). Flavonoid LC-6 byl označen jako nová přírodní látka. Látky byly podrobena antioxidačnímu DPPH testu (hodnota EC_{50}) a FRAP testu (výsledky jsou uvedeny jako FRAP hodnoty v čase 4 a 60 min). Antioxidační aktivity látek byly porovnány se známými antioxidanty, kvercetinem a troloxem. Oba testy vyhodnotily jako nejvíce účinný antioxidant flavonoid LC-7. Hodnota EC_{50} látky LC-7 byla $29,9 \mu\text{M}$. Hodnota EC_{50} kvercetinu byla $25,3 \mu\text{M}$, troloxu $27,8 \mu\text{M}$. FRAP hodnoty látky LC-7 v čase 4 a 60 min byly $33,1 \mu\text{M}$ resp. $65,3 \mu\text{M}$. FRAP hodnoty kvercetinu byly $46,9 \mu\text{M}$ resp. $82,2 \mu\text{M}$, troloxu $20,4 \mu\text{M}$ resp. $23,7 \mu\text{M}$. Látky byly popsány také z hlediska antiagregační aktivity. Jako agregační agonisté byly použity ADP, COL a AA. Antiagregační aktivita látek a standardu kyseliny acetylsalicylové byla pro jednotlivé agonisty popsána hodnotou EC_{50} . Nejúčinnější látkou byl antiagregačním testem vyhodnocen flavonoid LC-1. Hodnoty EC_{50} (μM) látky LC-1 byly: 1060 ± 54 pro ADP, 100 ± 24 pro COL, a 522 ± 13 pro AA. Hodnoty EC_{50} (μM) pro kyselinu acetylsalicylovou jsou: 89 ± 10 pro COL, 18 ± 2 pro AA. Z výsledků provedených testů byly odvozeny vztahy mezi chemickou strukturou a antioxidační/antiagregační aktivitou látek. Izolované látky parchy saflorové byly kvantitativně stanoveny nově vyvinutou HPLC metodou. Nejvyšší procentuální zastoupení prokázal flavonoid LC-8, který byl obsažen v sušině v 0,574 %. Studie uzavírá, že parcha saflorová je vhodnou rostlinou pro další

studie, jejichž cílem může být navržení nového rostlinného preparátu použitelného při poruchách kardiovaskulárního systému.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, antiagregační aktivita, *Leuzea carthamoides*, DPPH test, polyfenoly, flavonoidy, fenolické kyseliny, stanovení.

8. ABSTRACT

Plants and their secondary metabolites exhibit a wide range of biological effects including e.g. cardioprotective, antiinflammatory, or anticancer activity. It is also known that these effects are in many cases derived from antioxidant activity. In our study, 87 extracts from various parts of plants from European members of family Asteraceae (subfamilies Asteroideae and Cichorioideae) were assayed for radical scavenging activity by means of DPPH test using the SIA method. DPPH radical scavenging activity of all tested plant extracts was evaluated according to parameter EC_{50} . The leaves of *Leuzea carthamoides* ($EC_{50} = 0,046 \text{ mg.ml}^{-1}$) were chosen as the most promising sample for the subsequent phytochemical study with the purpose to isolate antioxidant active compounds. Eight natural compounds were isolated (six flavonoids and two phenolic acids) from the most antioxidant active ethyl-acetate extract ($EC_{50} = 0,038 \text{ mg.ml}^{-1}$): hispidulin (LC-1), eriodiktyol (LC-2), patuletin (LC-3), 4-hydroxybenzoic acid (LC-4), 3,4-dihydroxybenzoic acid (LC-5), patuletin-3'- β -xylofuranoside (LC-6), 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside) (LC-7), and eriodiktyol-7- β -glukopyranoside (LC-8). Flavonoid LC-6 was indicated as a new natural compound. Antioxidant activity of isolated compounds was evaluated by DPPH test (EC_{50}) and ferric reducing antioxidant power test (FRAP values at 4 and 60 minutes) and compared with trolox and quercetin. Both tests evaluated flavonoid LC-7 as the most antioxidant active compound. EC_{50} value for LC-7 was $29,9 \mu\text{M}$. EC_{50} value for quercetin was $25,3 \mu\text{M}$ and for trolox was $27,8 \mu\text{M}$. FRAP values for LC-7 in time interval 4 and 60 min were $33,1 \mu\text{M}$ resp. $65,3 \mu\text{M}$. FRAP values for quercetin were $46,9 \mu\text{M}$ resp. $82,2 \mu\text{M}$ and for trolox were $20,4 \mu\text{M}$ resp. $23,7 \mu\text{M}$. In addition, *in vitro* antiplatelet activity of isolated compounds was determined in human platelet rich plasma. AA, ADP and COL were used as agonists of platelet aggregation. EC_{50} values of compounds and the standard ASA were evaluated. The highest platelet inhibition exhibited compound LC-1. EC_{50} (μM) values for LC-1 were: 1060 ± 54 for ADP, 100 ± 24 for COL, and 522 ± 13 for AA. EC_{50} values for ASA were: 89 ± 10 for COL and 18 ± 2 for AA. The structure/antioxidant and structure/antiplatelet activity relationships of isolated compounds are presented. New HPLC method for quantitative determination of *L. carthamoides* compounds is also enclosed. From the isolated compounds, the highest content was determined for flavonoid LC-8 (0,574 % of dry matter). The study evaluated *L. carthamoides* as a promising plant for future studies with the purpose to

propose a new cardioprotective preparation.

Keywords: antioxidant effect, antiplatelet effect, *Leuzea carthamoides*, DPPH test, polyphenols, flavonoids, phenolic acid, determination.

9. LITERATURA

ANDRADE F. D. P., SANTOS L. C., DOKKEDAL A. L. a VILEGAS W.: Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. *Phytochemistry* 1999 51:411-415.

ALI H. a HALIM E. M.: Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from *Curcuma longa* L. and partially purified produkt from *Aroma augusta* L. in streptozocin induced diabetes. *Ind. J. Clin. Biochem.* 2002 17:33-34.

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

BAYNES J. W. a THORPE S. R.: Role of oxidative stress in diabetic complications. A new prespective of an old paradigm. *Diabetes* 1999 48:1-9.

BISKUP E. a LOJKOWSKA E.: Evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin extracts. 54 th Annual Plant Research, Helsinki, Finland. Abstr. Pap.: *Planta Medica* 2006 72:961-1089.

BOESCH-SAADATMANDI C., POSPISSIL R. T., GRAESER A. C., CANALI R., BOOMGAARDEN I., DOERING F., WOLFFRAM S., EGERT S., MUELLER M. J. a RIMBACH G.: Effect of quercetin on paraoxonase 2 levels in RAW264.7 macrophages and in human monocytes-role of quercetin metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 2009 10:4168-4177.

BONDET V., BRAND-WILLIAMS W. a BERSET C.: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Sci. Technol.* 1997 30:609-615.

BORN G. V. R.: Aggreagation of blood platelets by adenosinediphosphate and its reversal. *Nature* 1962 194:927-929.

BOURDILLAT B., DELAUTIER D., LABAT C., BENVENISTE J., POTIER P. a BRINK C.: Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels. *Eur. J. Pharmacol.* 1988 147:1-6.

CAI Y. Z., MEI S., JIE X., LUO Q. a CORKE H.: Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006 78:2872-2888.

CAI Y. Z., SUN M. a CORKE H.: Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* 2003 51:2288-2294.

CANDAN F., UNLU M., TEPE B., DAFERERA D., POLISSIOU M., SÖKMEN A. a AKPULAT H. A.: Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of

- Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteroideae). *J. Ethnopharmacol.* 2003 87:215-220.
- CAO G., SOFIC E. a PRIOR R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997 22:749-760.
- CERIELLO A., BORTOLOTTI N. a CRESCENTINI A.: Antioxidant defenses are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin dependent diabetic subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998 28:329-333.
- CEKALINSKAJA V. V.: II. Phenolic compounds of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. *Vestsi Akademii Navuk BSSR, Seryya Biyalagichnykh Navuk* 1978 2:14-18.
- CHIA Y. C., CHEN K. S., CHANG Y. L., TENG C. M. a WU Y. C.: Antiplatelet actions of aporphinoids from Formosan plants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999 9:3295-3300.
- CHO J., KIM H. M., RYU J. H., JEONG Y. S., LEE Y. S. a JIN C.: Neuroprotective and antioxidant effects of the ethyl acetate fraction prepared from *Tussilago farfara* L. *Biol. Pharm. Bull.* 2005 28:455-460.
- COOK N. C. a SAMMAN S.: Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996 7:66-76.
- COS P., DE BRUYNE T., HERMANS N., APERS S., BERGHE D. V. a VLIETINCK A. J.: Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr. Med. Chem.* 2003 11:1345-1359.
- DELLAGRECA M., MONACO P., PINTO G., POLLIO A., PREVITERA L. a TEMUSSI F.: Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2001 67:352-359.
- DUARTE N., LAGE H., ABRANTES M. a JOSÉ FERREIRA M. U.: Phenolic compounds as selective antineoplastic agents against multidrug-resistant human cancer cells. *Planta Med.* 2010 in press.
- DU TROIT R., VOLSTEEDST Y. a APOSTOLIDES Z.: Comparison of the antioxidant of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001 166:63-69.
- EGASHIRA K.: Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ. J.* 2002 66:529-533.
- ESPIN J. C., SOLER-RIVAS C. a 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.* 2000 48:648-656.

ESPOSITO K., NAPO F. a MARFELLA R.: Inflammatory cytokine concentration are acutely increased by hyperglycemia in humans. Role of oxidative stress. *Circulation* 2002 106:2067-2072.

FACINO R. M., CARINI M., FRANZOI L., PIROLA O. a BOSISIO E.: Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). *Pharmacol. Res.* 1990 22:709-721.

FIRUZI O., LACANNA A., PETRUCCI R., MARROSU G. a SASO L.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta* 2005 1721:174-184.

GALATI G. a O'BRIEN P. J.: Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2004 37:287-303.

GIUGLIANO D., PAOLISSO G. a CERIELLO A.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabet. Care* 1996 19:257-267.

GOLANSKI J., MUCHOVA J., GOLANSKI R., DURACKOVA Z., MARKUSZEWSKI L. a WATALA C.: Does pycnogenol intensify the efficacy of acetylsalicylic acid in the inhibition of platelet function? *In vitro* experience. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2006 60:316-321.

HARDELAND R.: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005 27:119-130.

HARTUS A., SRIDEVI D. a ISHWARLAL J.: Oxidative stress, alpha-tocopherol: therapy, and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2002 4:373-380.

HOULT J. R. a PAYÁ M.: Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* 1996 27:713-722.

IOKU K., TSUSHIDA T., TAKEI Z., NAKATANI N. a TERAOKA J.: Antioxidant activity of quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1995 1234:99-104.

JAYAPRAKASAM B. a NAIR M. G.: Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Tetrahedron.* 2003 59:841-849.

JAYARAMAN J., VEERAPPAN M. a NAMASIVAYAM N.: Potential beneficial effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced

hepatotoxicity. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009 61:1383-1390.

JUNG H. A., JEONG D. M., CHUNG H. Y., LIM H. A., KIM J. Y., YOON N. Y. a CHOI J. S.: Re-evaluation of the antioxidant prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 2008 31:908-915.

KAMPA M., NIFLI A. P., NOTAS G. a CASTANAS E.: Polyphenols and cancer cell growth. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2007 159:79-113.

KANG W. S., LIM I. H., YUK D. Y., CHUNG K. H., PARK J. B., YOO H. S. a YUN Y. P.: Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb. Res.* 1999 96:229-237.

KIM D. K.: Antioxidative components from the aerial parts of *Lactuca scariola* L. *Arch. Pharm. Res.* 2001 24:427-430.

KIM T. W. a YANG K. S.: Antioxidative effects of *Cichorium intybus* root extract on LDL (low density lipoprotein) oxidation. *Arch. Pharm. Res.* 2001 24:431-436.

KLEJDUS B., ŠTĚRBOVÁ D., STRATIL P. a KUBÁŇ V.: Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after twodimensional solid phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 2001 450:81-97.

KNYSOVA V. V., IVANOVA I. L., KOZLOVSKAJA E. P. a LOENKO J. N.: Influence of biologically active substance from marine organisms on the system „lipid peroxidation-antioxidant defenses“ in gastroduodenitis associated with hyperlipidemia. *Patol. Fyziol Exp. Terap.* 2002 2:27-29.

KOKOŠKA L. a JANOVSÁ D.: Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. *Phytochemistry* 2009 70:842-855.

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., OPLETAL L., JUN D. a KUČA K.: Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození. *Čes. Slov. Farm.* 2007 56:73-76.

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., ŘEHÁKOVÁ Z., KUBÍKOVÁ K., ČERVENKA F., KUČA K., JUN D., HRONEK M., OPLETALOVÁ V. a OPLETAL L.: *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug. Chem. Toxicol.* 2008 31:27-35.

KOLEČKÁŘ V., JUN D., OPLETAL L., POLÁŠEK M. a KUČA K.: Assay of radical scavenging activity of antidotes against chemical warfare agents by DPPH test using sequential injection technique. *J. Appl. Biomed.* 2007 5:81-84.

- KOLEČKÁŘ V., KUBÍKOVÁ K., ŘEHÁKOVÁ Z., KUČA K., JUN D., JAHODÁŘ L. a OPLETAL L.: Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008 8:436-447.
- KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., BROJEROVÁ E., ŘEHÁKOVÁ Z., ČERVENKA F., KUBÍKOVÁ K., KUČA K., JUN D., POLÁŠEK M., KUNEŠ J. a JAHODÁŘ L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteroideae and Cichorioideae. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2008 23:218-224.
- KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., MACÁKOVÁ K., JAHODÁŘ L., JUN D., KUNEŠ J. a KUČA K.: New antioxidant flavonoid isolated from *Leuzea carthamoides*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2010 25:143-145.
- LEI D., CHAN CH. P., WANG Y. J., WANG T. M., LIN B. R., JUANY CH. H., LEE J. J., CHEN H. M., JENG J. H. a CHÁNY M. CH.: Antioxidative and antiplatelet effects of aqueous inflorescence *Piper betle* extract. *J. Agric. Food Chem.* 2003 51:2083-2088.
- LING S. K., PISAR M. M. a MAN S.: Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonist activity of the methanol extracts and isolated flavonoids from *Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson. *Biol. Pharm. Bull.* 2007 30:1150-1152.
- LÜLLMAN H., MOHR K. a WEHLING M.: Farmakologie a toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 694 s.
- MANACH C., MAZUR A. a SCALBERT A.: Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* 2005 16:77-84.
- MANCUSO C., PANI G. a CALABRESE V.: Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep.* 2006 11:207-213.
- MARINHO H. S., ANTUNES F. a PINTO R. E.: Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.* 1997 22:871-883.
- MARON D. J.: Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2004 6:73-78.
- MARTÍNKOVÁ J., CHROBÁK L. a KVĚTINA J.: Hemostáza a její ovlivnění farmaky. 2. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1986.
- MASOPUST J., BARTŮŇKOVÁ J., GOETZ P., CHROMÝ V., JABOR A., JIRÁSEK J. E., MAREŠ J., PALIČKA V., PELOUCH V., PRŮŠA R., ŠTERN P. a ZIMA T.: *Patobiochemie buňky*.

<http://www.zdravcentra.cz/?act=k-10&did=337>, UK v Praze, 2. lékařská fakulta. (2005).

MILIAUSKAS G., VAN BEEK T. A., DE WAARD P., VENSKUTONIS R. P. a SUDHOOLTER E. J. R.: Identification of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by Means of LC-DAD-SPE-NMR. *J. Nat. Prod.* 2005 68:168-172.

MILIAUSKAS G., VENSKUTONIS P. R. a VAN BEEK T. A.: Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004 85:231-237.

MIURA K., KIKUZAKI H. a NAKATANI N.: Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J. Agric. Food Chem.* 2002 50:1845-1851.

MOJŽIŠOVÁ G. a KUČHTA M.: Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol. Res.* 2001 50:529-535.

MUN'IM A., NEGISHI O. a OZAWA T.: Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003 67:410-414.

NAGAO T., ABE F., KINJO J. a OKABE H.: Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* BRIQ. and consideration of structure-activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.* 2002 25:875-879.

NANJO F., GOTO K., SETO R., SUZUKI M., SAKAI M. a HARA Y.: Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 1996 21:895-902.

NARVÁEZ-MASTACHE J. M., NOVILLO F. a DELGADO G.: Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 2008 69:451-456.

NIEUWENHUIS H. K., AKKERMAN J. W. N. a SIXMA J. J.: Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: Studies on one hundred six patients. *Blood* 1987 70:620-623.

OEZGEN U., MAVI A., TERZI Z., COSKUN M. a YILDIRIM A. T.: Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some Asteroideae species. *J. Pharm. Sci.* 2004 1:203-216.

OPLETAL L., SOVOVÁ M., DITTRICH M., SOLICH P., DVOŘÁK J., KRÁTKÝ F., CEROVSKÝ J. a HOFBAUER J.: Fytoterapeutické aspekty onemocnění oběhového systému 6. *Leuzea*

- carthamoides* (WILLD.) DC.: stav výzkumu a možnosti využití taxonu. *Čes. Slov. Farm.* 1997 46:247-255.
- PACKER L., RIMBACH G. a VIRGILI F.: Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic. Biol. Med.* 1999 27:704-724.
- PACKER L., WITT E. H. a TRITSCHLER H. J.: Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 1995 19:227-250.
- PAOLISSO G., AMORE A. a VOLPE C.: Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin dependent (type 2) diabetic patients. *Metab. Clin. Exp.* 1994 43:1426-1429.
- PARK E. J., KIM Y. a KIM J.: Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod.* 2000 63:34-36.
- PASHKOW F. J., WATUMULL D. G. a CAMPBELL C. L.: Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 2008 101:58-68.
- PAULOVÁ H., BOCHORAKOVÁ H. a TÁBORSKÁ E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem. Listy* 2004 98:174-179.
- PETERSEN M. a SIMMONDS M. S. J.: Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003 62:121-125.
- POLÁŠEK M., SKÁLA P., OPLETAL L. a JAHODÁŘ L.: Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004 379:754-758.
- PYO M. K., KOO Y. K. a YUNCHOI H. S.: Anti-platelet effect of the phenolic constituents isolated from the leaves of *Magnolia odorata*. *Nat. Prod. Sci.* 2002 8:147-151.
- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M. a RICE-EVANS C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999 26:1231-1237.
- RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., BOLWELL P. G., BRAMLEY P. M. a PRIDHAM J. B.: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 1995 22:375-383.
- RICE-EVANS C. A., MILLER N. J. a PAGANGA G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996 20:933-956.

- ŘEHÁKOVÁ Z., KOLEČKÁŘ V., ČERVENKA F., JAHODÁŘ L., SASO L., OPLETAL L., JUN D. a KUČA K.: DPPH radical scavenging activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues measured by SIA method. *Tox. Mech. Met.* 2008 18:413-418.
- SHAHRIYARY L. a YAZDANPARAST R.: Inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion by *Artemisia dracunculus* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2007 114:194-198.
- SILVÁN A. M., ABAD M. J., BERMEJO P. a VILLAR A.: Effects of compounds extracted from *Tanacetum microphyllum* on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med.* 1998 64:200-203.
- SKIBOLA C. F. a SMITH M. T.: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 2000 29:375-383.
- SLAVIN J.: Why whole grain are protective: biological mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 2003 62:129-134.
- SOBRATTEE M. A., NEERGHEEN V. S., LUXIMON-RAMMA A., ARUOMA O. I. a BAHORUN T.: Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.* 2005 579:200-213.
- STODŮLKA P., KOLEČKÁŘ V., JUN D., KUČA K., ŘEHÁKOVÁ Z., KUBÍKOVÁ K., JAHODÁŘ L., KUNEŠ J. a OPLETAL L.: High-performance liquid chromatography analysis of four *Leuzea carthamoides* flavonoids. *J. Chromatogr. Sci.* 2008 46:162-164.
- SUCHOPÁR J.: *Remedia compedium*. 2. vyd. Praha: Panax, 1997, 616 s.
- ŠTÍPEK S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. (Štípek S. ed.) Grada, Praha, 2000.
- TENG C. M. a KO F. N.: Antiplatelet agents isolated from medicinal plants. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1998 102:211-225.
- TAKENAKA T. a TAKENAKA Y.: Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein. *Foods Food Ingred.* 2003 208:122-125.
- TAN D. X., MANCHESTER L. C., REITER R. J., QI W. B., KARBOWNIK M. a CALVO J. R.: Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 2000 9:137-159.
- TOMKIN G. H.: Diabetic vascular disease and the rising star of protein kinase C. *Diabetologia* 2001 44:657-658.

- TROJAN S., HRACHOVINA V., MAREŠOVÁ D., ŠLAPETOVÁ V. a TRÁVNÍČKOVÁ E.: Nárys fyziologie člověka - sešit 1 B. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1994, 170 s.
- URSINI F., MAIORINO M., BRIGELIUS-FLOHE R., AUMANN K. D., ROVERI A., SCHOMBURG D. a FLOHE L.: Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 1995 252:38-53.
- VAN ACKER S. A., DE GROOT M. J., VAN DEN BERG D. J., TROMP M. N., DONNE OP DEN KELDER G., VAN DER VIJGH W. J. a BAST A.: A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 1996 9:1305-1312.
- VAYA J. a AVIRAM M.: Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents* 2001 1:99-118.
- VILLANO D., FERNANDEZ-PACHON M. S., MOYA M. L., TRONCOSO A. M. a GARCIA-PARRILLA M. C.: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007 71:230-235.
- WILLIAMSON G. a MANACH C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005 81:243-255.
- WOLFF S. P., JUANY Y. Y. a HUNT J. V.: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 1991 10:339-352.
- XIE Y. Y., YUAN D., YANG J. Y., WANG L. H. a WU C. F.: Cytotoxic activity of flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* on human colon cancer Colon205 cells. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2009 11:771-778.
- YUN-CHOI H. S., KIM J. H. a LEE J. R.: Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, III. *J. Nat. Prod.* 1987 50:1059-1064.
- ZAKARIA-RUNGKAT F. a NARUHMANN P. E.: Antioxidant and immunoenhancement activities of ginger (*Zingiber officinale*) extracts and compounds *in vitro* and *in vivo* mouse and human system. *Nutraceut. Food* 2003 8:96-104.
- ZHANG X., HUNG T. M., PHUONG P. T., NGOC T. M., MIN B. S., SONG K. S., SEONG Y. H. a BAE K.: Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* 2006 29:1102-1108.
- ZHOU K., YIN J. J. a YU L.: ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chem.* 2006 95:446-457.

10. SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ

Práce vztahující se k disertační práci

Postery a abstrakty

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a JUN D.: Assay of radical scavenging activity of plants of family Asteroideae and Cichorioideae: screening study using SIA and on-line HPLC method. Book of Abstr.: Jahrestagung – Joint Meeting 2004 (Czech Pharmaceutical Society – Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft-Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft), October 6-9, 2004, Regensburg-Germany, p. 91.

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., BROJEROVÁ E., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a JUN D.: *Leuzea carthamoides* as a prospective antioxidation active taxon of family Asteroideae. Abstr.: The 1st international mediterranean pharmacy congress, october 28-31, 2005 Mersin-Turkey. *J. Sci. Technol.* 2005 1:126.

BROJEROVÁ E., KOLEČKÁŘ V., JUN D., OPLETAL L. a JAHODÁŘ L.: Antiplatelet activity of plants of the families Asteroideae and Cichorioideae. Abstr.: The 1st international mediterranean pharmacy congress, october 28-31, 2005 Mersin-Turkey. *J. Sci. Technol.* 2005 1:124.

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., BROJEROVÁ E., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a JUN D.: Antioxidační aktivita rostlin čeledí Asteroideae a Cichorioideae: screeningová studie využívající SIA a on-line HPLC metody. Abstr.: Hradecký den léčivých rostlin, Hradec Králové, *Čes. Slov. Farm.* 2005 54:243.

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., JUN D., OPLETAL L., JAHODÁŘ L., POLÁŠEK M. a HRONEK M.: Antioxidační a trombocytárně antiagregační aktivita látek taxonu *Leuzea carthamoides*. Sborník referátů: 34. konference Syntéza a analýza léčiv, 12.-14. září 2005, Brno, s. 79.

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., OPLETAL L., ŘEHÁKOVÁ Z., KUBÍKOVÁ K., ČERVENKA F., KUNEŠ J., JUN D., JAHODÁŘ L. a POLÁŠEK M.: Antioxidative and antiaggregating flavonoids from *Leuzea carthamoides*. Book of abstr.: DPhG Jahrestagung – Joint Meeting, October 4-7, 2006, Marburg-Germany, p. 104.

ŘEHÁKOVÁ Z., JAHODÁŘ L., BROJEROVÁ E., KOLEČKÁŘ V. a KARLÍČKOVÁ J.: Antiagregační a antioxidační aktivita latexu získaného z *Croton lechleri*

(Euphorbiaceae). Abstr.: Hradecký den léčivých rostlin, Hradec Králové, *Čes. Slov. Farm.* 2005 54:243.

KUBÍKOVÁ K., OPLETAL L., KOLEČKÁŘ V., POLÁŠEK M. a JAHODÁŘ L.: Antioxidační aktivita vybraných taxonů oddělení eumycota rostoucích na teritoiriu ČR. Sborník referátů: 34. konference Syntéza a analýza léčiv, 12.-14. září 2005, Brno, s. 84.

KUBÍKOVÁ K., OPLETAL L., KOLEČKÁŘ V., POLASEK M. a JAHODÁŘ L.: Free radical scavenging activity of extracts from fruiting bodies of fungi *Ganoderma applanatum*. Book of Abstr.: DPhG Jahrestagung – Joint Meeting, October 4-7, 2006, Marburg-Germany, p. 105.

Ústní prezentace

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a JUN D.: Assay of radical scavenging activity of plants of family Asteroideae and Cichorioideae: screening study using SIA and on-line HPLC method. Book of Abstr.: Jahrestagung – Joint Meeting 2004 (Czech Pharmaceutical Society – Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft-Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft), October 6-9, 2004, Regensburg-Germany, p. 91.

Publikace v českých časopisech

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., MACÁKOVÁ K., ŘEHÁKOVÁ Z., BROJEROVÁ E., KUČA K., JUN D. a JAHODÁŘ L.: Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chem. Listy* 2010 *In press*

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., OPLETAL L., JUN D. a KUČA K.: Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození. *Čes. Slov. Farm.* 2007 56:73-76.

Publikace v zahraničních časopisech

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., MACÁKOVÁ K., JAHODÁŘ L., JUN D., KUNEŠ J. a KUČA K.: New antioxidant flavonoid isolated from *Leuzea carthamoides*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2010 25:143-145. (IF = 1,421)

KOLEČKÁŘ V., KUBÍKOVÁ K., ŘEHÁKOVÁ Z., KUČA K., JUN D., JAHODÁŘ L. a OPLETAL L.: Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008 8:436-447. (IF = 3,132)

KOLEČKÁŘ V., BROJEROVÁ E., ŘEHÁKOVÁ Z., KUBÍKOVÁ K., ČERVENKA F., KUČA K., JUN D., HRONEK M., OPLETALOVÁ V. a OPLETAL L.: *In vitro* antiplatelet activity of flavonoids from *Leuzea carthamoides*. *Drug Chem. Toxicol.* 2008 31:27-35. (IF = 1,409)

KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., BROJEROVÁ E., ŘEHÁKOVÁ Z., ČERVENKA F., KUBÍKOVÁ K., KUČA K., JUN D., POLÁŠEK M., KUNEŠ J. a JAHODÁŘ L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteroideae and Cichorioideae. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2008 23:218-224. (IF = 1,421)

STODŮLKA P., KOLEČKÁŘ V., JUN D., KUČA K., ŘEHÁKOVÁ Z., KUBÍKOVÁ K., JAHODÁŘ L., KUNEŠ J. a OPLETAL L.: High-performance liquid chromatography analysis of four *Leuzea carthamoides* flavonoids. *J. Chromatogr. Sci.* 2008 46:162-164. (IF = 1,135)

ŘEHÁKOVÁ Z., KOLEČKÁŘ V., ČERVENKA F., JAHODÁŘ L., SASO L., OPLETAL L., JUN D. a KUČA K.: DPPH radical scavenging activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues measured by SIA method. *Tox. Mech. Meth.* 2008 18:413-418. (IF = 0,426)

ČERVENKA F., KOLEČKÁŘ V., ŘEHÁKOVÁ Z., JAHODÁŘ L., KUNEŠ J., OPLETAL L., HYŠPLER R., JUN D. a KUČA K.: Evaluation of natural substances from *Evolvulus alsinoides* L. with the purpose to determined their antioxidant potency. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2008 23:574-578. (IF = 1,421)

Ostatní práce

Postery a abstrakty

ČERVENKA F., VÍCHOVÁ P., KOLEČKÁŘ V., POUR M., OPLETAL L. a JAHODÁŘ L.: *Evolvulus alsinoides* – pharmacobotanical evaluation. Book of Abstr.: Jahrestagung – Joint Meeting 2004 (Czech Pharmaceutical Society – Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft-Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft), October 6-9, 2004, Regensburg-Germany, p. 89.

KOLEČKÁŘ V., JUN D., OPLETAL L., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a KUČA K.: Free radical scavenging activity of antidotes against CWA currently used in the Czech armed forces. Book of abstr.: TG-004 Meeting, 23-26 May 2005, Hradec Králové, p. 42.

ČERVENKA F., ŘEHÁKOVÁ Z., BROJEROVÁ E., KOLEČKÁŘ V., VYTLAČILOVÁ J. a JAHODÁŘ L.: *Evolvulus alsinoides* – Phytochemical analysis. Book of abstr.: DPhG Jahrestagung – Joint Meeting, October 4-7, 2006, Marburg-Germany, p. 106.

KUČA K., KOLEČKÁŘ V., JUN D., MUSÍLEK K. a BARTOŠOVA L.: Structure-activity relationship for reactivators of cyclosarin-inhibited acetylcholinesterase. Book of Abstr.: The 9th symposium on protection against chemical and biological warfare agents, May 21-25, 2007, Göteborg-Sweden, p. 200.

KOLEČKÁŘ V., STODŮLKA P., JUN D. a KUČA K.: Příprava nových biskvarterních reaktivátorů acetylcholinesterasy. Abstr.: Konference pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii. Liblice, *Chem. Listy* 2006 100:1018.

Ústní prezentace

KOLEČKÁŘ V., JUN D., OPLETAL L., POLÁŠEK M., JAHODÁŘ L. a KUČA K.: Free radical scavenging activity of antidotes against CWA currently used in the Czech armed forces. Book of Abstr.: TG-004 Meeting, 23-26 May 2005, Hradec Králové, p. 42.

Publikace v českých časopisech

KOLEČKÁŘ V., JUN D., OPLETAL L., JAHODÁŘ L. a KUČA K.: Assay of radical scavenging activity of antidotes against chemical warfare agents by DPPH test using sequential injection technique. *J. Appl. Biomed.* 2007 5:81-84.

Publikace v zahraničních časopisech

JUN D., KUČA K., PÍCHA J., KOLEČKÁŘ V. a MAREK J.: Potency of novel oximes to reactivate sarin inhibited human cholinesterases. *Drug Chem. Toxicol.* 2007 31:1-9. (IF = 1,409)

KUČA K., CABAL J., JUN D. a KOLEČKÁŘ V.: *In vitro* comparison of two most promising H-oximes (HI-6 and HLö-7) and currently commercially available reactivators pralidoxime and obidoxime in reactivation of cyclosarin-inhibited human cholinesterases. *Tox. Mech. Meth.* 2008 18:329-333. (IF = 0,426)

JUN D., STODŮLKA P., KUČA K., KOLEČKÁŘ V., DOLEŽAL B., SIMON P. a VEVERKA M.: TLC analysis of intermediates arising during the preparation of oxime HI-6 dimethanesulfonate. *J. Chromatogr. Sci.* 2008 46:316-319. (IF = 1,135)

JUN D., STODŮLKA P., KUČA K., KOLEČKÁŘ V., DOLEŽAL B., SIMON P. a VEVERKA M.: HPLC analysis of HI-6 dichloride and dimethanesulfonate - antidotes against nerve agents and organophosphorus pesticides. *Anal. Lett.* 2008 40:2783-2787. (IF = 1,281)

MUSÍLEK K., KUČA K., DOHNAL V., JUN D., MAREK J. a KOLEČKÁŘ V.: Two step synthesis of a non-symmetric acetylcholinesterase reactivator. *Molecules* 2007 12:1755-1761. (IF = 1,252)

JUN D., STODŮLKA P., KOLEČKÁŘ V. a KUČA K.: TLC identification of benzalkonium bromide homologs. *J. Planar Chrom.* 2007 20:283-285. (IF = 0,982)

Hodnota IF je čerpána z JCR 2008