

Tab. 1. Charakterizace nekrotické a apoptotické smrti ^{4, 7, 9, 10)}

	Nekróza	apoptóza
mechanismus	pasivní	aktivní
morfologické změny – cytoplazma	zvětšení buňky a uvolnění látek	zachování integrity buněčné membrány
morfologické změny – jádro	rozpad jádra	fragmentace DNA, kondenzace chromatinu
zánětlivá odpověď	je	není
ovlivněné buňky	skupiny	jedna
osud buňky	lýza	apoptotická tělíska
genová aktivita	nevyžadovaná	vyžadovaná
štěpení DNA	náhodné	specifické

a navazující zánětlivou reakcí. V časně fázi nekrózy jsou narušeny buněčné membrány a buňky začnou „bobtnat“. Později dochází k rozpadu plazmatické a jaderné membrány a nastane únik vnitřního obsahu do okolí; tím se navodí zánětlivá reakce a nakonec rozpad postižené buňky ²⁻⁵⁾. Apoptóza probíhá za fyziologických podmínek jako programovaný zánik buněk během embryogeneze, hormon dependentní involuce u dospělých ³⁾. Sehrává centrální roli ve vývoji a v homeostáze živočichů a rostlin a je podkladem řady fyziologických i patologických mechanismů. Slovo apoptóza pochází z řečtiny: apo = od, ptein = padat. Je geneticky řízeným procesem, který je regulován vnějšími a vnitřními faktory. Pro buňku podléhající apoptóze jsou charakteristické morfologické a biochemické rysy, například ztráta asymetrie buněčné membrány, kondenzace chromatinu, zmenšení jádra, štěpení DNA, svrašťování buňky a nakonec její rozpad na apoptotická tělíska, která jsou pohlcena příslušnými buňkami bez vzniku zánětlivé reakce ^{3, 5-8)} (tab. 1).

Mechanismus apoptózy

Proces apoptózy nastává proteolýzou pro buňku životně důležitých intracelulárních bílkovin. Enzymy, které tuto proteolýzu katalyzují (nebo aktivují jiné efektorové molekuly), se nazývají kaspasy. K aktivaci kaspas vedou dvě cesty. První, **vnější**, nastává po navázání ligandu na membránový „receptor smrti“ s následnou indukci „buněčnou smrt navozujícího signalizačního komplexu“. Ten dává vzniknout aktivním kaspasám 8 a 10, které pak aktivují efektorové prokaspasy 3, 6, 7. Druhá, **vnitřní** cesta apoptózy, je způsobena poškozením vnější mitochondriální membrány, s následným uvolněním mitochondriálních proteinů. Jedním z nich je cytochrom c, který v cytosolu spouští tvorbu apoptosomu – molekulární základny složené z Apaf-1 (Apoptosis proteases-activating factor-1), dATP, cytochromu c. Uvedené děje ústí v aktivaci kaspasy 9, která štěpí a aktivuje efektorové prokaspasy ¹¹⁻¹⁴⁾. Vnitřní cesta apoptózy je regulována pro- a protiapoptotickými geny z rodiny Bcl-2, a tudíž

kanálovými proteiny Bcl_x a Bcl₂, které udržují normální funkci mitochondriální membrány. Regulace jejich aktivity hraje centrální úlohu při apoptóze. Inhibicí této aktivity se změní permeabilita mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu ^{13, 15-17)}.

Kaspasy

Termín KASPASA (caspasa) patří mezi tzv. zkratková slova (Cysteiny Aspartate Specific ProteinaseS) ¹⁸⁾. Jedná se o rodinu proteolytických enzymů – cysteinových proteas štěpících proteinovou molekulu s cysteinem v katalytickém místě na fragmenty se zbytky kyseliny asparagové. Kaspasy hrají ústřední roli v procesu apoptózy ^{19, 20)}.

Struktura a klasifikace kaspas

Vztah kaspas k apoptóze byl objeven v souvislosti s výzkumem červa *Caenorhabditis elegans*, přičemž bylo prokázáno, že produkt genu *ced-3* je homologní se savčím interleukin-1 β-konvertujícím enzymem (ICE, kaspasa 1). Později byla objevena celá řada příbuzných enzymů nazývaných kaspasy 2–14 ^{21, 22)}.

Kaspasy mají podobnou sekvenci aminokyselin, strukturu a substrátovou specifitu. Všechny jsou exprimovány jako proenzymy a obsahují tři hlavní domény: NH₂ terminální doménu, velkou podjednotku (20 kD) a malou podjednotku (10 kD). NH₂ terminální doména je vysoce variabilní a hraje roli v regulaci aktivace; velká a malá podjednotka tvoří po rozštěpení heterodimery. Kaspasy mají společný koncový pentapeptid QACXG, ve kterém X může být: R – arginin, Q – glutamin, D – kyselina asparagová (A – alanin, C – cystein, G – glycin). K proteolýze substrátu je v místě štěpení nezbytně nutná přítomnost kyseliny asparagové ^{22, 23)}.

Dělení kaspas dle funkce se prolíná s jejich dělením dle substrátové specifity:

- Kaspasy iniciační – jsou aktivovány v počáteční fázi apoptózy (kaspasa 2, 8, 9 a 10).

- Kaspasy efektorové (exekuční) – jsou to výkonné kaspasy, které jsou aktivovány v efektorové fázi (kaspasy 3, 6, 7).
- Kaspasy zánětu (inflatorní) – jsou považovány za mediátory, účastníci se zánětu a nekrózy (kaspasy 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14)²⁴⁻²⁶.

Kaspasy důležité pro apoptózu zahrnují kaspasy 2, 3, 6, 7, 8 a 10. Hlavními regulátory aktivity kaspas je aktivace kaspasy 8 při indukci apoptózy receptorovou cestou, a aktivace kaspasy 9 při indukci apoptózy nerekceptorovou cestou. Obě tyto kaspasy pak indukují aktivaci ostatních prokaspas^{19, 24}.

Kaspasy jsou syntetizovány v inaktivní formě jako proenzymy. Aktivovány jsou buď autokatalytickým štěpením, nebo jinými proteasami. Prokaspasy je ve specifických místech Asp-X štěpena, dochází k odštěpení CARD, DED domén, rozštěpení malé a velké podjednotky. Malá a velká podjednotka se pak společně váží za vzniku aktivního tetrameru^{27, 28}.

Patologické projevy apoptózy

Studium programované buněčné smrti se stalo v posledních letech objektem výzkumného zájmu, především z důvodů rozpoznání základní role, kterou apoptóza hraje v normálním vývoji organismu a stejně tak v jeho patofyziologii vedoucí k vývoji mnoha chorob. Tato onemocnění je možné rozdělit do dvou skupin – onemocnění s patologickou inhibicí apoptózy a onemocnění s patologickou indukcí apoptózy¹⁰.

Do první skupiny zařazujeme onemocnění, ve kterých je apoptóza potlačena (tab. 2). Dochází tak k nekontrolovanému bujení buněk a nedostatečnému odstraňování starých, nepotřebných nebo poškozených buněk. Mezi onemocnění s patologickou inhibicí apoptózy patří nádorová onemocnění (folikulární lymfomy, karcinomy s mutací genu p53, hormonálně dependentní nádory (karcinom mléčné žlázy, prostaty, vaječníku), jako jsou karcinomy mléčné žlázy, prostaty a vaječníku), autoimunitní choroby (systémový lupus erythematoses, některé typy glomerulonefritidy) a virové infekce (způsobené herpesviry a poxviry)^{29, 30}.

Tab. 2. Onemocnění související s inhibicí apoptózy³⁰⁻³²

- | |
|--|
| 1. nádorová onemocnění |
| • folikulární lymfomy |
| • karcinomy s mutací genu p53 |
| • hormonálně dependentní nádory (karcinom mléčné žlázy, prostaty, vaječníku) |
| • benigní hyperplazie prostaty |
| 2. autoimunitní choroby |
| • systémový lupus erythematoses |
| • autoimunitní glomerulonefritidy |
| 3. virové infekce |
| • herpesviry |
| • poxviry |

Do druhé skupiny jsou obvykle zařazovány nemoci, u nichž je apoptóza nadměrná a vede k poškození normálních orgánů a tkání (tab. 3). S patologickou indukcí

apoptózy souvisí AIDS, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza), myelodysplastické syndromy (aplastická anémie) a ischemická poškození (infarkt myokardu, mozková apoplexie)^{29, 30}.

Tab. 3. Onemocnění související s nadměrnou apoptózou^{29, 30}

- | |
|-----------------------------------|
| 1. AIDS |
| 2. neurodegenerativní onemocnění |
| • Alzheimerova choroba |
| • Parkinsonova choroba |
| • amyotrofická laterální skleróza |
| 3. myelodysplastický syndrom |
| • aplastická anémie |
| 4. ischemické poškození |
| • infarkt myokardu |
| • mozková apoplexie |

Induktory apoptózy

U látek, které působí jako aktivátory apoptózy, se předpokládá využití k léčbě onemocnění, v jejichž patogenезi se uplatňuje nedostatečná apoptóza.

Do skupiny léčiv schopných indukovat apoptózu je možné zařadit gamcitabin^{33, 34}, thalidomid³⁵, doxorubicin^{36, 37} i erektikum sildenafil³⁸. U některých látek schopných indukovat apoptózu není dosud známo, jakým mechanismem tento proces probíhá. Jedná se pravděpodobně o aktivaci receptorů nesoucích smrtící domény (rodina receptorů TNF), omezení účinků bcl-2 proteinu anebo aktivaci kaspas³⁹. Při použití těchto látek je však důležité a žádoucí, aby jejich působení bylo zaměřené cíleně na patologické buňky a nedocházelo k farmakologickému vyvolání chorob s nežádoucí indukcí apoptózy.

U některých již běžně užívaných léčiv byl podrobněji zkoumán mechanismus účinku na molekulární úrovni a bylo zjištěno, že na jejich působení se podílí indukce apoptózy, jak je tomu například u protinádorového paklitaxelu a antagonistů α_1 receptorů, užívaných v léčbě benigní hyperplazie prostaty. Tato léčiva indukují apoptózu přímo v nádorových buňkách, resp. u hyperplastických buněk prostaty.

Inhibitory apoptózy

Do této skupiny jsou zařazovány látky schopné inhibovat apoptózu. Prozatím nejsou zavedena do praxe, ale představují potenciální farmaka léčby nemocí, u kterých je apoptóza neregulovatelná nebo nadměrná (např. AIDS, neurodegenerativní choroby, ischemické poškození buněk).

Mezi malé molekuly, které nemají peptidovou strukturu a vykazují inhibiční účinek na apoptózu, patří např. oxid dusnatý, zinečnaté ionty, chinony a dithiokarbamáty⁴⁰.

Problémem využití látek inhibujících apoptózu je jejich nejen terapeutické, ale i patologické působení v procesech navození prekancerogenních stavů. Proto

role antiapoptických léčiv u neurodegenerativních chorob musí být nejprve detailněji prozkoumána ⁴¹⁾. Mezi potenciální léčiva tohoto druhu s předpokládanou inhibicí apoptózy, a to nejčastěji mechanismem inhibice kaspas, mohou být zařazeny například prlnakasan ^{42, 43)} a prlnaskan ⁴⁴⁾, ale ne u všech je mechanismus inhibice apoptózy znám. V patogenezi neurodegenerativních chorob hraje ústřední roli kaspasa 3.

Dosud popsané látky ovlivňující apoptózu, zvláště iniciací kaspas (např. thalidomid, leflunomid, bortezomib) nebo inhibicí kaspas (minocyklin, memantin i adeninové nebo jiné purinové deriváty), jsou strukturálně odlišné. Ovlivnění aktivity kaspas je atraktivním polem pro terapeutické ovlivnění mnoha onemocnění, souvisejících s apoptózou a některými zánětlivými nemocemi. V práci

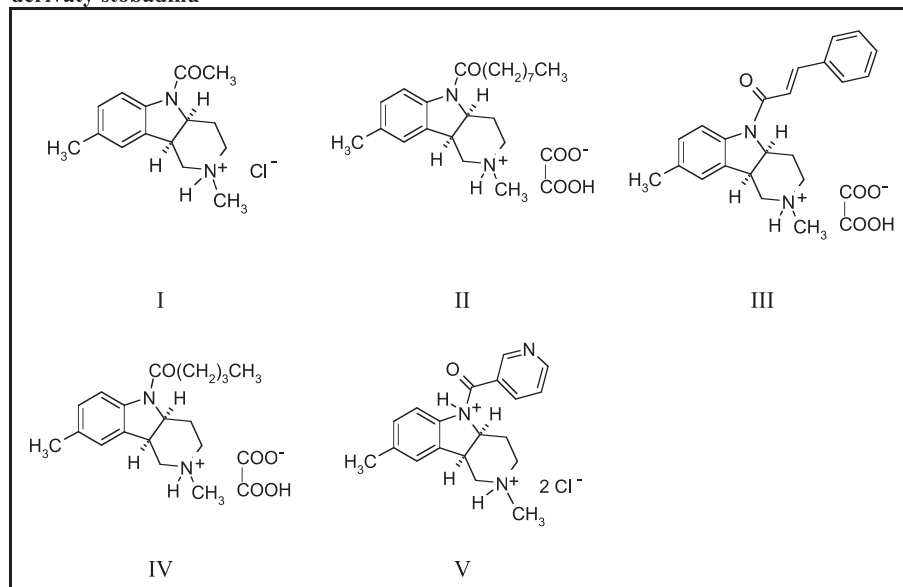
byl studován vliv sloučenin ze skupiny stobadinových ⁴⁵⁾ a purinových derivátů na aktivitu kaspasy 1 účastníci se celé řady patologických stavů ²⁴⁻²⁶⁾.

POKUSNÁ ČÁST

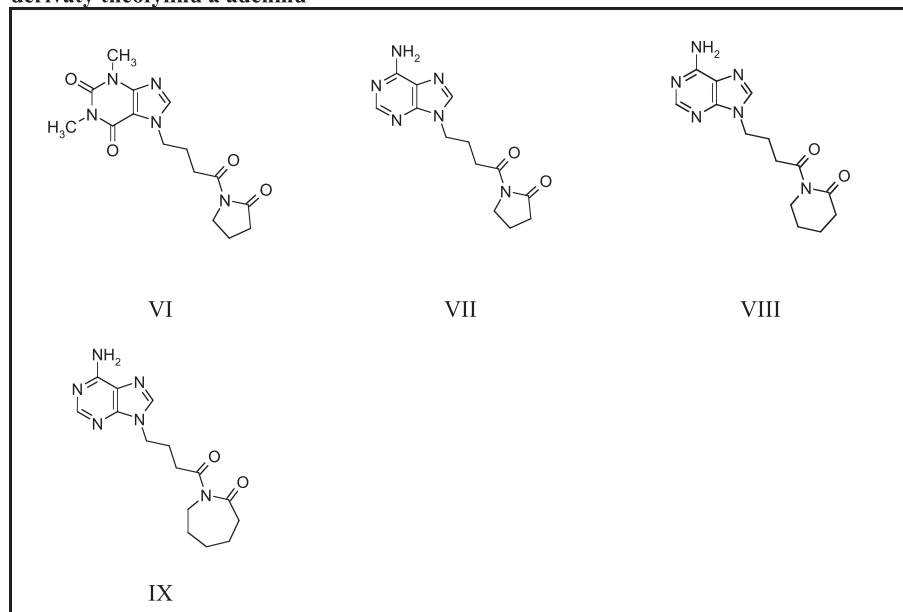
Chemikálie

Ethylendiaminetetraoctová kyselina 99,5 % (EDTA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina 99,5 % (HEPES), dithiothreitol 99 % (DTT) (Aldrich), ethanol pro UV, glycerol p. a. (Lachema), HEPES sodná sůl 99 % (Fluka), chlorid sodný p. a., kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (ML che-

deriváty stobadinu



deriváty theofylinu a adeninu



Obr. 1. Chemické struktury testovaných látek

mica), polyetylen glykol *p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenylether pro molekulární biologii (TRITON® X-100), rekombinantní lidská kaspasa 1 z *E. coli*, specifický substrát pro kaspasu 1 Ac-YVAD-pNA (Calbiochem).

Přístroje

Spektrofotometr HELIOS β (ThermoSpectronic), Vortex Nahita (Auxilab).

Metodika

Metodika práce se skládala z příprav tlumivého roztoku HEPES, roztoku substrátu, enzymového preparátu kaspasy 1 a roztoků efektorů vždy včas spotřeby a z vlastní metodiky stanovení biologické aktivity.

Tlumivý roztok HEPES – 0,01 mol.l⁻¹, pH 7,4

Složení: 0,01 mol.l⁻¹ HEPES kyselina; 0,01 mol.l⁻¹ HEPES sodná sůl; 50 mmol.l⁻¹ NaCl; 10 mmol.l⁻¹ DTT; 1 mmol.l⁻¹ EDTA; 5 % glycerol; 0,1 % TRITON® X-100.

Příprava

V destilované vodě bylo rozpuštěno příslušné množství HEPES kyseliny, HEPES sodné soli, NaCl, glycerolu a TRITONu® X-100, aby bylo dosaženo požadované koncentrace každé složky a byla upravena hodnota pH pufru na 7,4. DTT a EDTA byly přidány do roztoku až před použitím, aby se zamezilo žloutnutí roztoku ⁴⁶⁾.

Příprava roztoku substrátu

5 mg specifického substrátu pro kaspasu 1 (Mr 628,6) bylo rozpuštěno ve 100 μl DMSO a bylo přidáno 0,7 ml pufru HEPES. Vzniklých 800 μl roztoku bylo rozděleno po 100 μl na 8 dílů (koncentrace 10 mmol.l⁻¹) a každý z dílů byl dále naředěn přidáním 400 μl pufru HEPES. Vznikly roztoky substrátu o objemu 500 μl a koncentraci 2 mmol.l⁻¹ ⁴⁶⁾.

Příprava enzymového preparátu z kaspasy 1

Komerčně dodané množství enzymu (300 μl ve formě roztoku s aktivitou 3000 U) bylo rozděleno na 5 částí po 60 μl, každá z částí byla zředěna pufrům HEPES na objem 300 μl (600 U) ⁴⁶⁾.

Příprava roztoků efektorů

Příslušné množství testovaných sloučenin bylo rozpuštěno v 500 μl DMSO tak, aby vznikly roztoky efektorů o koncentraci 10 mmol.l⁻¹.

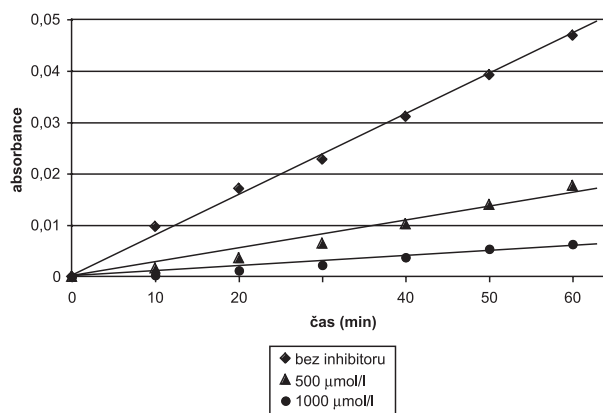
Stanovení biologické aktivity

Pro stanovení biologické aktivity bylo pipetováno příslušné množství HEPES pufru, 30 μl připraveného roztoku enzymu a 20 μl (pro koncentraci efektoru 500 μmol.l⁻¹) resp. 40 μl (pro koncentraci efektoru 1000 μmol.l⁻¹) roztoku testované sloučeniny tak, aby celkový objem činil 360 μl. Směs byla promíchána za použití přístroje Vortex, inkubována 5 min při teplotě 37 °C. Následně bylo přidáno 40 μl substrátu a směs byla opět důkladně promíchána. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 405 nm oproti slepému vzorku v časových intervalech 10 min po dobu 1 h. Vzorky byly inkubovány během měření při teplotě 37 °C. Zpracované výsledky jsou průměrem vždy dvou paralelních měření. Naměřené hodnoty absorbance odečtené v desetiminutových intervalech byly vyneseny do grafu vůči

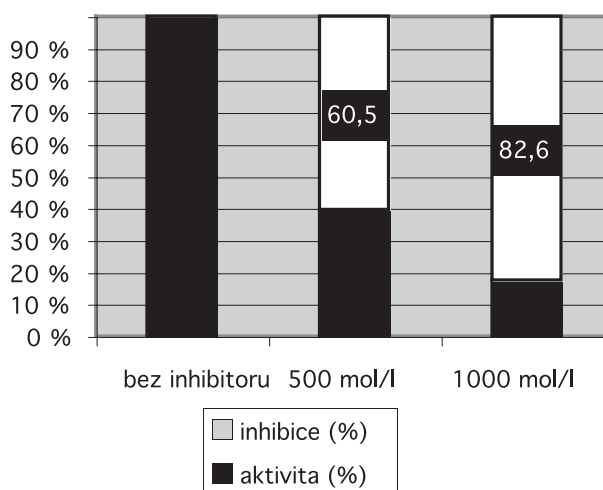
času a zpracovány lineární regresí. Změna aktivity enzymu byla vypočítána jako podíl absorbance systému s příslušným efektem k absorbanci systému bez efektoru a vyjádřena v procentech.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Působení kaspasy 1 vede k uvolňování *p*-nitroanilinu z enzymového substrátu, uvolněný *p*-nitroanilin byl sta-

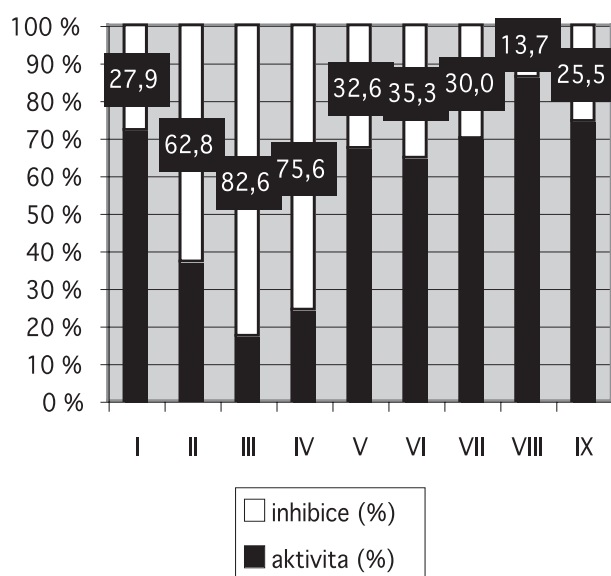


Graf 1. Stanovení inhibiční aktivity sloučeniny III na aktivitu kaspasy 1 – závislost naměřených hodnot absorbance (405 nm) vůči času



Graf 2. Stanovení inhibičního působení sloučeniny III v koncentracích 500 μmol.l⁻¹ a 1000 μmol.l⁻¹ na aktivitu kaspasy 1 po 60 min

noven spektrofotometricky. Nejvyšší hodnota absorbance byla zjištěna ve vzorcích bez přítomnosti efektorů. Přidání efektorů vedlo k poklesu hodnot absorbance svědčící o inhibičním působení testovaných sloučenin na aktivitu kaspasy 1. Hodnoty absorbance byly během měření odečítány v intervalu 10 min po celkovou dobu 1 h, kdy je enzymatická reakce lineární.



Graf 3. Srovnání inhibičního působení sloučenin I–IX v koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na aktivitu kaspasy 1 po 60 min

Naměřené hodnoty absorbance byly vyneseny na časové ose (graf 1) a byly vypočítány procenta inhibice aktivity enzymatické reakce pro jednotlivé koncentrace efektorů po čase 60 min (graf 2). Z grafu 2 vyplývá, že inhibiční účinek vzrůstá v koncentrační závislosti s množstvím použitých testovaných sloučenin. Nejvyšší inhibiční aktivitu (graf 3) ve skupině studovaných efektorů vykázaly stobadinové deriváty (I–V) (obr. 1), přičemž nejsilnější inhibiční aktivita v koncentraci efektoru 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byla nalezena u sloučeniny III, u které dosáhla 82,6 %, sloučeniny IV (75,6 %) a sloučeniny II (62,8 %). Uvedené stobadinové deriváty spojuje strukturální vztah, substituent stobadinového skeletu obsahuje bezprostředně za karbonylovou skupinou alespoň dvouuhlíkatý necyklický alkylový, popř. alkenylový řetězec.

Inhibiční aktivita purinových sloučenin (VI–IX) (obr. 1) je nižší a v koncentraci 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ dosahuje maximálně 35 % v případě látky VI. Vzájemný vztah mezi aktivitou a chemickou strukturou nelze pro nízký počet studovaných sloučenin prozatím navrhnout.

LITERATURA

- Russell, S. W., Rosenau, W., Lee, J. C.: Am. J. Pathol., 1972; 69, 103–118.
- Bóznér, A., Fízel, A., Kopáčová, L. et al.: Farmakologická propedeutika, 1. vyd. Bratislava, Osveta, 1984; 277, 278.
- <https://www.zdravcentra.cz>, staženo 5. 1. 2007.
- Rosypal, S.: Úvod do molekulární biologie, 1. vyd. Blansko, Grafex, 1999; 485–488.
- <http://www.fnplzen.cz/>, staženo 11. 2. 2007.
- Steller, H.: Science, 1995; 267, 1445–1449.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C.: Cell, 1997; 88, 347–354.
- Cohen, J. J.: Immunol. Today, 1993; 14, 126–130.
- Trauth, B. C., Keeseey, J.: Cell death. In: Trauth, B. C. Boehringer Mannheim, 1998; 34–61.
- Rudin, C. M., Thompson, C. B.: Annu. Rev. Med., 1997; 48, 267–281.
- Riedl, S. J., Shi, Y.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004; 5, 897–907.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I. et al.: Cell, 1997; 91, 479–489.
- Reed, J. C.: Am. J. Pathol., 2000; 157, 1415–1431.
- Green, D. R., Kroemer, G.: J. Clin. Invest., 2005; 115, 2610–2617.
- Varfolomeev, E. E., Ashkenazi, A.: Cell, 2004; 116, 491–497.
- Chinnaiyan, A. M.: Neoplasia, 1999; 1, 5–15.
- Yan, N., Shi, Y.: Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2005; 21, 35–56.
- Philchenkov, A.: J. Cell Mol. Med., 2004; 8, 432–444.
- Ho, P. K., Hawkins, C. J.: FEBS Lett., 2005; 272, 5436–5453.
- Yuan, J. Y., Shaham, S., Ledoux, S. et al.: Cell, 1993; 75, 641–652.
- Twomey, C., McCarthy, J. V.: J. Cell Mol. Med., 2005; 9, 345–359.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., Liang, J.: Acta Biochim. Biophys. Sinica, 2005; 37, 719–727.
- Wolf, B. B., Green, D. R.: J. Biol. Chem., 1999; 274, 20049–20052.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. Y.: Oncogene, 2003; 22, 8543–8567.
- Shi, Y.: Mol. Cells, 2002; 9, 459–470.
- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G. S.: Biochem. J., 2004; 384, 201–232.
- Lavrik, I. N., Golks, A., Krammer, P. H.: J. Clin. Invest., 2005; 115, 2665–2672.
- <http://is.muni.cz/> staženo 9. 2. 2007.
- Jin, Z. Y., El-Deiry, W. S.: Cancer Biol. Ther., 2005; 4, 139–163.
- Thompson, C. B.: Science, 1995; 267, 1456–1462.
- <http://ustavpatologie.upol.cz>, staženo 15. 2. 2007.
- Chwajol, B.: Urologie pro praxi, 2001; 3, 119–121.
- <http://www.sukl.cz/>, staženo 14. 2. 2007.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Podar, K. et al.: Semin. Oncol., 2001; 28, 607–612.
- <http://www.chem-online.org/generic-pharmaceutical>, staženo 19. 2. 2007.
- Oancea, M., Mani, A., Hussein, M. A., Almasan, A.: Int. J. Hematol., 2004; 80, 224–231.
- Ückert, S., Hedlund, P., Andersson, K. E. et al.: Eur. Urol., 2006; 50, 1194–1207.
- Klener, P.: Sanquis, 2004; 36, 14–16.
- <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca>, staženo 14. 2. 2007.
- Graczyk, P. P.: Restor. Neurol. Neurosci., 1999; 14, 1–23.
- Bonuccelli, U., Del Dotto, P.: Neurology, 2006; 67, 30–38.
- Loher, F., Bauer, C., Landauer, N. et al.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 2004; 308, 583–590.
- <http://merops.sanger.ac.uk>, staženo 27. 2. 2007.
- Concha, N. O., Abdel-Meguid, S. S.: Current Med. Chem., 2002; 9, 713–726.
- Beneš, L., Pronayová, N.: Pharmazie, 1994; 49, 69–70.
- Návodů firmy Calbiochem: Calbiochem User Protocol, No. 218783.

Antioxidační aktivita tinktur připravených z hlohových plodů a nati srdečníku

MASTEIKOVÁ R.¹, MUSELÍK J.¹, BERNATONIENĚ J.², MAJIENĚ D.^{2,3}, SAVICKAS A.²,
MALINAUSKAS F.⁴, BERNATONIENĚ R.⁴, PEČIŮRA R.², CHALUPOVÁ Z.¹,
DVOŘÁČKOVÁ K.¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků

²Kaunasská univerzita medicíny, Farmaceutická fakulta, Katedra technologie léků a sociální farmacie, Litva

³Kaunasská univerzita medicíny, Institut biomedicínského výzkumu, Litva

⁴Kaunasská univerzita medicíny, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutické chemie a farmakognozie, Litva

Došlo: 6. listopadu 2007 / Přijato: 26. listopadu 2007

SOUHRN

Antioxidační aktivita tinktur připravených z hlohových plodů a nati srdečníku

Cílem práce bylo stanovit a porovnat antioxidační aktivitu dvou tinktur a vybraných flavonoidů přítomných v tinkturách. Tinkтуры byly připraveny z hlohových plodů a nati srdečníku. Skupina vybraných flavonoidů zahrnovala rutin, kvercetin, hyperozid, epikatechin a procyanidin B2. Ke stanovení antioxidační aktivity sloužily dvě metody: Byla měřena inhibice peroxynitritem indukované nitrace tyrosinu a schopnost zhaset radikály byla sledována pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Obě zkoumané tinkтуры byly schopné zhaset radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku. Účinnější byla tinktura z nati srdečníku, avšak neprokázal se přímý vliv fenolických sloučenin na rozsah antioxidační aktivity. Celkový obsah polyfenolů byl v tinktuře z nati srdečníku o 163 % větší, přesto antiperoxynitritová aktivita byla vyšší jen o 19 % ($p < 0,05$), a schopnost redukce DPPH se u obou tinktur lišila minimálně. Z jednotlivých flavonoidů se nejvíce na antioxidační aktivitě podílely látky, přítomné v tinkturách ve vyšších koncentracích. V tinktuře z hlohových plodů to byly epikatechin a hyperozid, kdežto v tinktuře z nati srdečníku rutin.

Klíčová slova: *Crataegi fructus* – *Leonuri herba* – tinkтуры – flavonoidy – antioxidační aktivita

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 35–38

SUMMARY

Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb

The paper aimed to determine and compare the antioxidant activity of two tinctures and selected flavonoids present in the tinctures. The tinctures were prepared from hawthorn fruits and motherwort herb. The group of selected flavonoids included rutin, quercetin, hyperosid, epicatechine, and procyanidin B2. Two methods were employed to determine antioxidant activities: the inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine was measured, and the ability to quench radicals was examined by of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Both tinctures under study were able to quench radicals and reactive forms of oxygen and nitrogen. The motherwort herb tincture was more effective, but no direct effect of phenolic compounds on the extent of antioxidant activity was demonstrated. The total content of polyphenols in the motherwort herb tincture was higher by 163 %, nevertheless antiperoxynitrite activity was higher just by 19 % ($p < 0.05$), and the ability to reduce DPPH differed in both tinctures in a minimal manner. Of the individual flavonoids, the substances present in the tinctures in higher concentrations contributed

Adresa pro korespondenci:

doc. PharmDr. Ruta Masteiková, CSc.
Ústav technologie léků FaF VFU
Palackého 1/3, 612 42 Brno
e-mail: masteikovar@vfu.cz