

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PŘEHLED MÉNĚ BĚŽNÝCH ISOFLAVONOIDŮ V ROSTLINÁCH

AUTOR PRÁCE: Martin Cymbál, DiS.

VEDOUCÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

STUDIJNÍ PROGRAM: Zdravotnická bioanalýtika

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Poděkování:

Děkuji PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za vedení, ochotu, výbornou spolupráci a hlavně trpělivost. Velice děkuji za velmi cenné rady, informace a připomínky, které mi v průběhu psaní poskytla.

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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2017

OBSAH

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. CÍL PRÁCE	8
4. POUŽITÉ ZKRATKY	9
5. ÚVOD	10
6. ISOFLAVONOIDY	11
6.1. Pterokarpany	11
6.2. Irimon	13
6.3. Genistein	13
6.4. Prunetin	14
7. ZAŘAZENÍ ROSTLIN DO SYSTÉMU	16
8. PŘEHLED ROSTLIN - konkrétní látky a jejich biologická aktivita	17
8.1. MAGNOLIOPSIDA - DVOUĎĚLOŽNÉ ROSTLINY	17
8.1.1. <i>Crotalaria bracteata</i> Roxb. ex DC.	17
8.1.2. <i>Neorautanenienia mitis</i> (A. Rich) Verdc.	17
8.1.3. <i>Ononis spinosa</i> L.	18
8.1.4. <i>Erythrina excelsa</i> Baker a <i>Erythrina senegalensis</i> DC.	21
8.1.5. <i>Cicer arietinum</i> L.	22
8.1.6. <i>Indigofera heterantha</i> Wall.	24
8.1.7. <i>Caragana changduensis</i> Lion f.	25
8.1.8. <i>Andira humilis</i> Mart. ex Benth	29
8.1.9. <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	30
8.1.10. <i>Derris ferruginea</i> (Roxb.) Benth.	32
8.1.11. <i>Tephrosia pumila</i> (Lam.) Pers.	34
8.1.12. <i>Campylotropis hirtella</i> (Franchet) Schindler	35
8.1.13. <i>Amphimas pterocarpoides</i> Harms	37
8.1.14. <i>Millettia oblata</i> , subsp. <i>teitensis</i> J.B. Gillett	40
8.1.15. <i>Spirotropis longifolia</i> (DC.) Baill.	40
8.1.16. <i>Oxytropis falcata</i> Bunge	43
8.1.17. <i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret, <i>Psidium littorale</i> Raddi a <i>Psidium guajava</i> L.	44
8.1.18. <i>Polygala molluginifolia</i> A. St.-Hil.	47
8.1.19. <i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Bureau ex Lavallée	52
8.1.20. <i>Maclura pomifera</i> (Raf.) C. K. Schneid.	54
8.1.21. <i>Antidesma laciniatum</i> Müll. Arg.	56
8.1.22. <i>Achyranthes bidentata</i> Blume	57

8.1.23. <i>Nicotiana tabacum</i> L. _____	59
8.1.24. <i>Azorella madreporica</i> (Phil.) Reiche _____	59
8.2. LILIOPSIDA - JEDNODĚLOŽNÉ ROSTLINY _____	60
8.2.1. <i>Iris kashmiriana</i> Baker _____	60
8.2.2. <i>Iris germanica</i> L. _____	62
8.2.3. <i>Gynandriris sisyrinchium</i> (L.) Parl. _____	66
8.2.4. <i>Ophiopogon japonicus</i> (Thunb.) Ker Gawl. _____	68
9. DISKUSE A ZÁVĚR _____	70
10. BIBLIOGRAFIE _____	74

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Martin Cymbál, DiS.

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Bakalářská práce 2016/2017: Přehled méně běžných isoflavonoidů v rostlinách, s. 78.

Isoflavonoidy jsou skupinou fenolových flavonoidních látek dráhy 3-fenylchroman-4-onu, z nichž mnohé jsou biologicky aktivní. Isoflavonoidy a jejich deriváty jsou někdy označovány jako fytoestrogeny, protože jejich struktura a účinek se podobá steroidním hormonům a v těle se váží na estrogení receptory. Isoflavonoidy hrají důležitou roli v lidské potravě jako zdraví podporující rostlinné látky.

Isoflavonoidy a jim příbuzné sloučeniny jsou používány v mnoha doplňcích stravy a pouze v jednom u nás registrovaném fytofarmaku (Menofem). Nedávno byly některé přírodní isoflavonoidy dokonce identifikovány jako toxiny, např. biliatreson, který může způsobit biliární atrezii, pokud jsou kojenci této látce vystaveni. Nicméně letitými studiemi, nacházením nových isoflavonoidů a to včetně objasnění jejich struktury a mechanismu účinku získaly na významnosti a v posledních deseti letech jsou isoflavonoidy předmětem širokého výzkumu a analýz, a to především pro své nepřeborné množství účinků, které byly studiemi potvrzeny. Je však třeba provést mnoho dalších experimentů *in vitro* i *in vivo*, aby mohly být využívány častěji a v nových indikacích.

Klíčová slova: Rostliny, isoflavonoidy, biologická aktivita, studie, identifikace

2. ABSTRACT

Charles University

Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Martin Cymbál, DiS.

Supervisor: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Bachelor thesis 2016/2017: Knowledge of less common isoflavonoids in plants, pp. 78.

Isoflavonoids are a group of 3-phenylchromen-4-one phenol flavonoids, many of which are biologically active. Isoflavonoids and their derivatives are sometimes referred to as phytoestrogens, because their structure and effect are similar to steroid hormones and are fed to estrogen receptors in the body. Isoflavonoids play an important role in human food as a health promoting plant substance.

Isoflavonoids and their related compounds are used in many dietary supplements and only in one registered phytopharmac (Menofem). Recently, some natural isoflavones have been identified as toxins, eg. biliartrason, which can cause biliary atresia if infants are exposed to this substance. However, with years of research and finding of new isoflavonoids together with understanding of their mechanism of action and their structure they have gained importance. Over the last ten years isoflavonoids have been subject to extensive research and analysis mainly because of their countless effects that were confirmed by studies. Many other *in vitro* and *in vivo* experiments need to be carried out so then isoflavonoids can be used more frequently and in new indications.

Keywords: Plants, isoflavonoids, biological activity, studies, identification

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo nalézt a zpracovat články a studie, které obsahují méně běžné isoflavonoidy v rostlinách publikované v odborné literatuře v posledním desetiletí a sestavit přehled rostlin, ve kterých byly tyto isoflavonoidy nalezeny. Zaměření této práce bylo zejména na obsahové látky a jejich identifikaci v rostlinném materiálu a také na biologickou aktivitu těchto látek.

4. POUŽITÉ ZKRATKY

AGE - pokročilý konečný glykační produkt

ALP - alkalická fosfatasa

AMPK - 5 'adenosinmonofosfát-aktivovaná proteinkinasa

ATP - adenosintrifosfát

COX - cyklooxygenasa

DPPH - 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl

EGF - epidermální růstový faktor

ER - estrogenový receptor

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRMS - systém řízení lidských zdrojů

HRT - hormonální substituční terapie

HSQC - heteronukleární jednobuněčná koherentní spektroskopie

IC₅₀ - inhibiční koncentrace, při které je dosaženo 50% maximálního buněčného poškození

IL-2 - interleukin 2

K_{ATP} - draslíkové ATP dependentní kanály

LAK - lymfokinem aktivovaná smrtící buňka

LD₅₀ - letální dávka, která vyvolá v 50% smrt

LPS - liposacharid

MCF-7 - lidská buněčná linie karcinomu prsu

MMT-9 - matrix metalopeptidasy 9

MRSA - methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-difenyl-tetrazolin bromid

NCI-H187 - buněčná linie rakoviny plic

NOESY - nukleární Overhausova spektroskopie

PAMPA - paralelní propustnost membránové propustnosti

PGE₂ - prostaglandin E2

PTB1B - proteintyrosinfosfatasa-1B

RCDS - doplňky stravy na bázi červeného jetele

ROS - reaktivní formy kyslíku

TGF-β2 - transformace růstového faktoru beta 2

TLC - tenkovrstvá chromatografie

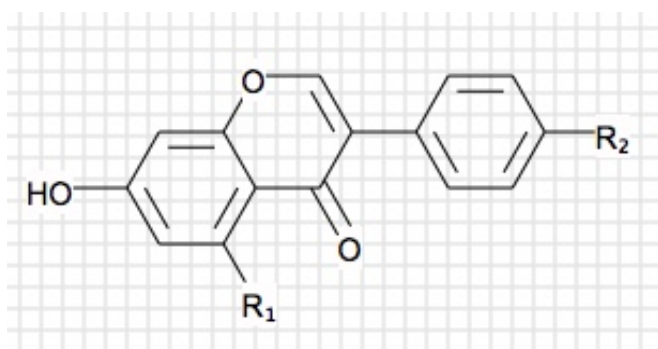
TNF - tumor nekrotizující faktor

VRSA - vankomycin rezistentní *Staphylococcus aureus*

VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor

5. ÚVOD

Isoflavonoidy jsou polyfenolové sekundární metabolity, které jsou běžně přítomné v naší stravě. Jsou to molekuly odvozené od 3-fenylchromanu a jsou hlavním zástupcem v čeledi Fabaceae, ale byli také nalezeni ve vysoké koncentraci i v jiných čeledích a bylo popsáno přes více než 800 různých molekul. Jednotlivá klasifikace probíhá podle stupně oxidace a přítomnosti dalších heterocyklů na základním skeletu. Hlavními složkami jsou isoflavony, které mají největší zastoupení (volné nebo *O*-glykosidy a C-glykosidy), isoflavanony a isoflavany. Mezi významné isoflavonoidy patří genistein, daidzein, formononetin, glycitein, biochanin A (obr. 1.) a dále mezi významné isoflavonoidní isoprenylované deriváty patří pterokarpany, kumestany a rotenoidy. Tyto molekuly obsahují celou škálu farmakologicky aktivních složek, včetně antikancerogenního a antioxidantního účinku. Pozitivním zjištěním je snížené riziko vzniku rakoviny v populaci, kde je dostatek isoflavonoidů ve stravě. Kromě toho mají také antimikrobiální, protizánětlivé a estrogenní účinky. Proto jsou isoflavonoidy podrobovány hlubšímu zkoumání a hledání jejich účinků pro léčbu [1].



	R₁	R₂
genistein	OH	OH
daidzein	-	OH
formononetin	-	OCH ₃
biochanin A	OH	OCH ₃

Obr. 1: Struktura základního skeletu isoflavonoidu a jeho derivátů, nakresleno ChemPencil [1]

Studie struktury isoflavonoid-methyltransferasy a glykosyltransferasy odhalila, jak se isoflavonoidy dále obohacují methylovou skupinou a cukrem v různých methylacích a glykosylacích, které určují jejich bioaktivitu a funkci. V kombinacích s mutagenézí a biochemickými studiemi, prokázaly studie detailní informace o struktuře těchto enzymů poskytující základ pro pochopení komplexní biosyntézy procesu, mechanismu katalytických enzymů a substrátové specifity. Struktura na bázi homologie modelování usnadňuje funkční charakterizaci těchto velkých skupin biosyntetických enzymů a jejich homologů. Studie struktury se v inženýrství stává novou strategií pro syntézu bioaktivních isoflavonoidů [1].

V poslední době se významně zkoumají účinky isoflavonoidů v léčbě *Trichomonas vaginalis*, což vede k vývoji nových léků. Patří sem zástupci z rodu Asteraceae, Amaryllidaceae, Euphorbiaceae, Fagaceae, Fabaceae, Magnoliaceae, Rubiaceae, Apiaceae, Zingiberaceae, Scrophulariaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Lauraceae a další. *Persea americana*, *Ocimum basilicum* a *Verbascum thapsus* byly nejúčinnější proti *Trichomonas vaginalis* [2].

6. ISOFLAVONOIDY

6.1. Pterokarpany

Pterokarpany jsou biologicky aktivní isoflavonoidy nejčastěji nalezené v čeledi Fabaceae, kde působí jako fytoalexiny. Fytoalexiny působí jako silné inhibitory patogenů a jsou syntetizovány vlivem stresových faktorů (patogeny, UV záření a soli s vysokým obsahem kovů). Fytoalexiny chrání rostliny před hubovými a jinými mikrobiálními patogeny. Velký počet pterokarpanů byl izolován z přírodních zdrojů a prokázalo se, že mají významné biologické účinky. Mají významný potenciál pro výzkum a vývoj nových léčiv. Vykazují účinky antimikrobiální, antikacerogenní, antiflogistické a antimalarické. V poslední době si pterokarpany získaly velkou pozornost kvůli své široké škále účinků zejména antikacerogenních, které byly studovány u rakoviny prsu, leukémie, děložního čípku, vaječníků, plic, tlustého střeva a melanomu. Je zajímavé, že pterokarpany vykazují inhibiční účinnost proti mnoha enzymům, jako je PTP1B, ne uraminidasa a α -glykosidasa. Navíc se prokázalo, že mají antiestrogenní a antidiabetické účinky. Na základě struktury jsou pterokarpany klasifikovány jako *O*-glykosylované pterokarpany, dimethylpyranopterkarpany, furanopterokarpany a 6a-hydroxypterokarpany. Ve studii Militao a kol. byla zkoumána cytotoxická účinnost pterokarpanů izolovaných z rostliny *Platymiscium floribundum* a její vliv na promyelocytární leukémii. Militao a kol. zkoumali 2,3,9-trimethoxypterokarpany pro svou cytotoxickou aktivitu ve čtyřech buněčných liniích leukemie. Fragmentace *Harpalyce brasiliiana* poskytla leiokarpin s vysokým antimitotickým účinkem. Antiproliferativní účinnost byla studována u pterokarpanů izolovaných z *Erythrina sigmoidea*, *Petalostemon purpureus*, *Leishmania amazonensis*, *P. pervilleana*, *Spirotropis longifolia* (spirotropin), *Millettia brandisiana*, *Erythrinium abyssinica*, *Neorautanenia mitis* (rautandioly A a B) a *Sophora tonkinensis* (onkinenziny A a B). Weng a kol. zkoumal extrakt z kůry *Crotalaria pallidum*. Krotafurany A a B inhibovaly produkci NO a degranulaci neutrofilů v makrofázích. Krotafuran B vykazoval aktivitu proti mikrogliovým buňkám. *Astragalus membranaceus* v makrofágové linii vykazoval maximální účinnost proti produkci NO. *Astragalus membranaceus* se testoval na liposacharid-indukovanou expresi prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF- α v dendritických buňkách pocházejících z kostní dřene. Trifolirhizin izolovaný z *Sophora flavescens* významně inhiboval mRNA expresi TNF- α a IL-6. Trifolirhizin byl také testován na inhibici exprese proteinu COX-2 v makrofágu stimulovaného liposacharidem. COX-1 a COX-2 jsou enzymy podílející se na zánětlivých procesech inhibovaných indigokarpanem, izolovaný z *Indigofera aspalathiodes*. *Oxytropis falcata* prokázala cytotoxický účinek proti promyelocytárním leukemickým buněčným liniím. Pterokarpan vykazoval lepší antioxidační aktivitu proti DPPH radikálům než vitamin E. Nejvyšší hladiny DPPH byly zaznamenány v kombinaci *Astragalus membranaceus* a *Paeonia Lactiflora*. Pterokarpany z *Harpalyce brasiliiana* měly vysokou inhibiční účinnost proti *Trypanosoma cruzi*.

Pterokarpany izolované z *Erythrina stricta* a *Erythrina subumbrans* vykazovaly antiplasmodiální, antimykobateriální a cytotoxické účinky. Erystagallin A vykazoval zvýšenou antimykobakteriální účinnost. Erybradin A měl maximální cytotoxickou účinnost. *Erythrina fusca* se testovala na antibakteriální účinnost proti *S. aureus* a na methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Kalopokarpin izolovaný z *Erythrina burttii* vykazoval antiplasmodiální aktivitu vůči kmenům *Plasmodium falciparum* citlivým na chlorochin a chlorochinin. Antimalarická a antioxidační aktivita byla potvrzena pro fazolidin a sandwicensin izolovaný z *Erythrina crista*. Tanaka a kol. studovaly antibakteriální účinky erycristagallinu, orientanolu B a eryzerinu E z kořenů *Erythrina variegata* a *Erythrina zeyheri* proti MRSA. Pterokarpany izolované z *Erythrina subumbrans* vykazovaly antibakteriální účinky proti kmenům MRSA a VRSA. Pterokarpány izolované z *Tephrosia aequilata* a *Ononis spinosa* byly testovány na Gram-pozitivním a Gram-negativním bakterie. Belofsky a kol. studovaly fungicidní účinky sandwicensinu proti patogenům odolným vůči lékům *C. albicans*, *C. glabrata* a několika kmenům *S. cerevisiae*. Ryu a kol. zkoumaly inhibiči aktivity neuraminidasy proti *Clostridium perfringens* z extraktu *Sophora flavescens*. Výsledky studie ukázaly, že maackiain a trifolizin měly pro inhibiči neuraminidasy maximální potenciál ve srovnání s izolovanými flavanony (bikolosin A, bikolosin B, bikolosin C, methoxyerytrabyssin, kumestrol, faseol, lespecyrtin a lespeflorin). Pterokarpany izolované z *Lespedeza bicolor* vykazovaly významnou inhibiči na neuraminidázu proti *Clostridium perfringens*. Extrakty z rostlin *Lespedeza cyrtobotrya* a *Sophora flavescens* vykazovaly silnou inhibiční aktivitu v syntéze melaninu. *Lespedeza floribunda* a *Lespedeza cyrtobotrya* inhibují produkci a akumulaci melaninu v normálních epidermálních buňkách melanocytů. Medicarpin izolovaný z cizrny a z extraktů *Butea monosperma*, *Butea superba* a *P. floribundum*, se analýzou zjistilo, že zlepšují kostní resorpci, osteoklastickou a antikacerogenní aktivitu v buněčných liniích leukémie. Faseollin izolovaný z červených bobů Boue, byl studován pro svůj estrogení a antiestrogení účinek na proliferaci buněk [3].

Nově izolovaný 3-piperidylethoxypterokarpan izolovaný z *Butea monosperma* je potenciální kostní anabolikum, které zlepšuje kvalitu kostí a obnovuje trabekulární mikroarchitekturu u ovariektomizovaných osteopenických potkanů. 3-piperidylethoxy-pterokarpan podporuje diferenciaci osteoblastů a mineralizaci kostní hmoty. V léčbě osteoporózy u žen po nemopauze se využívají i jiné velmi důležité isoflavonoidy jako je genistein, daidzein a ipriflavon [4].

Jediná registrovaná účinná látka je syntetický isoflavonoid Ipriflavon (7-isopropoxyisoflavon) pod obchodním názvem např. Calflavone, Ipriosten, Vosteon a Osteofix, který inhibuje kostní resorpci a je dostupná v některých zemích pro léčbu osteoporózy. Podává se perorálně v dávce 200 mg třikrát denně [5].

6.2. Irilon

Mezi velmi další důležité isoflavonoidy patří irilon, který je využíván pro svou estrogenní potenciaci doplňků stravy, obsahujících jetel červený. Nedávná intervenční studie prokázala výskyt irilonu jako druhého nejhojnějšího isoflavonu vedle daidzeinu v lidské plazmě po konzumaci doplňků stravy na bázi červeného jetele (RCDS), obsahující převážně formononetin, biochanin A a irilon. Pro objasnění významu tohoto zjištění byla v předložené studii zkoumána reprezentativnost isoflavonové kompozice RCDS a estrogenní aktivita irilonu. Tudiž hlavní isoflavony byly kvantifikovány v osmi komerčně dostupných RCDS. Navíc estrogenní aktivity irilonu a dalších isoflavonů byly stanoveny expresí markerového genu v rakovinové linii adenokarcinomu endometria a proliferaci buněk v buňkách MCF-7. Irilon činil 1,8 až 10,9 mg/g obsahu tobolek a 5-18 % ze tří hlavních isoflavonů, což dokazuje obecný výskyt irilonu v RCDS. Kromě toho irilon významně indukoval aktivitu alkalické fosfatasy (ALP), stejně jako pro progesteronové receptory a androgenní receptory mRNA rakovinových buněk. Navíc irilon významně indukoval proliferaci buněk MCF-7. Ani 17β -estradiol-indukovaná aktivita ALP, tak ani E2-indukovaná proliferace buněk MCF-7 nebyla ovlivněna irilonem. ICI 182,780 antagonizoval IRI-indukovaný účinek jak na aktivitu ALP, tak na proliferaci buněk, což naznačuje agonistický účinek estrogenového receptoru. Vzhledem k estrogenní aktivitě isoflavonů červeného jetele (formononetin, biochanin A, prunetin a glycitein) a jejich biotransformačních produktů (daidzein, genistein a ethylfenol) a publikovaných plazmatických hladin isoflavonů po konzumaci RCDS, by mohl irilon přispět přibližně 50 % ekvivalentům 17β -estradiolu odhadnutých pro daidzein [6].

6.3. Genistein

Genistein je přirozený xenoestrogen (isoflavonoid), který může interferovat s vývojem nervových zakončení citlivých na estrogen. Vzhledem k velkému a rostoucímu využívání sójových receptur pro kojence (charakterizovaných vysokým obsahem genisteinu) existují určité obavy, že by vysoká konzumace genisteinu mohla mít za následek narušení některých nervových zakončení a chování orgánů citlivých na estrogen. Předchozí studie prokázala, že orální podávání genisteinu potkaním samicím během pozdního těhotenství a časně laktace významně indukovalo snížení počtu buněk pozitivních na syntézu oxidu dusnatého. V této studii se použil jiný experimentální protokol, který na potkanech napodobuje přímou předčasnou expozici genu genisteinu. Potkaní mláďata obou pohlaví byla krmena buďto olejem, estradiolem nebo genem genisteinu od narození do osmého dne. Oxid dusnatý a vazopresin byly analyzovány u dospělých potkanů. Je zajímavé, že efekt genisteinu byl časově specifický (ve srovnání s předchozí studií). Specifický pro pohlaví, a ne vždy srovnatelný s účinky estradiolu. Toto poslední pozorování naznačuje, že genistein může působit

různými intracelulárními cestami. Současné výsledky naznačují, že účinek přírodních xenoestrogenů na vývoj mozku může být velmi variabilní. Může být ovlivněno množstvím nervových zakončení v závislosti na pohlaví, době expozice, intracelulární dráze a cílových buňkách. To vyvolává obavy z možných dlouhodobých účinků při používání sójových výživových přípravků pro děti, které mohou být v současné době podceňovány [7].

V jiné studii Yazdaniho a spol. genistein zvýšil inhibici růstu a apoptózu buněčných linií v maligním nádoru plic, když byl kombinován s inhibitory EGFR-tyrozinkinasy. U buněk rakoviny prostaty léčených genisteinem vykazovala exprese angiogeneze a geny příbuzné nádorové invazi jako neuropilin, MMP-9, VEGF a TGF- β 2 největší regulaci kontroverzně směrem dolů. Motivace této studie spočívala v hodnocení vlivu genisteinu na přežívání buněk pocházejících z mozku. Tato studie dále naznačuje cíl angiogeneze genisteinu se zaměřením na expresi MMP-2 a VEGF u gliomů s nízkým stupněm a vysokým stupněm karcinogeneze [8].

6.4. Prunetin

U prunetinu byl nedávno zjištěn účinek pro zlepšení funkce střevní epiteliální bariéry *in vitro* pokusech a pro zlepšení celkového zdravotního stavu u sameček druhu *Drosophila melanogaster*. Ovšem příznivé účinky na zdraví *Drosophila melanogaster* byly zprostředkovány za standardních životních podmínek. Vzhledem k tomu, že ztráta intestinální integrity úzce souvisí se snížením životnosti *Drosophila melanogaster*, se bariérová dysfunkce zvyšuje s věkem a je stále třeba objasnit účinky na střevní modulaci v důsledku působení oxidativního nebo patogenního stresu. V této studii byla dospělému samci *D. melanogaster* podávána buď prunetinová nebo kontrolní strava. Byla vyhodnocena exprese funkčního proteinu a exprese antimikrobiálních peptidů indukovaných patogenem, i proliferace kmenových buněk ve střevě. Dále bylo hodnoceno přežití samců po expozici peroxidu vodíku. Příjem prunetinu nevyvolal bakteriální infekci a neochránil mušky před oxidačním stresem. Úroveň exprese mRNA, stejně jako proliferace kmenových buněk, nebyla ovlivněna příjmem prunetinu. Prunetin nezlepšuje odolnost mušek proti těžkým poraněním, exogennímu stresu, a proto se zdá, že funguje, spíše než preventivně, ale terapeuticky, neboť přínosy podporující zdraví se zdají být výlučně omezeny na normální životní podmínky *D. melanogaster* [9].

Prunetin je jedním z představitelů isoflavonové skupiny, která je syntetizována cestou biosyntézy isoflavonoidu z jejího prekurzoru naringenininu. Prunetin vykazuje silnou bioaktivitu a modifikuje zánětlivé procesy, reakci na stres a funkci střevní epiteliální bariéry. Funkce střevní bariéry, zánět a odezva na stres jsou rozhodujícími faktory dlouhověkosti. Prunetin významně zvyšuje celkové přežití u samčího rodu *w*¹¹¹⁸ *Drosophila melanogaster* a současně zlepšuje lezeckou aktivitu, což

naznačuje lepší zdravotní stav. Prunetin-dependentní nárůst aktivace AMPK a regulovaná exprese genu dlouhověkosti Sirtuinu 1 a zdají se být zodpovědnými za prunetin závislé přínosy pro zdraví. Navíc je celkově zdravé střevo zlepšeno konzumací prunetinu, jelikož exprese Relish (Rel) specifická pro střevo, se zvýšila o 49 % oproti kontrole. To naznačuje obecnou výhodu integrity střeva a obranyschopnosti, což je pozitivně spojeno s dlouhověkostí. *Drosophila* je vhodným modelem pro zkoumání účinků sekundárních sloučenin rostlin na integritu střev souvisejících se zánětem a stárnutím. Fyziologie a anatomie střevních tkání savců a *D. melanogaster* vykazují podobné vlastnosti, z nichž každá je složena z enterocytové monovrstvy a enteroendokrinních buněk. Kromě toho je *Drosophila melanogaster* vhodným modelem pro zkoumání vlastní imunity, protože imunitní funkce hmyzu sdílí mnoho podobností s vrozenou imunitní odpovědí savců. Epitelové povrchy orgánů, včetně střev, slouží jako obranyschopnost první linie proti mikroorganismům produkcí antimikrobiálních peptidů (AMP). Důležité je, že ztráta intestinální integrity úzce souvisí se snížením jak střední a maximální délky života *D. melanogaster*. Dysfunkce střevní bariéry se zvyšuje s věkem a předpovídá úmrtí na počátku onemocnění. Dále byla předčasná mortalita spojena se zvýšenou expresí AMP, která souvisí se změnami intestinální imunitní odpovědi, případně změnami exprese Rel. Vzhledem k tomu, že prunetin významně zlepšuje funkce střevní epitelální bariéry v buňkách *in vitro* pokusech a expresi Rel v *in vivo* pokusech, která prodlužuje životnost samčí *D. melanogaster*, se poprvé zkoumala, zda prunetin ovlivňuje zdraví střev samců *Drosophila melanogaster* za oxidačních a infekčních stresových podmínek a tím mohou případně přispět ke zvýšení očekávané délky života [9].

7. ZAŘAZENÍ ROSTLIN DO SYSTÉMU

Tab. 1: Zařazení rostlin do systému [10]

MAGNOLIOPHYTA
Magnoliopsida
Rosidae
Fabales, FABACEAE
<i>Crotalaria bracteata, Neorautanenia mitis, Ononis spinosa, Erythrina excelsa, Erythrina senegalensis, Cicer arietinum, Indigofera heterantha, Caragana changduensis, Andira humilis, Astragalus membranaceus, Derris ferruginea, Tephrosia pumila, Camphylotropis hirtella, Amphimas pterocarpoides, Millettia oblata, Spirotropis longifolia, Oxytropis falcata</i>
Myrtales, MYRTACEAE
<i>Acca sellowiana, Psidium littorale, Psidium guajava</i>
Polygalales, POLYGALACEAE
<i>Polygala molluginifolia</i>
Dilleniidae
Urticales, MORACEAE
<i>Cudrania tricuspidata, Maclura pomifera</i>
Euphorbiales, EUPHORBIACEAE
<i>Antidesma laciniatum</i>
Caryophyllidae
Caryophyllales, AMARANTHACEAE
<i>Achyranthes bidentata</i>
Lamiidae
Solanales, SOLANACEAE
<i>Nicotiana tabacum</i>
Cornidae
Araliales, APIACEAE
<i>Azorella madreporica</i>
Liliopsida
Liliidae
Iridales, IRIDACEAE
<i>Iris kashmiriana, Iris germanica, Gynandris sisyrrinchium</i>
Asparagales, CONVALLARIACEAE
<i>Ophiopogon japonicus</i>

8. PŘEHLED ROSTLIN - konkrétní látky a jejich biologická aktivita

8.1. MAGNOLIOPSIDA - DVOUDĚLOŽNÉ ROSTLINY

8.1.1. *Crotalaria bracteata* Roxb. ex DC.

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoid: Crotakanda

Byl objeven nový typ flavonoidu s názvem crotakanda, který byl nalezen s dalšími složkami flavonoidů. Čtyři isoflavonoidy, pterokarpany a aldehydy kyseliny skořicové byly nalezeny a izolovány ze stonků a kořenů této rostliny, což vedlo k objasnění nalezené struktury a cytotoxické aktivity. Objasnění struktury bylo dosaženo pomocí kombinací spektrofotometrických metod. Látka vykazovala cytotoxickou aktivitu proti MCF-7 buněčné linii a NCI-H187 buněčné linii [11].

8.1.2. *Neorautanenia mitis* (A. Rich) Verdc.

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Neoraudiol, rautandiol A, neodulin, neotenon, pachyrrhizin a 12a-hydroxylrotenon

Extrakcí nanohexanu a chloroformu z hlíz došlo k izolaci nového isoflavonoidu, nazvaného neoraudiol, a dalších pěti známých sloučenin: rautandiolu A, neodulinu, neotenonu, pachyrrhizinu a 12a-hydroxylrotenonu. Struktury nových sloučenin byly stanoveny na základě spektroskopických studií a porovnáním se známými sloučeninami. Izolované sloučeniny vykazovaly širokospektrální antimikrobiální účinnost v rozmezí od 15 do 80 mg/ml, nejvýznamnější aktivitu ($MIC_{15.10} \pm 0.5$ mg/ml) vykazoval neoraudiol [12].

Neorautanenia mitis je polokeř, který se vyskytuje na skalnaté půdě. *N. mitis* pochází ze střední, jižní a západní Afriky a je jedním z deseti druhů rodu *Neorautanenia*. Odvar z kořene *N. mitis* je uváděn v tradiční medicíně jako rybí jed a využívá se pro zabíjení sladkovodních hlemýžďů. Prášková droga z kořene slouží pro svůj insekticidní účinek jako repelent, dále se používá k léčbě syfilis, fragilitě kapilár a na kožní infekci jako jsou svrab a vyrážka. Petrolejové extrakty z kořenů *N. mitis* mají významnou akaricidní aktivitu proti samčím klíšťatům a komárům a vykazují účinek proti larvám komára *Anopheles gambiae* a *Culex quinquefasciatus*. Byla popsána cytotoxická účinnost ethanolového extraktu z *N. mitis* na buňkách prsu a při rakovině plic. Zdá se, že vodný extrakt *N.*

mitis má dávkově závislou antiioeptickou aktivitu při 12,5 a 50,0 mg/ml p.o. u potkanů a mírně zánětlivou aktivitu při 25 a 50 mg/ml p.o. Neotenon, pachyrrhizin, neorautanon, neodulin, nepseudin, 12a-hydroxyl rotenon a rautandiol A a B jsou záměrem zkoumání pro tyto účinky. Struktura neoraudiolu byla stanovena 1D a 2D-NMR, EIMS, UV a IR spektroskopickou analýzou a porovnáním těchto dat s publikovanými hodnotami. Sloučeniny neoraudiolu, rautandiolu A, neodulinu, neotenonu, pachyrrhizinu a 12a-hydroxyrotenonu, byly hodnoceny *in vitro* pokusech pro inhibici jejich růstu na Gram-negativních bakteriích *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a dvou Gram-positivních bakteriích *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a hub, *Candida albicans* a *Aspergillus niger* [12].

8.1.3. *Ononis spinosa* L.

Český název: Jehlice trnitá

Čeleď: Fabaceae

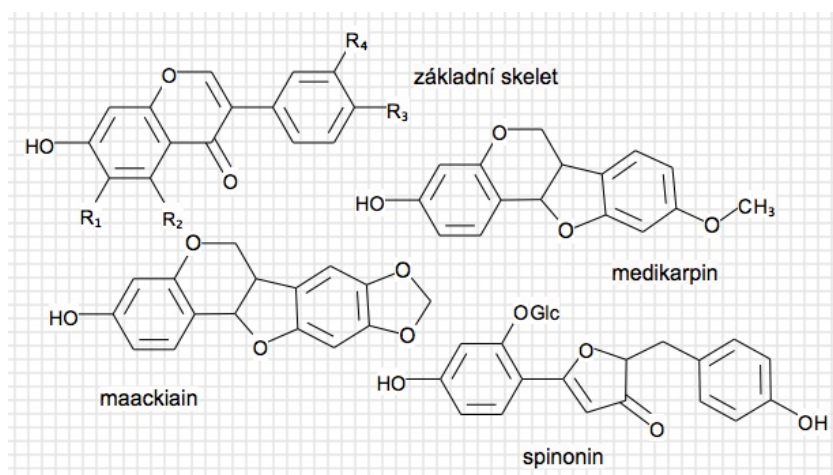
Isoflavonoidy: Formononetin, kalykosin, pseudobaptigenin, maackiain, medikarpin, onogenin, sativanon, genistein a spinonin

Kořen této rostliny se používá v tradiční medicíně po tisíce let. Účinné látky zodpovědné za diuretický účinek jsou však dosud neznámé. Předchozí studie prokázaly, že extrakt z kořene obsahuje isoflavonoidy, avšak pouze několik derivátů isoflavonoidů bylo identifikováno, většinou se spoléhalo na retenční časy nebo UV data. Cílem této studie Gampeho a kol. bylo provést detailní strukturní charakterizaci kompletního isoflavonoidního profilu ve vodném methanolovém extraktu z kořene *Ononis spinosa* pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie, spojené s ionizací elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-ESI-QTOF-MS a HPLC-ESI-MS/MS) a nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií (NMR). Na základě přesných hmotností a fragmentačních vzorců byly identifikovány isoflavony (formononetin, kalykosin a pseudobaptigenin) a pterokarpany (maackiain a medikarpin). Byly izolovány dva další aglykony dihydroisoflavonu, jmenovitě onogenin a sativanon, jejichž struktury byly objasněny NMR analýzou. Nejprve byly detekovány kalykosin, onogenin a sativanon. Na rozdíl od dřívějších prací nebyla přítomnost biochaninu A potvrzena, ale jeho regioizomer kalykosinu a jeho deriváty byly identifikovány. Podobně nebyly detekovány ani deriváty tektorigeninu, avšak byla objasněna izobarová sloučenina sativanon a jeho různé glukosidy. Přítomnost genisteinu a daidzeinu nebyla v extraktu potvrzena. Fragmentační cesty pro onogenin a sativanon byly uvedeny. Ve vodném methanolovém extraktu bylo nalezeno devět glukosidů, šest malých a osm

hlavních glykosidových malonátů, čtyři glukosidacetáty a sedm aglykonů. Celkem bylo úspěšně identifikováno 34 sloučenin [13].

Ononis spinosa je široce rozšířená rostlina v Evropě a ve Středomoří. Kořeny této rostliny mají diuretický účinek. V současné době se na trhu nachází řada kořenových produktů, jsou k dispozici ve formě jednotlivých rostlinných přípravků, v bylinných čajích nebo v tekutých extraktech v kombinaci s jinými diuretickými bylinami. Přípravky z kořene se běžně používají jako infúze pro stimulaci diurézy, pro léčení zánětlivých stavů dolních močových cest a jako lék při poruše ledvin. Tyto indikace byly potvrzeny studiemi na zvířatech, ale zatím nebyly provedeny žádné klinické studie. Přestože bylina byla používána již od starověku, neexistuje žádný důkaz o tom, že aktivní složka kořene zodpovídá za diuretický účinek. Nedávné pokusy *in vivo* potvrdily, že kořenový extrakt nejen zvyšuje vylučovaný objem moči, ale má také antioxidační, analgetické, antimikrobiální a antikancerogenní účinky. Tyto účinky by mohly sloužit jako vysvětlení, proč jsou druhy *Ononis* používané pro léčbu dny, revmatických potíží a externě v lidové medicíně na kožní onemocnění a hojení ran [13].

Fytosteroly, fenolové kyseliny, silice a specifický triterpen, α -onocerin, vedle isoflavonoidů a jejich glukosidů, jsou hlavními složkami v kořeni (obr. 2). Isoflavonoidy jsou fytoestrogeny, kvůli jejich strukturní podobnosti s estradiolem, a mají antioxidační účinnost. Isoflavonoidy navíc mohou hrát důležitou roli při prevenci a léčbě hormonálně závislých nádorů, osteoporózy, kardiovaskulárních onemocnění a civilizačních onemocnění, jako je metabolický syndrom nebo syndrom polycystických vaječníků. V důsledku toho jsou rostliny s vysokým obsahem isoflavonoidů (jako jsou sója nebo červený jetel) hlavním zájmem výzkumů. Zajímavé je, že při tradičním používání *O. spinosa* nebyl pozorován žádný z výše uvedených účinků, a proto se tato studie zaměřila na analýzu isoflavonoidů v kořeni [13].



Obr. 2: Struktura známých isoflavonoidů, nakresleno ChemPencil [13]

Tab. č. 2: Substituenty základního skeletu [13]

	R₁	R₂	R₃	R₄
formononetin	H	H	OCH ₃	H
pseudobaptigenin	H	H	-OCH ₂ O-	-OCH ₂ O-
genistein	H	OH	OH	H
biochanin A	H	OH	OCH ₃	H
tectorigenin	OCH ₃	OH	OH	H

Doposud byly popsány následující isoflavonoidy v kořeni: formononetin, ononin (formononetin 7-*O*-glukosid), pseudobaptigenin glukosid, genistein, 7-*O*-glukosid-6''-*O*-malonát biochinanu A, formononetin 7-*O*-glukosid-6''-*O*-malonát, 2,3-dihydroononin, tektoridin (7-*O*-glukosid tektorigeninu), trifolirhizin (7-*O*-glukosid maackiain) a 7-*O*-glukosid medikarpinu [13].

Z analytického hlediska je hmotnostní spektrometrie jedním z nejvýkonějších nástrojů, neboť poskytuje vysokou citlivost, možnosti spojení s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií. Jednostupňová MS spojená s UV detektorem je zřídka používána pro úplnou strukturní charakterizaci, ale pokud jsou k dispozici standardy nebo referenční data, je efektivní pro potvrzení nebo identifikaci cílových isoflavonoidů. Tandemová hmotnostní spektrometrie poskytuje různé způsoby využití, které mohou být mimořádně užitečné při zkoumání derivátů flavonoidů. Nejvyšší citlivost může být dosažena negativním ionizačním režimem, na druhé straně kladný ionizační režim poskytuje úplnější fragmentační profil strukturně podobných aglykonů. Pomocí aplikace hybridních přístrojů Q-TOF lze provést přesné stanovení hmotnosti. Výsledkem této studie je, že lze vypočítat molekulární vzorec zkoumané látky a diferencovat molekuly izobaru a fragmenty molekul [13].

Při strukturální eluci neznámých molekul je nevyhnutelné použití různých NMR technik. Tato technika je nezbytná pro rozlišení pozičních izomerů flavonoidů a isoflavonoidů s úplným přiřazením aglykonového skeletu. Na druhé straně NMR vyžaduje značně velké množství látek, proto je nutno provést izolaci preparativního vzorku [13].

Předchozí studie o isoflavonoidech v kořeni potvrdily přítomnost hlavních látek, nicméně jejich strukturní identifikace se silně spoléhala na UV data. Navíc byla při extrakci aplikována vysoká teplota, která vylučuje analýzu glukosidů a glukosidových malonátů. Až dosud nebylo vyvinuto žádné úsilí o systematickou identifikaci isoflavonoidního profilu *O. spinosa*. Cílem této studie bylo tedy poskytnout podrobné strukturální informace o isoflavonoidním profilu vodného methanolového extraktu kořene *O. spinosa* pomocí HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ESI-QTOF-MS v pozitivním ionizačním módu a NMR. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je základní

technikou pro separaci flavonoidů a isoflavonoidů. Vzhledem k tomu, že izokratické eluování je obvykle nedostatečné k oddělení sloučenin s jemnými rozdíly, je výhodné pro separaci optimalizovaná gradientová eluce [13].

8.1.4. *Erythrina excelsa* Baker a *Erythrina senegalensis* DC.

Čeleď: Fabaceae

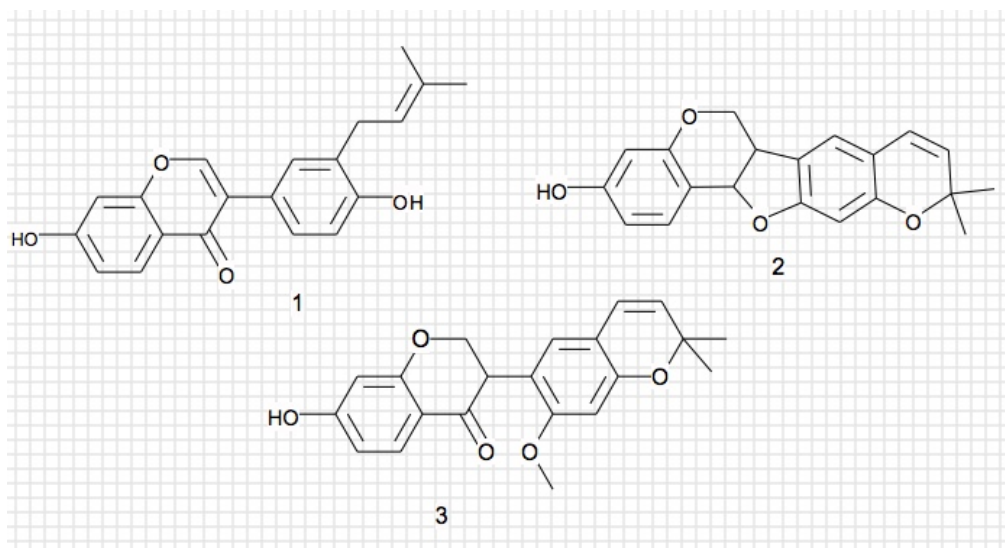
Isoflavonoidy: Neobavaisoflavon, sigmoidin H a izoneorautenol

Odolnost rakovinových buněk proti chemoterapii se stala celosvětovým problémem. Přirozeně se vyskytující isoflavonoidy mají různé biologické účinky včetně antikacerogenních účinků. Tato studie Kueteho a kol. byla zaměřena na vyšetření cytotoxicity a způsobů působení tří přirozeně se vyskytujících isoflavonoidů: neobavaisoflavonu (1), sigmoidinu H (2) a pterokarpanu, který je zvláštním typem isoflavonoidu, isoneorautenolu (3) proti řadě devíti buněčným rakovinovým liniím, včetně různě citlivých a lékově rezistentních fenotypů [14].

Cytotoxicita obsahových látek byla stanovena za použití redukčního testu resazurinu, zatímco homogenní luminiscenční testy byly použity k detekci aktivace kaspasy 3/7, kaspasy 8 a kaspasy 9 v buňkách ošetřených isoneorautenolem. Průtoková cytometrie byla použita pro analýzu buněčného cyklu, analýzu a detekci apoptotických buněk, analýzu potenciálu mitochondriální membrány (MMP) a měření reaktivních druhů kyslíku (ROS) [14].

Isonorautenol vykazoval signifikantní cytotoxicitu vůči citlivým a léčivům rezistentním buněčným liniím. Sloučeniny neobavaisoflavonu a sigmoidinu H byly selektivně aktivní a byly získány na 6/9 a 4/9 buněčných liniích. Účinek proti CCRF-CEM a HCT116 buňkám vykazovala sloučenina neobavaisoflavonu. Proti U87MG buňkám a proti buňkám HCT116 vykazoval účinek sigmoidin H. Proti buňkám MDA-MB 237BCRP a U87MG vykazoval účinek izoneorautenol. Proti CCRF-CEM a CEM/ADR5000 buňkám působil doxorubicin jako kontrolní léčivo. Buňky MDA-MB-231 transfekované BCRP, buňky HCT116 a U87MG.ΔEGFR, byly přecitlivělé na sloučeninu izoneorautenolu ve srovnání s jinými buněčnými liniemi. Apoptóza indukovaná isoneorautenolem v buňkách CCRF-CEM prostřednictvím aktivace kaspás 3/7, 8 a 9, je stejná jako ztráta MMP a zvýšená produkce ROS [14].

Cytotoxicita studovaných isoflavonoidů, zejména pterokarpanu isoneorautenolu, si zaslouží podrobnější zkoumání v budoucnu s cílem vyvinout nové antikacerogenní léky proti citlivým fenotypům, odolným vůči lékům [14].



Obr. 3: Chemické struktury neobavaisoflavonu (1), signoidinu H (2) a isoneorautenolu (3), nakresleno ChemPencil [14]

8.1.5. *Cicer arietinum* L.

Český název: Cizrna beraní

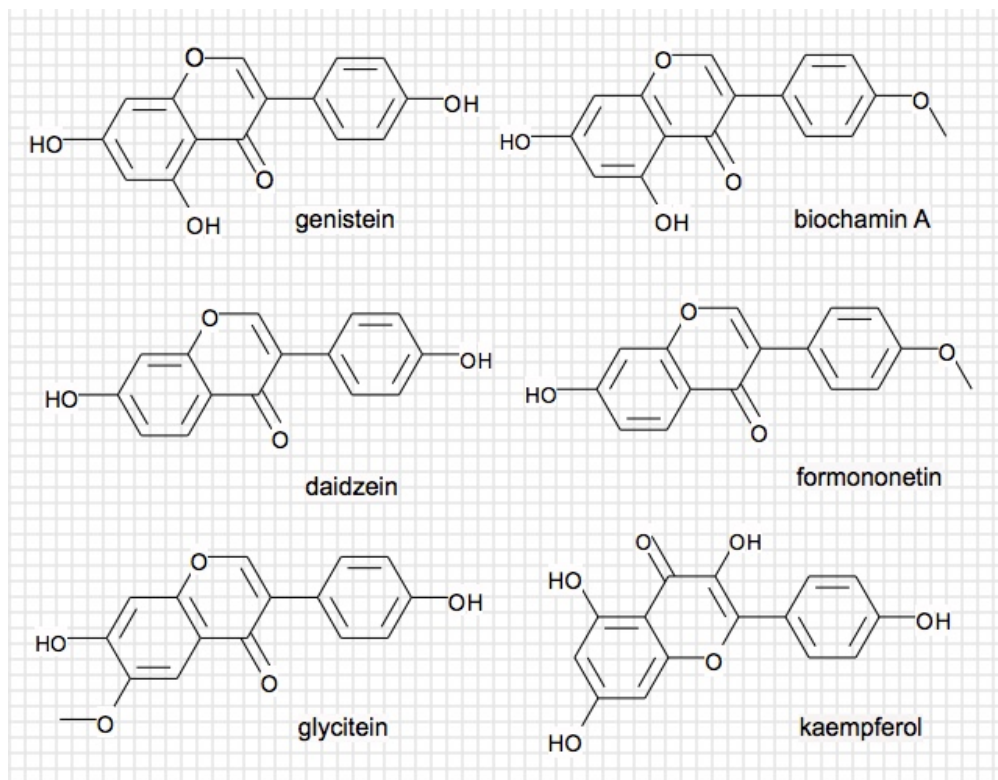
Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Biochanin A, formononetin, genistein a kempferol

Isoflavony v koncentrátech cizrny byly analyzovány a porovnány s klasickou moukou. Proteinové koncentráty byly připraveny alkalickou extrakcí a precipitací proteinu při izoelektrickém pH. HPLC analýza odhalila, že koncentráty byly obohaceny isoflavony. Koncentrace celkových isoflavonů činila 45 a 10 µg/g v koncentrátech a mouce. Isoflavony v mouce byly během alkalické extrakce hydrolyzovány na odpovídající aglykony. Zatímco hydrolyzovatelné deriváty biochaninu A představují 90 % celkového množství isoflavonů v mouce, aglykon biochaninu A byl hlavním isoflavonem v koncentrátech. V menších koncentracích byly nalezeny sloučeniny formononetinu, genisteinu a flavonol kempferolu. Koncentrace bílkovin v cizrně představuje tedy ještě lepší zdroj isoflavonů podporujících zdraví v porovnání s klasickou moukou [15].

Isoflavony jsou třídou flavonoidů charakteristických pro čeleď Fabaceae, která zahrnuje sóju, hrášek, fazole, cizrnu, čočku a další. Isoflavony v sóji, jmenovitě genistein, daidzein a glycitein (obr. 4), jsou odpovědné za vlastnosti podporující zdraví. Mezi účinky patří snížený výskyt kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a zlepšení symptomů menopauzy. Zdravotní přínos těchto isoflavonů byl značně studován, protože sójové potraviny jsou nezbytné ve stravování většiny asijských zemí a stávají se stále populárnějšími v západních zemích. Kromě toho se sójová mouka a bílkovinné koncentráty používají v mnoha potravinářských výrobcích jako zdroj vysoce

kvalitních bílkovin s dobrými funkčními vlastnostmi a bez nasycených tuků nebo cholesterolu [15].



Obr. 4: Hlavní isoflavonoidy sóji a cizrny, nakresleno ChemPencil [15]

Cizrna je v mnoha zemích nejen základním jídlem, ale je také levným zdrojem bílkovin s velmi dobrými funkčními vlastnostmi. Koncentráty a izoláty z cizrny, mají potencionální vlastnosti podporující zdraví, i když koncentrace isoflavonů v sóji je vyšší. Celkový obsah polyfenolu v cizrně a sóji je velmi podobný, proto byly u různých odrůd cizrny a sóji hlášeny celkové koncentrace polyfenolu 0,5 až 6,8 mg/g a 1,5 až 5,6 mg/g. Různobarevné desi odrůdy cizrny, typické pro Indii, mají vyšší obsah polyfenolů a flavonoidů než odrůdy béžové a smetanové barvy, které jsou typické pro odrůdy kabuli, které jsou populárnější v jiných částech světa, kam patří Blanco lechoso, castellano, pedrosillano a venoso andaluz jsou čtyřmi hlavními kultivary, které se tradičně pěstují ve Španělsku [15].

Pro cizrnu je charakteristický vysoký obsah biochaninu A a nižší obsah biochaninu B, více známého jako formononetin. Biochaniny A a B byly pojmenovány podle hindského slova pro cizrnu. Mají stejnou chemickou strukturu jako genistein a daidzein, s výjimkou toho, že mají methylovanou 4'hydroxylovou skupinu (obr. 4). Tyto isoflavony byly také středem pozornosti pro vlastnosti podporující zdraví. Nejvíce zajímavé je, že biochanin A a formononetin mohou být demethylovány na genistein a daidzein, respektive střevní mikroflórou a játry [15].

Polyfenoly byly extrahovány z bílkovinných koncentrátů klasické mouky. Metoda, která byla použita pro extrakci, umožňuje obnovit flavonoidní aglykony a glykosidy. Alikvotní podíly

extraktů byly podrobeny hydrolyze v HCl před analýzou za účelem uvolnění aglykonů z glykosidů. Na kvantifikaci jednotlivých flavonoidů, jak je popsáno v materiálech a metodách, byla použita reverzní fáze HPLC s UV detekcí [15].

Všechny flavonoidy, identifikované v kukuřičné mouce, byly isoflavony, s výjimkou flavonolu kempferolu. V extraktech odpovídajících bílkovinným koncentrátům nebyly nalezeny žádné další isoflavony. Vzorky extraktů z mouky byly také podrobeny HPLC/MS/MS analýze, která poskytla identifikaci píků, které neodpovídají žádným z dostupných standardů. Jednalo se o hexosid biochaninu A a dva nedeterminované deriváty biochaninu A a byly kvantifikovány odezvy odpovídající aglykonu biochaninu A. Hydrolyza také uvolnila malé množství formononetinu a dokonce i menší množství genisteinu a kempferolu [15].

Relativní isoflavonová kompozice v hydrolyzovaných i nehydrolyzovaných bílkovinných koncentrátech byla velmi podobná složení hydrolyzovaných extraktů z mouky. Obsah biochaninu A nebyl významně odlišný v extraktech nehydrolyzovaných a hydrolyzovaných koncentrátů. Nicméně se zdá, že některé glykosidy genisteinu, formononetinu a kempferolu zůstávají v koncentrátech a uvolňují se hydrolyzou [15].

Cílem této práce bylo analyzovat isoflavony v bílkovinných koncentrátech cizrny ve srovnání s klasickou moukou. Byly popsány a nedávno přezkoumány změny isoflavonové kompozice sóji během zpracování pro přípravu proteinových izolátů a jiných antikaceroenních produktů, ale tato informace nemůže být přímo extrapolována na cizrnu, protože celkové chemické složení cizrny je jiné než u sójových bobů [15].

8.1.6. *Indigofera heterantha* Wall.

Český název: Modřil různokvětý

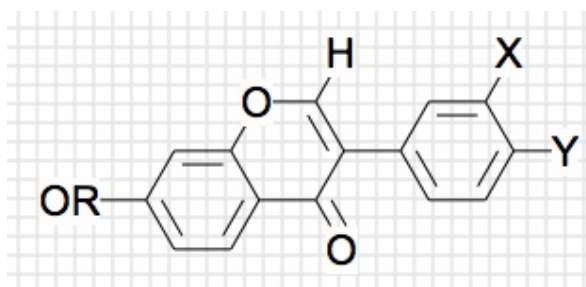
Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: 7-hydroxy-3'-methoxyisoflavon

Nový isoflavon 7-hydroxy 3'-methoxyisoflavon byl izolován ze semen *Indigofera heterantha*. Struktura této nové sloučeniny byla stanovena pomocí spektroskopických technik 1D, 2D-NMR a hmotnostní spektrometrií [16].

Indigofera heterantha, obecně známý jako *Indigo Himalayan*, je listnatý keř rozložený po celé tropické oblasti zeměkoule. V Pákistánu tvoří dvacet čtyři druhů. Přírodní produkty, jako jsou triterpeny, steroidy, alkaloidy, flavonoidy, lignin a acylfloroglucinoly, jsou hlavními sloučeninami. Byly také

izolovány další sloučeniny, jako jsou saponiny, tanin, chinin, kyselina kávová, kyselina galová, rutin, myricetin, kvercitrin, myricetin a galangin. Některé druhy tohoto rodu obsahují toxické sloučeniny, jako je 3-nitropropionát, který působí jako inhibitor inaktivátoru sukcinátdehydrogenasy. Listy této rostliny jsou účinné proti abscesům, zatímco kořeny se používají k léčbě bolesti zubů a vředů v ústech. Kořeny jsou žvýkány při těžké bolesti zubů a apatii. Rostlinný extrakt se používá pro přípravu silic, používané na lupy, syfilis, psoriázu, ekzém, popáleniny, vředy, rány a další. Rostlinný extrakt se také používá jako protilátka proti hadímu uštknutí. Cílem tohoto výzkumu bylo provést podrobnou fytochemickou analýzu této rostliny. Zde popsáný isoflavon není dříve znám ze žádného zdroje. Představuje se zde kombinovaná experimentální a teoretická studie Rahmana kol. o izolovaném isoflavonu [16].



Obr. 5: Základní struktura. Nakresleno pomocí aplikace ChemPencil [16]

8.1.7. *Caragana changduensis* Lion f.

Čeleď: Fabaceae

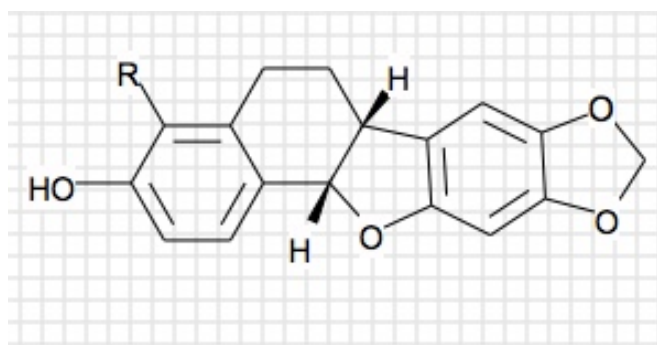
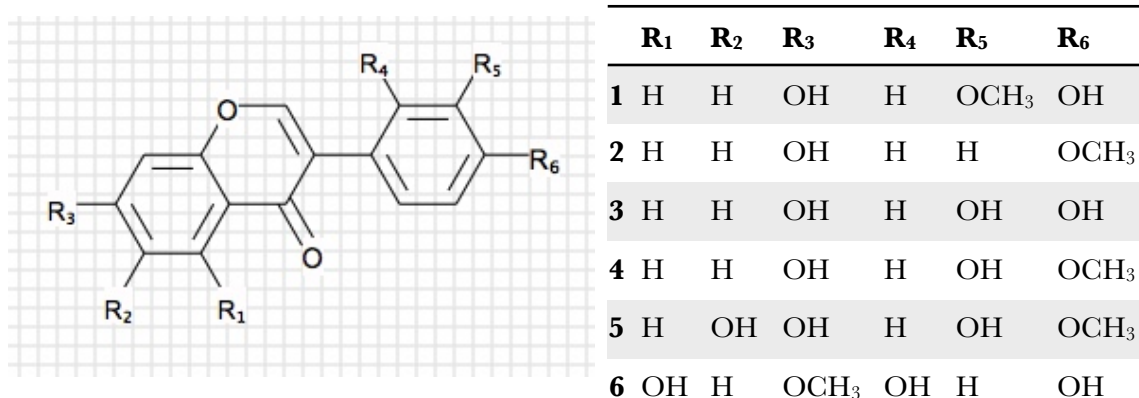
Isoflavonoidy: 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyisoflavon, 7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon, 7,3',4'-trihydroxyisoflavon, kalykosin, 6,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-isoflavon, kajanin, maackiain, (6aR,11aR)-4-hydroxy-3,9-dimethoxypterokarpan, (6aR,11aR)-3,4-dihydroxy-9-methoxypterokarpan, (6aR,11aR)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterokarpan, isolikvirigenin, (3R)-vestitol, 2,3-bis[(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-methyl]-1,4-butanediol, 5-methoxy-(+)-isolariciresinol a (+)-isolariciresinol

Fytochemickou analýzou srstnatých kmenů *Caragana changduensis* došlo k izolaci a charakterizaci šesti isoflavonů, čtyř pterokarpanů, tří lignanů, jednoho chalkonu a jednoho isoflavanu. Mezi nimi byly sloučeniny 3, 5, 9, 10 a 12-14, které byly získány nejprve z rodu *Caragana*. Byl mimo jiné také shrnut chemotaxonomický význam těchto sloučenin [17].

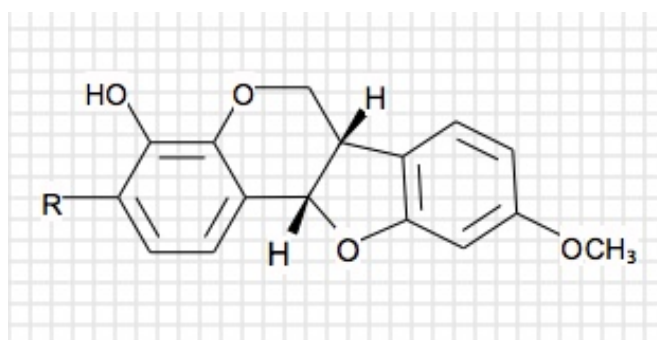
Caragana je rod zahrnující asi sto druhů rostlin široce rozšířených v Evropě a Asii. V Číně bylo doposud identifikováno 64 druhů rostlin. Více než deset druhů tohoto rodu má dlouhou historii v lidové medicíně východní Asie, převážně v tradiční čínské medicíně a tibetské medicíně pro léčbu

různých onemocnění, včetně kontusí, neuralgie, aterosklerózy, artritidy, zánětu a revmatismu. *Caragana changduensis* je trvalý keř, místně známý jako "Zuomuxing", se používá jako tibetský lék k léčbě polycytemie, hypertenze a menstruačních poruch. Rostliny byly shromažďovány v Changdu v Číně a byly ověřeny doktorem Wanyu Huangem, tibetskou tradiční lékařskou vysokou školou [17].

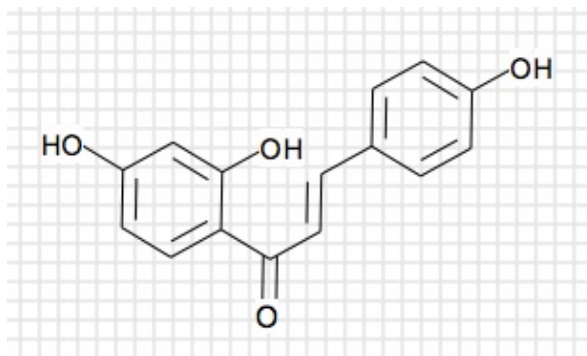
Obr. 6 a tab. 3: Chemická struktura a substituenty sloučenin 1-6, nakresleno ChemPencil [17]



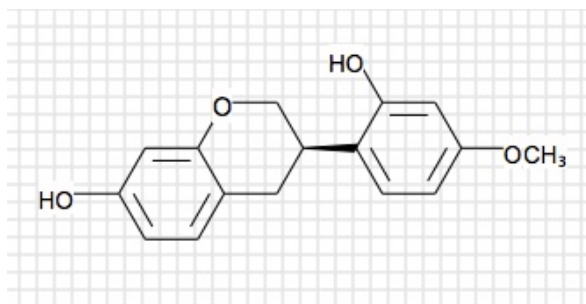
Obr. 7: Chemická struktura sloučenin 7 ($R=H$) a 10 ($R=OH$), nakresleno ChemPencil [17]



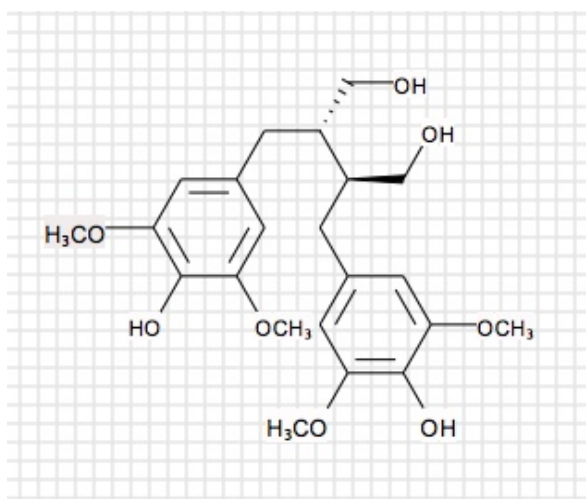
Obr. 8: Chemická struktura sloučenin 8 ($R=OCH_3$) a 9 ($R=OH$), nakresleno ChemPencil [17]



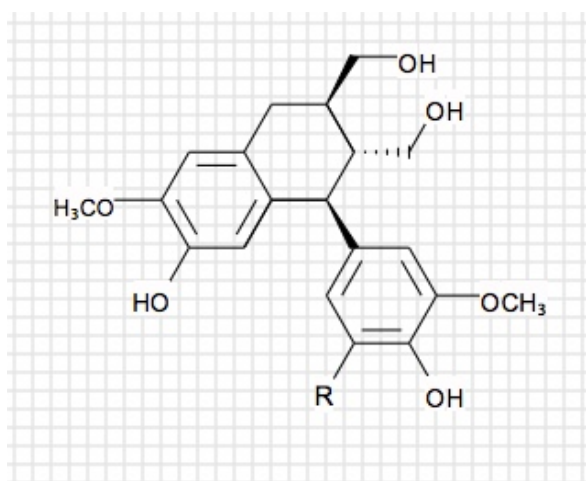
Obr. 9: Chemická struktura isoliquiritigeninu, nakresleno ChemPencil [17]



Obr. 10: Chemická struktura (3*R*)-vestitolu, nakresleno ChemPencil [17]



Obr. 11: Chemická struktura 2,3-bis[(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-methyl]-1,4-butanediol, nakresleno ChemPencil [17]



Obr. 12: Chemická struktura sloučenin 14 ($R=OCH_3$) a 15 ($R=H$), nakresleno ChemPencil [17]

Chemické struktury sloučenin byly identifikovány spektroskopickými metodami a porovnáním jejich údajů s údaji uvedenými v literatuře. Byly objasněny struktury: 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyisoflavon (1), 7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon (2), 7,3',4'-trihydroxyisoflavon (3), kalykosin (4), 6,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-isoflavon (5), kajanin (6), maackiain (7), (6*aR*,11*aR*)-4-hydroxy-3,9-dimethoxypterokarpan (8), (6*aR*,11*aR*)-3,4-dihydroxy-9-methoxypterokarpan (9), (6*aR*,11*aR*)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterokarpan (10), isolikviritigenin (11), (3*R*)-vestitol (12), 2,3-bis[(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-methyl]-1,4-butanediol (13), 5-methoxy-(+)-isolariciresinol (14) a (+)-isolariciresinol (15) [17].

Chemické složení rodu *Caragana* ukázalo, že nejvíce charakteristické sloučeniny jsou avonoidy. Tyto výsledky podporují stávající údaje o chemotaxonomickém výzkumu rodu *Caragana* na základě toho, že sloučenina 7-hydroxy-4'-methoxyisoflavonu se vyskytuje značně v rodu *Caragana intermedia*, *Caragana microphylla*, *Caragana sinica*, *C. microphylla*, *Caragana conferta*, *Caragana jubata*, *Caragana tangutica* a *Caragana arborescens*. Sloučenina kajanin byla nalezena v *Caragana ambigua*. Předchozí literatura odhalila, že *C. jubata* a *C. tangutica* jsou bohaté na isoflavony a pterokarpany. Sloučeniny 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyisoflavonu, kajaninu a maackiainu byly předtím izolovány z *C. jubata* a sloučeniny kajaninu, maackiainu, (6a*R*,11a*R*)-4-hydroxy-3,9-dimethoxypterokarpanu a isolikviritigeninu, byly získány z *C. tangutica*. Výskyt sloučenin 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyisoflavonu, kajaninu, maackiainu, (6a*R*,11a*R*)-4-hydroxy-3,9-dimethoxypterokarpanu a isolikviritigeninu v *C. changduensis* potvrzuje blízké chemotaxonomické vztahy mezi třemi druhy *Caragana*. Je pozoruhodné, že tyto tři druhy mají podobné rozdělení především v Qinghai-Tibetské plošině a přilehlých oblastech Číny [17].

Sloučenina 6,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-isoflavonu, získaná z nepálského propolisu, může sloužit jako snadno detekovatelný chemotaxonomický marker, usnadňující identifikaci *C. changduensis*, protože nebyla doposud známá žádná sloučenina jako rostlinný metabolit. Sloučeniny 7,3',4'-trihydroxyisoflavonu a (3*R*)-vestitolu by mohly být považovány za chemotaxonomicky významné pro diferenciaci *C. changduensis* od jiných druhů *Caragana*, protože dosud nebyly izolovány od jiných druhů tohoto rodu [17].

Sloučenina (6a*R*,11a*R*)-3,4-dihydroxy-9-methoxypterokarpanu byla získána z *Taverniera abyssinica* a *Dalbergia sissoo* a sloučenina (6a*R*,11a*R*)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterokarpanu byla získána z *Dalbergia spruceana* a *Psoralea arborescens*. Výskyt sloučenin (6a*R*,11a*R*)-3,4-dihydroxy-9-methoxypterokarpanu a (6a*R*,11a*R*)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterokarpanu v rodech, které patří do čeledi Fabaceae, poukazuje na schopnost biosyntézovat pterokarpany [17].

Ze tří lignanů izolovaných v této studii byly sloučeniny 2,3-bis[(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-methyl]-1,4-butanediolu a 5-methoxy-(+)-isolariciresinolu izolovány z rodu *Caragana* poprvé. Sloučeniny 5-methoxy-(+)-isolariciresinolu a (+)-isolariciresinolu se obvykle vyskytují ve stejné rostlině a (+)-isolariciresinol byl také izolován z *Caragana rosea*. Sloučenina 2,3-bis[(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-methyl]-1,4-butanediolu byla nalezena v *Annona senegalensis*, *Phacellaria compressa* a *Acanthopanax senticosus* [17].

Výsledky studie Suny a kol. naznačují blízké fylogenetické a chemotaxonomické vztahy mezi *C. changduensis* a jinými druhy v této čeledi [17].

8.1.8. *Andira humilis* Mart. ex Benth

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Biochanin A 7-O-β-D-apiofuranosyl-(1→5)-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid, biochanin A 7-O-β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid, biochanin A 7-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid, kempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)]-β-D-galaktopyranosid, biochanin A 7-O-β-D-glukopyranosid, genistein, pratensein, dihydrogenistein a kempferol

Rod *Andira*, který se skládá z asi třiceti druhů, je distribuován v tropických oblastech amerického a afrického kontinentu. Je známo, že v Brazílii se vyskytuje dvacet sedm druhů tohoto rodu, většinou v oblasti Amazonie, kde jsou populárně známé jako “angelim” [18].

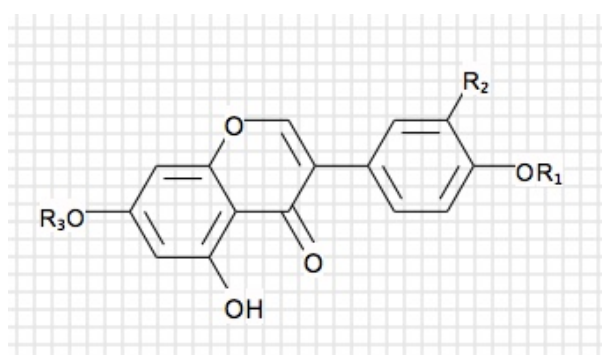
Pro *Andira humilis* nebyly dříve hlášeny žádné fytochemické nebo biologické studie. Nicméně předchozí práce na tomto rodu odhalily výskyt isoflavonoidů v *A. inermis*, *A. anthelmia*, *A. fraxinifolia*, *A. surinamensis* a *A. parviflora*, přičemž nejznámějšími složkami jsou isoflavony a jejich glykosidy. Některé z těchto sloučenin vykazují antiplasmodiální a antihelmintické účinky. Některé triterpenoidy, flavonoly a flavanonolové glykosidy a 2-aryl-3-hydroxymethylbenzofurany a tři deriváty arylbenzofuran-3-karbaldehydu vykazovaly antiplasmodiální účinky [18].

Vysušené kořeny na vzduchu a prášková droga byly extrahovány při pokojové teplotě v ethanolu. Po zahuštění ve vakuu byl zbytek rozdělen mezi směs hexan/CH₃CN/CHCl₃/H₂O. Fáze hexan/CHCl₃ byla chromatografována na sloupci silikagelu, čímž bylo získáno osm frakcí. Biochanin A (1) se získá z frakce II. Frakce III se dále rozdělí za vzniku genisteinu (6), pratenseinu (7) a dihydrogenisteinu (10). HPLC analýza poskytla tyto isoflavonoidy: Biochanin A 7-O-β-D-glukopyranosid (2), kempferol (8), biochanin A 7-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid (4), biochanin A 7-O-β-D-apiofuranosyl-(1→5)-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid (5), biochanin A 7-O-β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosid (3) a kempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)]-β-D-galaktopyranosid (9). Struktury izolovaných sloučenin byly stanoveny na základě 1D a 2D-NMR spektra a porovnány s příslušnými údaji uvedenými v literatuře [18].

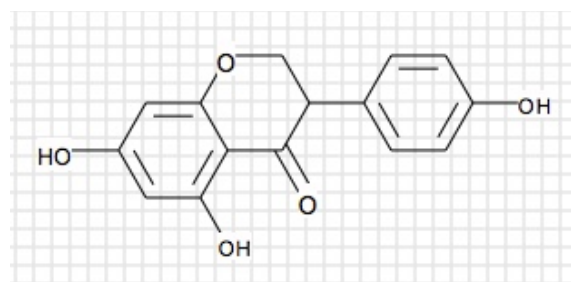
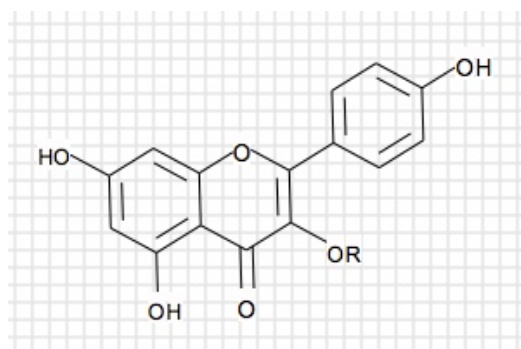
Po izolaci isoflavonu biochaninu A a jeho glykosidů se popsaly jejich fungicidní účinky proti kmenům *Candida* a *Cryptococcus neoformans* a také pro jejich toxicita proti *Artemia salina*. Sloučeniny 2-5 vykazovaly slabé fungicidní účinky proti pěti kmenům, zatímco biochanin A se prokázal být neúčinný. Na druhou stranu sloučenina biochaninu A byla toxická pro larvy slané krevetky s hodnotami LD₅₀ = 26,5 µg/ml, zatímco sloučeniny 2-5 neměly v tomto testu žádnou toxicitu.

Tyto výsledky naznačují, že sacharidové skupiny vázané na isoflavon-aglykon jsou odpovědné za jejich fungicidní účinky a současně činí tyto sloučeniny netoxické pro *A. salina* [18].

Obr. 13 a tab. 4: Chemická struktura a substituenty sloučenin, nakresleno ChemPencil [18]



	R₁	R₂	R₃
1	CH ₃	H	H
2	CH ₃	H	Glu
3	CH ₃	H	xyl(1→6)glu
4	CH ₃	H	api(1→6)glu
5	CH ₃	H	api(1→5)api(1→6)glu
6	H	H	H
7	CH ₃	OH	H



Obr. 14 a 15: Chemická struktura sloučenin 8 ($R=H$), 9 ($R=rhal(1\rightarrow6)[xyl(1\rightarrow2)]gal$) a dihydrogenisteinu, nakresleno ChemPencil [18]

8.1.9. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Kalykosin-7-O-β-D-glukosid, ononin, (6αR,11αR)-9,10-dimethoxypterokarpan-3-O-β-D-glukosid, (3R)-2'-hydroxy-3'4'-dimethoxyisoflavan-7-O-β-D-glukosid, kalykosin a formononetin

Kořen *Astragalus membranaceus*, známý jako “huang-qi”, je jedním z nejrozšířenějších čínských bylinných léčiv pro prevenci a léčbu ischemických onemocnění myokardu. Mechanismy upravující jeho terapeutické účinky jsou však do značné míry neznámé [19].

Cílem této studie Ma a kol. bylo obeznámit kardioprotektivní účinky extraktu z kořene *Astragalus membranaceus* na myokardiální ischemii a prozkoumat její základní mechanismy v signální kaskádě zprostředkované ROS *in vivo* a *in vitro* pokusech [19].

Nalezené struktury deseti hlavních aktivních složek v extraktu *Astragalus membranaceus*: čtyři saponiny: astragalosid IV, astragalosid I, astragalosid II a astragalosid III a šest flavonů: kalykosin-7-*O*- β -D-glukosid, ononin, (6 α R,11 α R)-9,10-dimethoxypterokarpan-3-*O*- β -D-glukosid, (3R)-2'-hydroxy-3,4'-dimethoxyisoflavan-7-*O*- β -D-glukosid, kalykosin a formononetin [19].

Saponiny z extraktu *Astragalus membranaceus* byly analyzovány pomocí HPLC. Testy kardioprotektivních účinků a jejich mechanismů byly prováděny *in vivo* a *in vitro* pokusech. *In vivo* byl potkaní model perzistující ischemie myokardu produkovan okluzí levé přední sestupné koronární arterie. *In vitro* byl kardiomyocytový model oxidativního stresu napodoben přímým donorem volných radikálů H₂O₂ [19].

Zvýšené riziko infarktu myokardu a zvýšené sérové hladiny laktátdehydrogenasy (LDH), izoformy MB kreatinkinasy (CK-MB) a srdečního troponinu (cTnI), byly významně sníženy preventivní léčbou pomocí extraktu *Astragalus membranaceus*. Navíc se radikálně zlepšila funkce srdce, posuzovaná pomocí vyvinutého tlaku v levém ventrikulárním a koncového diastolického tlaku levé komory. Byla snížena hladina biomarkeru oxidativního stresu, malondialdehydu (MDA) a byl stimulován antioxidační enzym, superoxid dismutasa (SOD). *In vitro*, H₂O₂-spuštěná myokardiální buněčná smrt a cytoplazmatické Ca²⁺ kationty, byly blokovány léčbou pomocí extraktu z *Astragalus membranaceus*. Dále blokátor kanálu K_{ATP} (5-HD, glibenklamid) zablokoval antiapoptotický ochranný účinek extraktu *Astragalus membranaceus* na kardiomyocytech poškozených H₂O₂ [19].

Ischemie myokardu je jedním z hlavních patologických jevů ischemického kardiovaskulárního onemocnění, což je hlavní příčina smrti. Patogeneze poškození v ischemii myokardu má mnoho mechanismů. Anatomické změny a rozdíly biochemických markerů pro ischemické poškození buněk myokardu a úmrtí, byly již dobře charakterizovány. Kardiální dysfunkce je generována v myokardiální ischemii a ztráta energetických substrátů při ischemii myokardu vede k tvorbě reaktivních druhů kyslíku (ROS). Vysoká hladina ROS je škodlivá a může indukovat řadu kardiomyocytárních abnormalit [19].

Na základě ROS, která hraje roli v patogenezi ischemie myokardu, byl proveden větší počet studií pro studium souvisejících mechanismů, pro prevenci a léčbu ischemie myokardu. Mitochondrie jsou pravděpodobným zdrojem nadměrné generace ROS. ROS zvyšuje lipidovou peroxidaci, poškození DNA a další přímé buněčné poranění, která vedou k apoptóze buněk. Proto úspěšné antioxidační intervence zaměřené na snížení hladin ROS nabízejí náhled na zpomalení nebo prevenci vzniku ischemické choroby srdeční. Nedávné studie naznačují, že aktivace mitochondriálních kanálů draslíku citlivých na ATP (mito-K_{ATP}) a obnovení homeostázy Ca²⁺ kationtů, mají kardioprotektivní účinek proti ischemickému poškození myokardu [19].

Kořen *Astragalus membranaceus* (Radix Astragali), byl zkoumán pro své pozitivní účinky na myokardiální ischemická onemocnění. Laboratorní studie ukázaly, že *Astragalus membranaceus* a jeho extrakty, jsou schopny chránit myokardiální buňky před poškozením vyvolaným isoproterenolem, viry, autoimunitní odpovědí a mají potenciální ochranný účinek proti kardiotoxicitě daunorubicinu, u kterého bylo prokázáno, že vyvolá uvolnění volných radikálů a apoptózu u kultivovaných neonatálních kardiomyocytů. Astragalosid IV, saponinová kompozice *Astragalus membranaceus*, má silný ochranný účinek proti ischemickému reperfučnímu poškození. Nicméně je k dispozici málo informací o preventivních účincích extraktu *Astragalus membranaceus*, které zahrnují dva typy hlavních a aktivních složek v *Astragalus membranaceus*, tj. saponiny a flavony, na akutní ischemii myokardu. Základní a podrobné mechanismy kardioprotektivních účinků přípravků *Astragalus membranaceus* zůstávají do značné míry neznámé [19].

Cílem této současné studie bylo zhodnotit, zda předběžná léčba extraktem *Astragalus membranaceus* produkuje kardioprotektivní účinky v modelu akutní ischemie myokardu, s použitím anatomických indexů a biochemických markerů; zhodnotit, zda se srdeční funkce léčby pomocí extraktu *Astragalus membranaceus* zlepšuje použitím hemodynamických parametrů; prozkoumat účinky extraktu *Astragalus membranaceus* na oxidační stres a antioxidační obranu v myokardu během ischemie *in vivo* nebo *in vitro* pokusech; a stanovení, zda inhibice přílivu vápenatých kationtů a aktivace mito-K_{ATP} se částečně podílejí na antioxidační obraně [19].

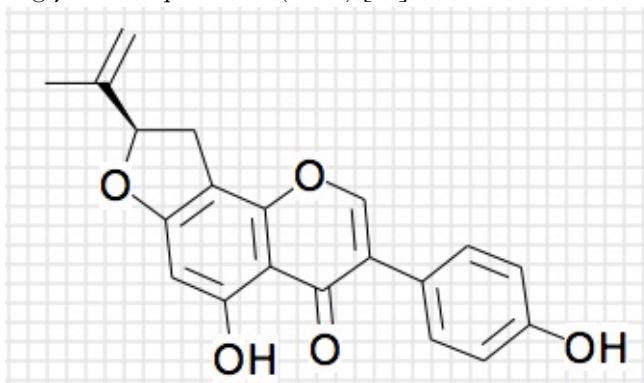
8.1.10. *Derris ferruginea* (Roxb.) Benth.

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoid: Derrisisoflavon G, 5,3',4'-trihydroxy-6-(γ,γ -dimethylallyl)-6'',6''-dimethylpyrano-(2'',3'':7,8)-flavanon, dorsmanin I, lonchokarpol A, 6,8-diprenyleriodiktyol, genistein, pratensein, prunetin, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyisoflavon, koniferylaldehyd, kyselina 4'-methoxyskořicová, lupiwighteon a 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyfenyl)-8-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-4H-chroman-4-on

Nový isoflavonoid 5-hydroxy-3-(4-hydroxyfenyl)-8-isopropenyl-8,9-dihydro-4H-furo-[2,3-H]-chroman-4-on, nazvaný derrisisoflavon G, čtyři známé prenylované flavanony, čtyři známé isoflavonoidy a dva fenolové deriváty, byly izolovány ze surového extraktu z kmene a listů *Derris ferruginea*. Sloučeniny byly identifikovány za použití spektroskopických metod, zatímco jednoznačné strukturální přiřazení derrisisoflavonu G bylo provedeno hemisyntézou. Některé sloučeniny vykazovaly silnou *in vitro* antiparazitickou účinnost proti *Plasmodium falciparum* a

Leishmania major, ale s nízkou selektivitou, zatímco jiné sloučeniny výrazně inhibovaly tvorbu pokročilých konečných glykačních produktů (AGE) [20].



Obř. 16: Chemická struktura derrisisoflavonu G, nakresleno pomocí ChemPencil [20]

Derris je rod s asi 250 druhy, které jsou široce rozšířeny v tropických oblastech Afriky a Asie. Tyto rostliny se tradičně používají jako pesticidy a rybí jedy. Flavonoidy, zejména prenylované flavonoidy a isoflavonoidy, jako jsou rotenoidy, se často vyskytují v tomto rodu. Tyto sekundární metabolity jsou spojeny se širokým spektrem biologických účinků, včetně inhibice α -glukosidasy, ale také účinky insekticidní, cytotoxické a antioxidační. *Derris ferruginea*, také nazvaný *Robinia ferruginea*, je vytrvalá rostlina nacházející se v říčních lesích a houštinách, rostoucí na horských svazích dolů a vyznačující se hustě zrzavými pýřitými větvemi. Izolace rotenonu z kořenů *D. ferruginea* byla popsána již dávno a nedávno se popsala účinná metoda čištění bioaktivního kajaflavanonu z kůry kmenů tohoto druhu. V průběhu výzkumů o této rostlině se zde uvádí izolace, strukturální objasnění a hemisyntéza nového prenylovaného isoflavonoidu z CH_2Cl_2 extraktu ze stonků *D. ferruginea* spolu s identifikací deseti známých sloučenin. Jejich struktury byly stanoveny pomocí 1D a 2D-NMR spektroskopii a HRMS analýzy. Dále sloučeniny vykazovaly *in vitro* antiparazitickou aktivitu stejně jako schopnost inhibovat tvorbu AGE [20].

Purifikací extraktu CH_2Cl_2 ze sušené drogy kmenu *D. ferruginea* poskytla sloučeninu derrisisoflavonu G, zatímco deset z dosavadních sloučenin bylo izolováno z extraktů cyklohexanu, CH_2Cl_2 a EtOAc z kůry kmenů a cyklohexanového extraktu ze sušených listů. Byly zjištěny analýzou jejich spektroskopických dat (UV, IR, NMR a MS), porovnanými s výsledky popsány v literatuře: čtyři flavanony: 5,3',4'-trihydroxy-6-(γ,γ -dimethylallyl)-6'',6''-dimethylpyrano-(2'',3''-7,8)-flavanon, dorsmanin I, lonchokarpol A, 6,8-diprenyleriodiktyol předtím izolovaný z *Derris laxiflora*; čtyři isoflavony, genistein který byl dříve izolován z *Derris scandens*, pratensein, prunetin, které byly izolovány v *Derris elliptica* a *D. laxiflora*, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyisoflavon a dva fenolycké deriváty: koniferylaldehyd a kyselina 4'-methoxyskořicová [20].

Retrosyntetická analýza zdůraznila, že 5,7,4'-trihydroxy-8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-phenylchroman-4-on (lupiwighteon) byl klíčový prostředník. Tento derivát byl připraven pomocí čtyřstupňové C-8 prenylace genisteinu. Vychází sloučeniny lupiwighteonu se pak dosáhlo pomocí

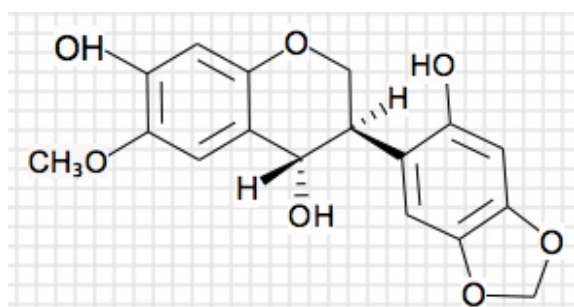
dvoustupňové sekvence, fotooxidace prenylového postranního řetězce s následnou redukcí intermediárního hydroperoxidu vedoucího ke sekundárnímu allylickému alkoholovému přídatku 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyfenyl)-8-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-4H-chroman-4-onu. Posledním krokem byla intramolekulární kondenzace sekundárního alkoholu Mitsunobu s *ortho*-fenolovou skupinou za vzniku substituovaného dihydrofuranového kruhu. Různé kroky tohoto procesu hemisyntézy je třeba ještě optimalizovat. Reakce však umožnily syntetizovat racemickou směs izolovanou z *D. ferruginea* a tím potvrdit jeho strukturu 5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7,8-(2'-*isoprenyldihydrofurano*)-4*H*-chroman-4-onu, pojmenovaný derrisisoflavone G [20].

8.1.11. *Tephrosia pumila* (Lam.) Pers.

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Pumilanol, (*rel*)-3 β -(2'-hydroxy-4',5'-methylenedioxyfenyl)-6-methoxy-4 α ,7-dihydroxybenzo-3,4-dihydropyran, tefrinon, rotenon, lupeol a stigmasterol

Byly izolovány dva nové isoflavonoidy isoflavan-4-ol (pumilanol) a (*rel*)-3 β -(2'-hydroxy-4',5'-methylenedioxyfenyl)-6-methoxy-4 α ,7-dihydroxybenzo-3,4-dihydropyran a dva známé flavonoidy, 5-hydroxy-7-methoxy-8-prenylovaný flavanon (tefrinon) a rotenon spolu s lupeolem a stigmasterolem, byly izolovány z kořenů *Tephrosia pumila* ze sbírky pěstované v Andhra Pradesh v Indii. Struktury sloučenin byly stanoveny pomocí MS, 1D a 2D-NMR spektrální analýzy. Pumilanol vykazoval významnou antiprotozoální aktivitu proti *T. b. rhodensiense*, *T. cruzi* a *L. donovani* s hodnotami IC₅₀ 3,7, 3,35 a 17,2 μ g/ml, ale vykazovaly vysokou toxicitu vůči potkaním skeletovým myoblastům L-6 (IC₅₀ 17,12 μ g/ml) [21].



Obr. 17: Chemická struktura pumilanolu, nakresleno pomocí ChemPencil [21]

Isoflavan-4-oly jsou vzácnou podskupinou isoflavonoidů v hledání a identifikaci nových antiprotozoálních látek z rostlin *Tephrosia pumila*. Nalezené sloučeniny by mohly být užitečné v boji proti leishmanióze, trypanosomióze a malárii. *Tephrosia* jsou dřevité byliny, mají tropický a subtropický původ a odhaduje se, že obsahuje 300 až 400 druhů, z nichž třicetpět se vyskytuje v

Indii. *Tephrosia* jsou známé pro svůj bohatý zdroj flavonoidů, rotenoidů a derivátů kumestanu, z nichž některé mají insekticidní a pesticidní vlastnosti. Dřívější analýza semenných rostlin *T. pumila* z Etiopie vedlo k izolaci isoflavonů A-D, kromě β -okysličeného chalkonu a prekansonu A. Sekvenční chromatografií a preparativním krokem TLC se získal nový isoflavanol, 7,2'-dihydroxy-6-methoxy-4',5'-methyleneedioxyisoflavan-4-ol (pumilanol). Dále byly izolovány: tefrinonin, rotenonin, lupeolin a stigmasterolin a charakterizovány MS, 1D a 2D-NMR analýzou a porovnáním s výsledky uvedenými v literatuře. Tyto tři flavonoidy (pumilanol, tefrinon a stigmasterol) byly zkoumány kvůli jejich potenciálu inhibovat parazitní protozoa rodu *Trypanosoma*, *Leishmania* a *Plasmodium* za použití *in vitro* antiprotozoálních testů [21].

V rámci zkoumání struktury a účinku byly nalezeny i jiné isoflavonoidy patřící do skupiny isoflan-4-olu a to ambanol (2'-methoxy-6,7-furano-4',5'-methyleneedioxyisoflavan-4-ol), lapathinol (5-hydroxy-8-methoxy-6,7-methyleneedioxyisoflavan-4-ol) nalezený v *Polygonum lapathifolium* a 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavan-4-ol, 2',3',4'-trihydroxy-6,7-methyleneedioxyisoflavan-4-ol (bolusanthol A) nalezený v *Bolusanthus speciosus* [21].

8.1.12. *Campylotropis hirtella* (Franchet) Schindler

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoid: Isoflavanový dimer

Bylina *Campylotropis hirtella* je široce rozšířená v subtropických zónách Číny. Stonky a kořeny rostliny byly tradičně používány v čínské lidové medicíně pro léčbu benigní hyperplazie prostaty. Různorodost flavonoidů izolovaných z *Campylotropis hirtella* poukazuje, že systém biosyntézy flavonoidů v tomto druhu je velice dobře vyvinutý. V této studii byl isoflavan-kumarinochromanový dimer izolován jako hnědá pevná látka. HR-ESI-MS analýza isoflavan-kumarinochromanového dimeru vykazuje vrchol píku $[M-H]^-$ při 733,2287 nm, s molekulární vzorcem $C_{42}H_{38}O_{12}$. Byla změřena spektra NMR. Analýza 1H -NMR spektra a HSQC analyzovaly 29 uhlíků sp^2 , včetně jednoho karbonylu a jedenáct uhlíků nesoucích atom kyslíku. Bylo analyzováno třináct sp^3 uhlíků, což odpovídá dvěma aromatickým methoxylovým skupinám, čtyřem geminovaným methylovým skupinám, třem methylenům, jednomu methinu a třem kvartérním uhlíkům [22].

Z pohledu biogeneze je zřejmé, že isoflavan-kumarinochromanový dimer byl derivován z hirtellanonu C, dimerů chalkon-isoflavonoidů izolovaných z téže rostliny. Vzhledem k tomu, že hirtellanon C má konfiguraci 3'R, stereochemie isoflavan-kumarinochromanového dimeru by měla mít také konfiguraci 3'''R. Experiment NOESY však neposkytl dostatečné informace o

stereochemii polohy 2 a 3, takže absolutní konfigurace isoflavan-kumarinochromanového dimeru zůstává neurčená [22].

Nalezená sloučenina je dosud popsaným prvním isoflavan-kumarinochromanovým dimerem. Tato sloučenina má tři prstence fúzované na vazbě uhlík-uhlík, jedinečná 3D struktura. Experiment MTT ukázal, že isoflavan-kumarinochromanový dimer má účinek CC_{50} při 1,34 μ M proti potkaním lymfocytům a je jedním z nejvíce toxických flavonoidů izolovaných z této rostliny. Údaje o toxicitě naznačují, že tato neobvyklá molekula může být zapojena do mechanismu sebeobrany rostliny [22].

Druhá nalezená sloučenina má podobné spektroskopické údaje s hydroisoflavonem C. Avšak experiment s rentgenovým difraktogramem s jedním krystalem ukázal, že dvě hydroxylové skupiny na B-kruhu druhé sloučeniny byly v transkonfiguraci a že obě hydroxylové skupiny byly v axiální poloze, která byla odlišná od hydroisoflavonu C. Dvojitá vertikální konformace dvou hydroxylových skupin na cyklohexanové části druhé sloučeniny naznačují, že snadno prochází eliminací a dehydrogenací za vzniku 5,7-dihydroxyisoflavonu za fyziologických podmínek nebo během separačního procesu. To nám může vysvětlit, proč tato sloučenina nebyla dříve identifikována [22].

Z hlediska biosyntézy, není pro druhou sloučeninu pravděpodobné, že by vznikla z normální dráhy fenylypropanoidu. Před vznikem aromatického kruhu fenylyalaninu musí existovat neznámá biosyntetická cesta. Největší možnou větví by byla chorismová kyselina. Chorismová kyselina může být podrobena 1,3-hydroxylovému posunu za vzniku *trans*-1,4-dihydroxy-3,5-cyklohexadienkarboxylové kyseliny. Tento klíčový meziprodukt buď podléhá dehydrogenaci za vzniku kyseliny 4-hydroxybenzoové a pak se znovu připojuje k fenylyalaninové dráze, nebo se podrobí redukci za vzniku *trans*-1,4-dihydroxycyklohexankarboxylové kyseliny. Meziprodukt *trans*-1,4-dihydroxycyklohexankarboxylové kyseliny by mohl být katalyzován stejnými enzymy, které se shlukují na fenylyalaninové dráze za vzniku meziproduktu hydroisoflavonu C a druhé sloučeniny. I když je biosyntéza flavonoidů jednou z nejlépe charakterizovaných ze všech sekundárních metabolických cest, izolace druhé sloučeniny naznačuje novou cestu biosyntézy flavonoidů. Je také zajímavé, že druhá sloučenina byla izolována z rostlin a hydroisoflavon C byl získán z houby [22].

Závěrem je, že byly z *Campylotropis hirtella* izolovány dva neobvyklé isoflavonoidy. První sloučeninou je prvně objevený isoflavan-kumarinochromanový dimer a obsahuje jedinečnou 3D strukturu. Druhá sloučenina obsahuje neobvyklý nasycený B-kruh, jeho relativní konfigurace byla stanovena rentgenovou difrakcí monokrystalu. Byla navržena biosyntetická dráha druhé sloučeniny a tato cesta může existovat paralelně s cestou fenylypropanoidu [22].

8.1.13. *Amphimas pterocarpoides* Harms

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: Aformosin, dihydroaformosin, glycitein, dihydroglycitein, formononetin, daidzein, dihydroirisolidon, 7-methoxydihydrotektorigenin, aformosin-7-O- β -D-glukopyranosid a aformosin-7-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid a irisolidon

Různé přípravky z afrického stromu *Amphimas pterocarpoides* se tradičně používají k léčbě nežádoucích zdravotních stavů souvisejících s endokrinním systémem. U potkanů s ovariektomií byla fenolová frakce methanolového extraktu z kůry kmene *A. pterocarpoides* účinná jako vaginální činidlo s výrazně slabší uterotrofickou aktivitou ve srovnání s estradiolem. Vyhodnocení frakce a isoflavonoidů z ní izolovaných a estrogenových receptorových (ER) izotypově specifických reportérových buněk naznačuje, že estrogení aktivita frakce může být přičítána primárně daidzeinu, dihydroglyciteinu a sekundárně glyciteinu. Selektivita daidzeinu, dihydroglyciteinu a glyciteinu na základě účinnosti pro expresi genů pomocí ER β proti ER α , vyjádřená relativně vzhledem k estradiolu. Nicméně, relativní účinky na estradiol indukované buňky adenokarcinomu endometria alkalickou fosfatázou, která je spolehlivým markerem estrogení aktivity, byly v pořadí, daidzein > dihydroglycitein >> glycitein. Zřetelně vyšší estrogení aktivita dihydroglyciteinu ve srovnání s glyciteinem může být přičítána částečné agonistické/antagonistické aktivitě dihydroglyciteinu prostřednictvím ER β . Výpočet volné vazebné energie předpovídal částečný agonismus/antagonismus dihydroglyciteinu prostřednictvím ER β . Frakce a izolované isoflavonoidy podporují laktogenní diferenciaci HC11 prsních epiteliálních buněk alespoň stejně účinně, jako premenopauzální hladiny estradiolu. Tato studie Tchoumtchoua a kol. naznačuje, že estrogení aktivita frakce pravděpodobně závisí na metabolismu glyciteinu na dihydroglycitein, že frakce může mít pravděpodobně vaginální účinek, aniž by vyvolala riziko vzniku rakoviny endometria, více než suplementace samotného estrogenu a že bezpečnost frakce pro reprodukční cestu vyžaduje podrobnější hodnocení [23].

Postmenopauzální estrogení nedostatečnost je spojena s řadou nepříznivých účinků na zdraví, včetně urogenitální atrofie a ztráty hustoty minerálů v kosti, čemuž lze s hormonální substituční terapií (HRT) částečně předejít. HRT s estrogenem nebo estrogenem a progestinem je údajně spojena s nižším a vyšším rizikem rakoviny prsu nebo bez zvýšeného rizika karcinomu prsu, bez ohledu na léčbu. Estrogeny působí na různé buňky a tkáně převážně prostřednictvím vazby na dva izotypy ER, ER α a ER β . Děloha je hlavním místem pro estrogeny. Podávání estrogenu potkanům s ovariektomií zvyšuje množství vyloučené moči a proliferaci lumenálních epiteliálních

buněk modulací exprese tisíce genů. Tyto modulační účinky jsou převážně zprostředkovány hojně tvorbou ER α . ER β , který je exprimován na podstatně nižší úrovni a je známo, že tlumí aktivitu ER α [23].

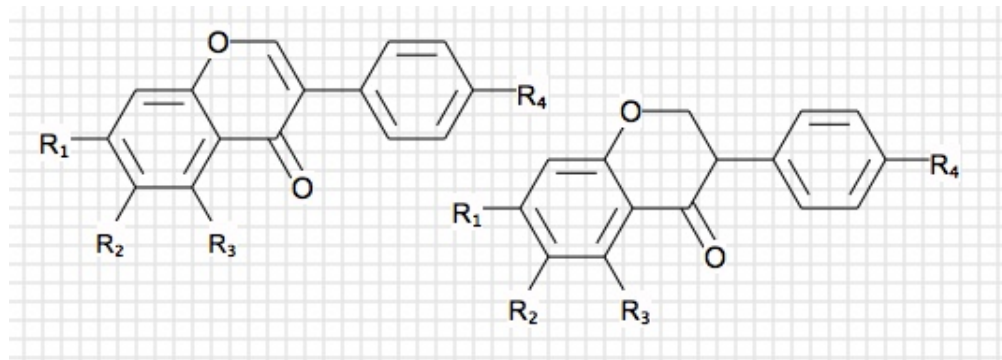
Doplňky bohaté na fytoestrogeny, které potenciálně zabraňují nebo zmírňují postmenopauzální poruchy, stále více spotřebovávají menopauzální ženy, i když jejich bezpečnost a účinnost jsou stále předmětem debaty. Fytoestrogeny jsou polyfenoly pocházející z rostlin, které se ve většině případů přednostně váží na ER β a vyvolávají účinky specifické pro tkáň, buňky a genové promotory částečně podobné estrogenu. Nedávné studie ukázaly, že ER α -selektivní fytoestrogeny mají tendenci regulovat spíše apoptické než proliferací geny, a že potenciace a účinnost regulace exprese genu pomocí fytoestrogenů závislých na ER β může značně převyšovat předpovědi založené na vazebné afinitě na vazbu na ER β . U modelů ovariektomizovaných potkanů s postmenopauzální ztrátou kostní hmoty bylo prokázáno, že sójové isoflavony vykazují nízké uterotrofické a kostní účinky. Klinický důkaz pro příznivé účinky sóji však zůstává kontroverzní. Z tohoto důvodu zůstává i nadále velký zájem o screening jiných rostlin při hledání účinných alternativ k HRT [23].

Předchozí studie ukázaly, že methanолоvé a vodné extrakty kůry *A. pterocarpoides* vykazují antioxidační účinky. Kromě toho uvedly, že při zkouškách subchronické toxicity neměl methanолоvý extrakt z kůry kmene žádný účinek na hematologické, biochemické, histologické a anatomické parametry potkanů při dávkách nižších než 300 mg/kg tělesné hmotnosti. Ovšem hormonální účinky v rakovinových buňkách prsu a endometria zůstaly neprobádané. Nedávno byla popsána MS analýza s vysokým rozlišením umožňující identifikaci isoflavonoidů v bohaté fenolové frakci methanolu z kůry kmene *A. pterocarpoides*. Z této frakce bylo izolováno jedenáct isoflavonoidů a strukturálně charakterizováno. Předkládaná studie ukázala, že v modelu s potkaní ovariektomizovaným deficitem estrogenu fenolová frakce působila jako silná vaginální látka s podstatně slabší uterotrofickou účinností ve srovnání s estradiolem. Tyto trofické účinky mohou být přičítány aktivitě agonistů/antagonistů ER specifických isoflavonoidních složek [23].

Z připravené fenolové frakce byly izolovány a identifikovány hlavní složky a to afrormosin, dihydrofrormosin, glycitein, dihydroglycitein, formononetin, daidzein, dihydroirisolidon, 7-methoxydihydrotektorigenin, afrormosin-7-O- β -D-glukopyranosid a afrormosin-7-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid. Metoda LC-HRMS a HPLC-DAD byla použita pro charakterizaci fenolové frakce a kvantifikaci jejích hlavních složek po regresní analýze [23].

Vazebná afinita molekuly glyciteinu, dihydroglyciteinu a daidzeinu vzhledem k estradiolu (relativní vazebná afinita, RBA) byla stanovena za použití rekombinantních testovacích souprav

ER α a ER β kompetitorů (Invitrogen) a čtečky mikrotitračních destiček Safire II s možností detekce polarizace fluorescence (Tecan). Orientačně byla určena koncentrace 17 β -estradiolu, molekuly glyciteinu, dihydroglyciteinu a daidzeinu, které inhibovaly vazbu fluorescenčního estrogeneru ES2 (Invitrogen) na ER α a ER β o 50 % (IC₅₀) a použily je pro výpočet RBA α a RBA β [23].



Obr. 18: Základní struktury [23]

Tab. 5: Funkční skupiny obsahových látek [23]

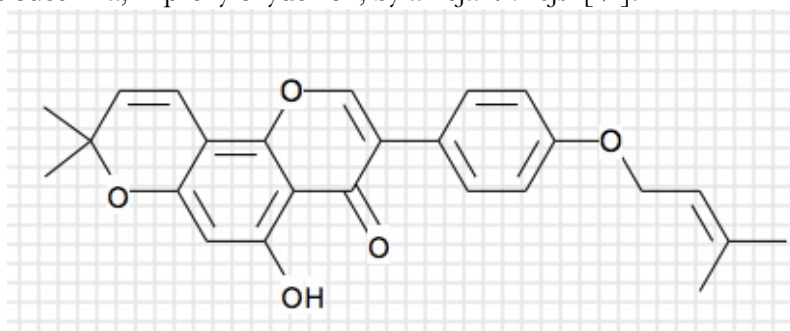
Isoflavonoidy	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
aformosin	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
glycitein	OH	OCH ₃	H	OH
formononetin	OH	H	H	OCH ₃
daidzein	OH	H	H	OH
irisolidon	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
7-methylirisolidon	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
aformosin-7-O-β-D-glukopyranosid	Glu	OCH ₃	H	OCH ₃
aformosin-7-O-β-D-apiofuranosyl-(1\rightarrow6)-β-D-glukopyranosid	Glu-Apio	OCH ₃	H	OCH ₃
dihydroformosin	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
dihydroglycitein	OH	OCH ₃	H	OH
7-methyl-dihydroglycitein	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃

8.1.14. *Millettia oblata*, subsp. *teitensis* J.B. Gillett

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoidy: 4'-prenyloxyderron, 8-O-methylretusin, durmillon, maximaisoflavon B, maximaisoflavon H, maximaisoflavon J a tefrosin

Extrakt dichlormethan/MeOH z kůry stromu *Millettia oblata* vykazoval antiplasmodiální účinek ($IC_{50} = 10-12 \mu\text{g/ml}$) proti kmenům *Plasmodium falciparum* senzitivní na chlorochin a na chlorochin rezistentní. Chromatografická separace extraktu vedla k izolaci nového isoflavonu, 4'-prenyloxyderronu (obr. 19) společně se známými isoflavony (8-O-methylretusin, durmillon, maximaisoflavon B, maximaisoflavon H and maximaisoflavon J, rotenoid (tefrosin) a triterpen (lupeol)). Podobným průzkumem *Millettia leucantha* vedlo k identifikaci isoflavonů afrormosinu, wistinu a flavonu chrysinu. Identifikace těchto sloučenin byla založena na jejich spektroskopických datech. Bylo testováno pět isoflavonů izolovaných z těchto rostlin, stejně jako jedenáct dříve popsáných sloučenin z *Millettia dura*, vykazovalo dobré až středně silné antiplasmodiální účinky, přičemž nová sloučenina, 4'-prenyloxyderron, byla neaktivnější [24].



Obr. 19: Struktura 4'-prenyloxyderronu, nakresleno pomocí ChemPencil [24]

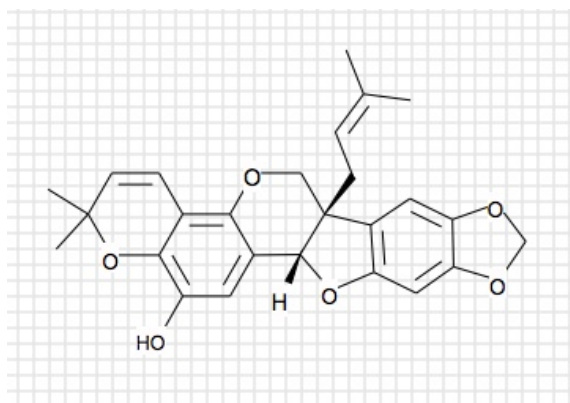
8.1.15. *Spirotropis longifolia* (DC.) Baill.

Čeleď: Fabaceae

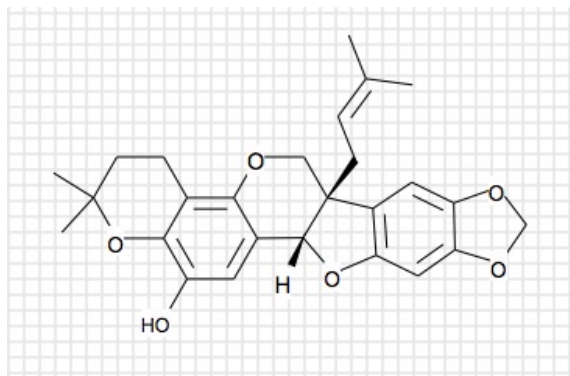
Isoflavonoidy: 2-hydroxy-8,9-methylenedioxy-2',2'-dimethylpyrano-[5',6':4,3]-6a-prenyl-[6aS,11aS]-pterokarpan (spirotropin A), 2-hydroxy-8,9-methylenedioxy-2',2'-dimethyl-3',4'-dihydropyrano-[5',6':4,3]-6a-prenyl-[6aS,11aS]-pterokarpan (spirotropin B), 5,7-dihydroxy-6,8-diprenyl-2''',2'''-dimethylpyrano[5''',6''':3',4']-isoflavon (spirotropon), trans-oxyresveratrol, trans-resveratrol, piceatanol, daidzein, genistein, isoprunitin, lupeol, latifolol, gnetin D a gnetin E

Spirotropis longifolia je strom, jehož rozsah se rozkládá od státu Bolívar po Francouzskou Guyanu. Jedná se o jeden z mála druhů, které vytvářejí monodominantní porosty v tropických deštných

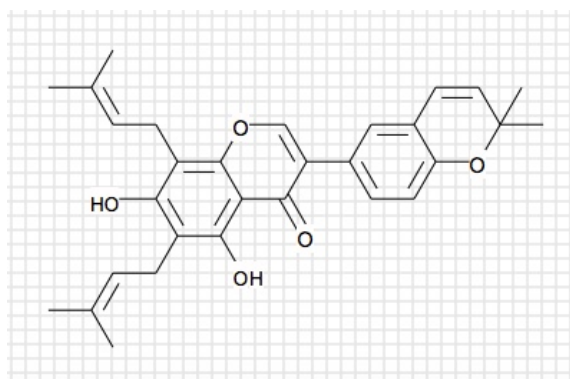
pralesích a je také známo díky své neustálé omlazovací schopnosti stonků. Phytochemická studie ethylacetátového extraktu kořenů a adventivních kořenů umožnila izolaci tří sloučenin: 2-hydroxy-8,9-methylenedioxy-2',2'-dimethylpyrano-[5',6':4,3]-6a-prenyl-[6a*S*,11a*S*]-pterokarpanu (spirotropin A), 2-hydroxy-8,9-methylenedioxy-2',2'-dimethyl-3',4'-dihydropyrano-[5',6':4,3]-6a-prenyl-[6a*S*,11a*S*]-pterokarpanu (spirotropin B) a 5,7-dihydroxy-6,8-diprenyl-2''',2'''-dimethylpyrano[5''',6''':3',4']-isoflavonu (spirotropon). Dále bylo izolováno deset známých sloučenin: *trans*-oxyresveratrol, *trans*-resveratrol, piceatanol, daidzein, genistein, isopruneitin, lupeol, latifolol, gnetin D a gnetin E. Tyto sloučeniny byly hodnoceny pro svou fungicidní aktivitu a jejich cytotoxicitu a jejich struktury byly stanoveny měřením 1D a 2D-NMR, HRMS, CD a optickou otáčivostí [25].



Obr. 20: Struktury spirotropinu A, nakresleno ChemPencil [25]



Obr. 21: Struktury spirotropinu B, nakresleno ChemPencil [25]



Obr. 22: Struktury spirotroponu, nakresleno ChemPencil [25]

Z taxonomického hlediska je *S. longifolia* jediným zástupcem svého rodu, patří k kmeni Sophoreae. Fytochemie tohoto rodu nebyla nikdy dříve zkoumána a rod není popsán z hlediska použití rostlin nebo léčivých vlastností [25].

V průběhu hledání nových fungicidních látek v trvanlivých dřevinách se ve studii soustředili na fungicidní účinky etylacetátového extraktu kořenů *S. longifolia*. Začaly se studovat fungicidní složky obsažené v kořenech tohoto druhu. Tento článek popisuje izolaci, eluci struktury z NMR spektrálních dat a fungicidní a cytotoxické účinky všech izolovaných sloučenin [25].

Kořeny byly na vzduchu sušeny a extrahovány odděleně ethylacetátem. Oba extrakty byly potom podrobeny sloupcové chromatografii na silikagelu a následně HPLC s obrácenými fázemi, čímž byly získány tři dříve neuvedené struktury spirotropinu A, spirotropinu B a spirotroponu a deset známých sloučenin *trans*-oxyresveratrolu, *trans*-resveratrolu, piceatanolu, daidzeinu, genisteinu, isoprunitinu a lupeolu. V adventivních kořenech byly izolovány sloučeniny *trans*-oxyresveratrol, gnetin E, latifolol a gnetin D. Tyto známé sloučeniny byly identifikovány porovnáním jejich analytických údajů s údaji uvedenými v literatuře. Sloučeniny gnetinu E, latifololu a gnetinu D byly izolovány poprvé v čeledi Fabaceae [25].

Struktura molekul spirotropinu A a spirotropinu B byla stanovena pomocí ^1H a ^{13}C -NMR spektroskopii. Dvě odlišné skupiny byly pozorovány analýzou korelací ve spektrech COSY, HMBC a HSQC: prenyl a dimethyl-pyrano-pterokarpan [25].

Všechny izolované sloučeniny byly testovány pro jejich fungicidní účinky mikrodilucí, většinou u šesti kmenů hub (dermatofyt) a osmi patogenních kvasinek. Fungicidní účinky byly srovnávány s účinky itraconazolu a flukonazolu. Účinné sloučeniny byly také testovány na buňky normální plicní tkáně a na metastatické melanomové buňky. Mezitím byly testovány neúčinné sloučeniny proti buňkám lidského cervikálního karcinomu, aby se vyhodnotila jejich hypotetická cytotoxicita [25].

Ze všech testovaných sloučenin vykazuje pouze piceatannol, gnetin E a latifolol silnou fungicidní účinek, zejména při inhibici růstu kvasinek. Sloučenina piceatannol vykazovala nejlepší účinnost proti *Candida parapsilosis* a sloučenina latifolol byla schopna inhibovat *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei*. Navíc sloučenina latifolol vykazovala velmi vysokou selektivitu proti kvasinkám [25].

Na dermatofytech byly pozorovány nejlepší fungicidní účinky gnetinu E, který inhiboval růst *Trichophyton rubrum* a *Microsporum gypseum*. Flukonazol inhiboval růst spirotropinu B. S ohledem na dříve nehlášené sloučeniny vykazoval spirotropin A slabý antiproliferační účinek na buňky lidského cervikálního karcinomu s 56% inhibicí při 10^{-5} molu [25].

Všechny sloučeniny s výjimkou lupeolu, jsou odvozené od biosyntetické dráhy fenyylpropanoidu smíchané s následným přidáním několika malonyl-CoA, které jsou obecně známé jako fytoalexiny nebo prekurzory fytoalexinů. Ukázalo se, že některé z těchto sloučenin byly schopné inhibovat růst lidských patogenních hub a byly pravděpodobně syntetizovány stromem pro ochranu před houbami zprostředkovanou degradací [25].

Torti a kol. poukázali na to, že monodominance je povolena pouze seskupením několika rostlinných rysů, nikoliv jediným. Pozorováním se mohla ukázat přirozená trvanlivost a monodominance *S. longifolia*. Navíc dobré fungicidní účinky a nízké cytotoxicity piceatanolu a latifololu ukázaly, že tyto látky mohou spustit vlnu hledání nových antimykotických látek pro léčbu mykóz. Studie Basseta a kol. představuje první chemický popis rodu *Spirotropis* a obohacuje chemotaxonomické informace [25].

8.1.16. *Oxytropis falcata* Bunge

Čeleď: Fabaceae

Isoflavonoid: 2',4'-dihydroxychalkon

Oxytropis falcata, známá místně jako jedna ze "tří protizánětlivých léčiv" a "králů bylin" v tibetské medicíně, byla poprvé zaznamenána v čínském lékopise jako oficiální bylinná droga. Byla široce aplikována v mnoha tibetských a mongolských lékařských předpisech s různými tradičními použitími, jako jsou chřipka, hyperpyrexie, bolest, rány, krvácení, záněty a antrax. V posledních desetiletích byly studie o této rostlině zaměřeny především na fytochemické a farmakologické účinky. Nedávná studie Wang a kol. naznačila, že frakce flavonoidů z *O. falcata* významně snižují hladiny PGE₂ a zvýšily aktivity antioxidantních enzymů s gastroprotektivním účinkem. Nicméně stále existuje jen málo informací o antiflogistických účincích flavonoidních sloučenin izolovaných z této rostliny. Studie popisuje izolaci 2',4'-dihydroxychalkonu, 7-hydroxyflavononu, 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavonolu a 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon-3-O-β-D-galaktosidu a studovala jejich antiflogistické, antioxidantní a cytotoxické účinky v *in vitro* pokusech. Kromě toho byla použita metoda HPLC-DAD pro kvantifikaci čtyř hlavních sloučenin z *O. falcata* současně. Tyto údaje poskytly vědecké důkazy o možnostech lékařského využití *O. falcata* [26].

Volné radikály, jako jsou například ROS, aktivují metabolismus kyseliny arachidonové, antiflogistické cytokiny. Nadprodukce ROS by mohly sloužit jako sekundární poslové, které aktivují produkci dalších mediátorů zapojených do zánětlivého procesu. Výsledky ukázaly, že 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavonol a 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon-3-O-β-D-galaktosid vykazovaly signifikantní celkové antioxidantní účinky. Flavonoidové sloučeniny 2',4'-dihydroxychalkonu a 7-

hydroxyflavononu vykazovaly slabé celkové antioxidační účinky. Podobné účinky byly zaznamenány také u DPPH a superoxidových radikálů [26].

Buněčné makrofágy RAW 264.7 byly stimulovány LPS v přítomnosti nebo nepřítomnosti flavonoidních sloučenin *O. falcata*, aby se zjistilo, zda buď snižují hladiny NO, které jsou kritickými mediátory způsobujícími zánět, neurotoxicitu a rakovinu. Předběžná úprava RAW 264.7 buněk s 7-hydroxyflavononem významně inhibuje produkci NO indukovanou LPS v závislosti na dávce. Aby se vyloučila možnost, že pokles hladin NO byl jednoduše způsoben smrtí buněk, posoudila se životaschopnost buněk při různých koncentracích flavonoidních sloučenin. Bylo zjištěno, že 2',4'-dihydroxychalkon vykazuje nejvyšší inhibici NO 91,91 % bez cytotoxicity [26].

V jiné studii (YANG Guang-Ming a kolektiv) byl studován antikancerogenní účinek na hepatocelulární karcinom *in vitro* a *in vivo* pokusech. Nejvyšší účinnost byla zjištěna u 2',4'-dihydroxychalkonu, kdy bylo zjištěno, že buněčný cyklus byl zastaven v G1 fázi a došlo ke stimulaci apoptózy [27].

8.1.17. *Acca sellowiana* (Berg) Burret, *Psidium littorale* Raddi a *Psidium guajava* L.

Český název: *Psidium guajava* - kvajáva hrušková

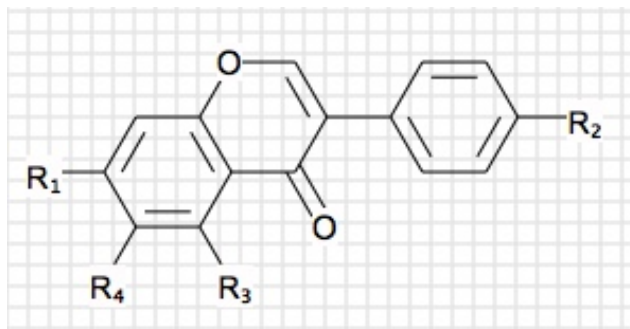
Čeleď: Myrtaceae

Isoflavonoidy: Daidzin, genistin, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, prunetin, glycitein, glycitin, ononin a sissotrin

Bylo nalezeno několik druhů imunoreaktivity podobné isoflavonoidům extrahovaných ve vodě a ethanolu z listů *Acca sellowiana*, *Psidium guajava* a *Psidium littorale*. Chromatografická mobilita imunoreaktivních látek byla porovnána s hodnotami autentických standardů a odhalila spektrum metabolitů isoflavonoidů u obou rodů. Aglykony i glykosidy byly detekovány, mezi které patří daidzin, genistin, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, prunetin a několik neúplně charakterizovaných isoflavonů. Následná studie Lapčíka a kol. HPLC-MS ověřila identitu hlavních imunoreaktivních isoflavonů a našla několik dalších, kam patří glycitein, glycitin, ononin, sissotrin, včetně malonylovaných a acetylovaných glukosidů [28].

Zvýšená pozornost byla věnována isoflavonům (3-fenylchromonům, obr. 23) v posledním desetiletí, kvůli jejich významu pro lidské zdraví. Nejčastěji jsou v čeledi Fabaceae. Nicméně byly také zaznamenány ve více než 20 jiných čeledích, např. Rosaceae, Iridaceae, Asteraceae, Poaceae,

Amaranthaceae a Moraceae. Ačkoli byly v čeledi Myrtaceae popsány flavony a chalkony, neexistují žádné zprávy o přítomnosti isoflavonů [28].



Obr. 23: Základní skelet a substituenty sledovaný isoflavonoidů: Daidzein, $R_1=R_2=OH$, $R_3=R_4=H$; daidzin, $R_1=\beta$ -*D*-glucopyranosyl (β -Glu), $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$; genistein, $R_1=R_2=R_3=OH$, $R_4=H$; genistin, $R_1=\beta$ -Glu, $R_2=R_3=OH$, $R_4=H$; formononetin, $R_1=OH$, $R_2=OCH_3$, $R_3=R_4=H$; ononin, $R_1=\beta$ -Glu, $R_2=OCH_3$, $R_3=R_4=H$; isoformononetin, $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$; biochanin A, $R_1=R_3=OH$, $R_2=OCH_3$, $R_4=H$; sissotrin, $R_1=\beta$ -Glu, $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$, $R_4=H$; prunetin, $R_1=OCH_3$, $R_2=R_3=OH$, $R_4=H$; glycitein, $R_1=R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$; glycitin, $R_1=\beta$ -Glu, $R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$ [28]

Myrtaceae je čeleď nejméně 133 rodů a více než 3800 druhů, včetně *Acca* a *Psidium*. Mnohé z nich jsou důležité v potravě jako plody, koření nebo jako okrasné nebo léčivé rostliny. *Psidium guajava* a *Psidium littorale* jsou keře nebo malé stromy, pěstované v tropech a subtropích pro jejich jedlé plody. Listy *P. guajava* se používají v lidové medicíně pro své antiflogistické, spasmolytické a hemostatické účinky a při léčbě plicních onemocnění, kašle, zvracení a průjmeh. Extrakty z listů a kůry také mají antimikrobiální a antiamebízní účinky. Některé z těchto účinků mají být zprostředkovány kvercetinem a jeho glykosidy (avikularin a guaiaverin). Guaiaverin je poměrně častý flavonoid nalezený společně s několika dalšími flavonoidy u tohoto druhu [28].

Acca sellowiana je keř původem z Jižní Ameriky, ale nyní je pěstován v mnoha subtropických oblastech pro své jedlé plody nebo jako ozdobný keř. Jeho plody jsou bohaté na terpeny, taniny, steroidní saponiny, flavonoidy a methyl a ethylbenzoáty. Ovocný extrakt je baktericidní proti Gram-negativním bakteriím, jako jsou *Pseudomonas*, *Enterobacter* a *Salmonella* [28].

4',7-dihydroxy-5-methoxyisoflavon (5-methoxygenistein), 4',7-dihydroxy-5-methoxyisoflavon 7-*O*-glukosid (5-methoxygenistin), 7-[β -*D*-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glukopyranosyloxy]-4'-hydroxy-5-methoxyisoflavon (5-methoxygenistin-apiosid) a 7-[β -*D*-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-glukopyranosyloxy]-4',5-dihydroxyisoflavon (genistin-apiosid), byly dary doktora Wei Guang Ma. Isoformononetin a prunetin byly syntetizovány z daidzeinu a genisteinu, použitím diazomethanu jako methylačního činidla. Daidzein, genistein, genistin, luteolin, kvercetin a apigenin byly získány od firmy Sigma; sissotrinu a 5-hydroxy-4,7-dimethoxyisoflavon od firmy Indofine; ononin, daidzin a chloramin T byly zakoupeny od společnosti Fluka [28].

Dextran T-70 byl získán od firmy Pharmacia. Jodid sodný [^{125}I] pro radioligandovou syntézu byl z Institutu izotopů Co. Diethylether pocházel ze společnosti Synthestia. Všechna ostatní organická rozpouštědla pocházela od firmy Merck. Všechny ostatní látky byly analytické od Pliva-Lachema [28].

Tab. 6: Přehled všech izolovaných sloučenin [28]

daidzein	genistin-apiosid
3',4',7-trihydroxyisoflavon	sissotrin
genistein	5-methoxygenistin
5-hydroxy-4',7-dimethoxyisoflavon	5-methoxygenistin-apiosid
formononetin	dihydrodaidzein
biochanin A	equol
isofornononetin	apigenin
prunetin	luteolin
daidzin	kvercetin
genistin	O-desmethylangolensin
ononin	glycitin

Rostliný materiál byl získán z rostlin rostoucích v subtropickém skleníku Ústavu tropického a subtropického zemědělství České zemědělské zemědělské univerzity v Praze. Byl odebrán testovaný rostlinný materiál (listy z apikálních větví). V laboratoři tropického a subtropického zemědělství Herbarium byly uloženy vzorky *P. guajava*, *P. littorale* a *A. sellowiana* ověřené doktorem Ladislavem Kokoškou [28].

Vzorky byly zmrazeny ihned po sběru a udržovány při -20°C až do lyofilizace. Suché vzorky byly rozemlety. Prášková droga byla extrahována v extrakčním zařízení za použití methanolu a vody. Alikvoty extraktů byly odpařeny ve vakuu do sucha a zbytek se rozpustil v mobilní fázi pro HPLC [28].

Byly použity RIA metody založené na polyklonálních králičích protilátkách proti konjugátům bovinního sérového albuminu s 4'-O-karboxymethyl daidzeinem, 7-O-karboxymethyl daidzeinem, 4'-O-karboxymethylgenisteinem a 7-O-karboxymethylgenisteinem [28].

Doposud u žádných ze 130 známých druhů rostlin z čeledi Myrtaceae nebyly nalezeny isoflavony. Charakteristické flavonoidy nesou četné substituenty na chromanovém kruhu, často methoxy a C-methyly. C-methylované flavonoidy jsou vzácné mimo čeleď Myrtaceae. Dalším neobvyklý

zjištěním je nesubstituovaný fenylový kruh. Existuje jen několik zpráv o metabolismu flavonoidů u rodů *Psidium* a *Acca*. Obvyklý flavonolový kvercetin a jeho glykosidy avikularin a kvajaverin byly nalezeny v *P. guajava*. Aglykon je odpovědný za spasmolytický účinek [28].

Tato studie uvedla analýzu isoflavonů u tří druhů rostlin z čeledi Myrtaceae. Zatímco nezávisle obě metody detekovaly daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, prunetin, daidzin a genistin, několik dalších látek bylo detekováno pouze jednou technikou [28].

Závěrem této studie byla identifikace osmnácti isoflavonů a bylo zjištěno nejméně šest částečně charakterizovaných s isoflavonem podobných imunoreaktivních látek u tří rostlin z čeledi Myrtaceae. Jednotlivé metabolity se nemohou objevit v organismech bez biosyntézy nebo bez vychytávání - což je nepravděpodobné v tomto případě. Jinými slovy, identifikace určitého metabolitu indikuje přítomnost celé metabolické dráhy v požadovaném druhu, tj. v enzymatickém aparátu a kaskádě metabolických prekurzorů [28].

V pregenomové éře byly pro mapování vztahů mezi taxonomickými skupinami podle konceptu chemotaxonomie použity sekundární metabolity. Metody molekulární biologie umožňují v současné době identifikovat jednotlivé geny a mapovat metabolické dráhy v organismech, které jsou předmětem zájmu. Nicméně je nezbytné biochemické potvrzení jejich funkce. Koncentrace isoflavonoidů v listech z *A. sellowiana* a obou druhů *Psidium* byly nízké, což naznačuje nízkou aktivitu této metabolické dráhy. Vzorky pro analýzu byly však získány ze zdravých rostlin pěstovaných ve skleníku. K objasnění úlohy isoflavonů u těchto druhů budou nutné další studie s použitím různých biotických a abiotických podnětů. Odhalit vztahy enzymů metabolizujících isoflavon v různých taxonech bude úkolem molekulární biologie [28].

8.1.18. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil.

Český název: Vítod

Čeleď: Polygalaceae

Isoflavonoidy: 3',4'-dihydroxy-6",6",6"-tetramethylbis(pyrano[2",3"5,6::2",3"7,8]isoflavon, 5,3',4'-trihydroxy-6",6"dimethylpyrano [2",3"7,6] isoflavon a rutin

Rostliny rodu *Polygala* jsou již dlouho používány v lidové medicíně k léčbě bolesti a zánětu. Rostlina *Polygala molluginifolia* pochází z jižní Brazílie a je všeobecně známá jako "cânfora". Předložená studie Nucci-Martins a kol. analyzuje antinociceptivní účinek vodnoalkoholového

extraktu z *Polygala molluginifolia* a isoflavonu izolovaného z extraktu, u behaviorálních modelů bolesti u potkanů, stejně jako mechanismu, který tento efekt působí [29].

Fytochemická analýza vodnoalkoholového extraktu z *Polygala molluginifolia* byla provedena analýzou kapilární elektroforézy a kolorimetrickým testem. Antinociceptivní účinky vodnoalkoholového extraktu z *Polygala molluginifolia* a izolovaného isoflavonu byly hodnoceny aplikací formalinového testu, mechanickou a tepelnou hyperalgií po pooperační bolesti u potkanů. Bylo rovněž hodnoceno možné zapojení opioidních receptorů v antinociceptivním účinku. Nakonec byly nespecifické účinky vodnoalkoholového extraktu z *Polygala molluginifolia* a izolovaného isoflavonu hodnoceny měřením lokomotorické aktivity a tělesné teploty [29].

Ve vodnoalkoholovém extraktu *Polygala molluginifolia* byl identifikován 5,3',4'-trihydroxy-6'' dimethylpyrano[2''3''7,6] isoflavon, analýzou kapilární elektroforézy. Perorální podávání vodnoalkoholového extraktu z *Polygala molluginifolia* nebo izolovaného isoflavonu významně inhibovalo neurogenní a zánětlivé fáze bolesti vyvolané formalínem, tvorbu edémů a lokální hyperemii, aniž by došlo ke změně lokomotorické aktivity. Akutní a opakované léčení zvířat snížilo mechanickou a tepelnou hyperalgií pooperační bolesti. Kromě toho podávání vodnoalkoholového extraktu nebo izolovaného isoflavonu výrazně snížilo nociceptivní chování indukované periferní a centrální injekcí aktivátorů kanálů. Na konec byla antinocicepce poskytovaná podáním vodnoalkoholového extraktu nebo izolovaného isoflavonu zvrácena před podáním naloxonu [29].

Pooperační bolest představuje jednu z nejběžnějších forem akutní bolesti. Národní centrum pro zdravotní statistiku odhaduje, že v USA se každoročně provádí 51,4 milionu chirurgických výkonů, což představuje velký ekonomický dopad. Dále se odhaduje, že přibližně 80 % pacientů má po operaci akutní bolest. Tato akutní bolest je následována chronickou bolestí v 10-50 % případů, která významně ovlivňuje zotavení a kvalitu života těchto jedinců. K redukci pooperační bolesti, zejména při podávání opioidů a nesteroidních antiflogistik, se však používají různé přístupy, avšak mají omezenou účinnost a výrazné vedlejší účinky. Proto je třeba dále zkoumat nové strategie prevence pooperační bolesti. Z tohoto hlediska se zdá, že léčivé rostliny jsou vynikajícími terapeutickými možnostmi, protože byly široce používány v průběhu celé historie a ukázaly se jako na bohaté zdroje nových látek, které lze použít zejména k léčbě bolesti a zánětu [29].

Významnými milníky ve vývoji analgetik z přírodních produktů souvisejí s objevem morfinu, přírodního alkaloidu izolovaného z rostliny *Papaver somniferum* (máku setého) a kyseliny salicylové izolované ze *Salix alba* (vrby bílé). Výzkumníci zkoumali vliv léčivých rostlin na antinociceptivní účinek, do kterého je zapojen endogenní opioidní systém. Nicméně přecitlivělost na bolestivé

podněty (mechanické, tepelné a chemické) nazýváno hyperalgezie, během odvykání opioidů byla hlášena v několika studiích. Další studie ukazují, že receptory vanilloidu 1 (TRPV1) a ankyrinu 1 (TRPA1) a na teplo a studené vnímavé senzory, jsou zapojeny do hyperalgezie během zánětu a pooperační bolesti. Proto antagonisté těchto kanálů vystupují jako potenciální analgetika [29].

Léčivé rostliny čeledi Polygalaceae mají významnou farmakologickou hodnotu, protože byly empiricky dlouhodobě používány k léčbě některých onemocnění, zejména bolesti a zánětu. Druhy *Polygala molluginifolia* pocházejí z Atlantického lesa. Jedná se o malou bylinu nacházející se v travnatých porostech jižní Brazílie a je obecně známá jako “cânfora”. Několik vědeckých údajů bylo zveřejněno o biologických účincích této byliny před současnou studií. Nedávná studie prokázala pomocí fytochemické analýzy, že tento druh je bohatý na isoflavony s antioxidačními účinky a významnými antiflogistickými účinky [29].

Přes mnoho důkazů týkajících se čeledi Polygalaceae, neexistuje dosud žádná studie, která by uváděla účinky *Polygala molluginifolia* na reakce na bolest nebo analýzu mechanismu, díky němuž dosahuje svých příznivých účinků. Tato studie byla proto navržena tak, aby zkoumala účinek pooperační bolesti vodnoalkoholového extraktu z *Polygala molluginifolia* a 5,3',4'-trihydroxy-6''6'' dimethylpyrano[2''3''7,6] isoflavonu, izolovaného z extraktu. Dále se analyzovalo zapojení opioidních receptorů a kanálů TRPV1 a TRPA1 v analgetickém účinku extraktu *Polygala molluginifolia* a 5,3',4'-trihydroxy-6''6'' dimethylpyrano[2''3''7,6] isoflavonu [29].

Výsledky této studie prokázaly poprvé, že systémové podání vodnoalkoholového extraktu *Polygala molluginifolia* a isoflavonu izolovaného z tohoto extraktu, vyvolává silnou inhibiční nociceptivní behaviorální odezvu závislou na dávce. Tento antinociceptivní účinek může být alespoň částečně zprostředkován aktivací endogenních opioidních receptorů a/nebo inhibicí kanálů TRPV1 a TRPA1 [29].

Fytochemické studie čeledi Polygalaceae odhalily, že přítomnost xantonů a flavonoidů jsou poměrně častá a následně byly izolovány kumariny, saponiny, lignany a vzácněji isoflavony. Přítomnost isoflavonů a flavonoidu rutinu včetně 5,3',4'-trihydroxy-6''6'' dimethylpyrano[2''3''7,6] isoflavonu, byly nedávno identifikovány u druhů *Polygala molluginifolia*. Venzke a kol. rovněž tuto přítomnost identifikovali a provedli experimenty. Navíc Venzke a kol. také prokázaly antioxidační účinky, inhibici acetylcholinesterasy a propustnost PAMPA (paralelní propustnost membránové propustnosti) na čtyři isoflavony izolované a identifikované z *Polygala molluginifolia*. Podle těchto údajů se také stanovily spektrofotometricky fenoly a flavonoidy, které jsou typické pro tento druh rostlin. V literatuře je dobře popsáno, že fenolové sloučeniny, jako jsou flavonoidy, vykazují dobrou antioxidační účinnost a mohou účinně přispívat ke snížení bolesti a zánětu [29].

Arruda-Silva a kol. prokázali, že antiflogistické působení *Polygala molluginifolia* u potkanů bylo způsobeno inhibicí fosforylace p65 v NF-kappa B dráze a snížením hladin a exprese prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF-a a IL -1b. Vzhledem k antiflogistickému účinku této léčivé rostliny se zkoumaly možné antinociceptivní účinky *Polygala molluginifolia* pomocí formalinového testu [29].

Formalinový test je klasický tonizační zvířecí model pro předběžnou studii léčiv s analgetickými a protizánětlivými účinky. Injekce formalínu do zadní tlapy vyvolává bifázickou reakci na bolest; První fáze je neurogenní (časná fáze - F1) a je výsledkem přímé aktivace primárních aferentních senzoričkových neuronů, převážně aktivací C-vláken, zatímco druhá fáze je zánětlivá (pozdní fáze - F2) a zdá se být závislá na kombinaci s zánětlivou reakcí v periferní tkáni a centrální senzibilizací v hřbetních rozích míchy. Tyto funkční změny se zdají být iniciovány C-vláčky během časné fáze. Tak může být počáteční fáze potlačena podáním centrálně působících analgetik, jako je morfin, zatímco pozdní fáze reaguje na různé léky se zavedenými klinickými analgetiky, jako jsou opioidy, steroidní a nesteroidní antiflogistika. Studie dále ukázaly, že antagonisté TRPV1 a TRPA1 jsou schopni také inhibovat reakce na bolest vyvolané formalínem. Navíc Endres-Becker a kol. prokázali, že aktivace μ -opioidního receptoru může inhibovat aktivitu TRPV1 prostřednictvím $G_{i/o}$ proteinů a dráhy cAMP při zánětlivé reakci. Výsledky tedy jasně demonstrují schopnost vodnoalkoholového extraktu *Polygala molluginifolia* a 5,3',4'-trihydroxy-6''dimethylpyrano[2''3''7,6]isoflavonu inhibovat obě fáze formalinového testu, což vede k úvahám o možném zapojení opioidních TRPV1 a TRPA1 receptorů do analgetického/antiflogistického účinku *Polygala molluginifolia* [29].

Opiáty jsou v současné době hlavním pilířem léčby středně těžké až silné bolesti. Nicméně náhlé ukončení prodloužené aplikace opioidů vyvolává abstinenci příznaky, včetně hyperalgesie u zvířat a u lidí. Opioidní hypotéza byla předběžně zkoumána pokusem o zvrácení analgezie po podání naloxonu (opioidního antagonisty). V tomto ohledu výsledky ukazují, že před podáním naloxonu bylo možné potlačit antinocicepci vodnoalkoholového extraktu *Polygala molluginifolia* a 5,3',4'-trihydroxy-6''dimethylpyrano[2''3''7,6]isoflavonu, což jasně dokládá významné zapojení *Polygala molluginifolia* do aktivace endogenních opioidních receptorů za účelem analgezie. Kromě toho tyto výsledky naznačují možnou interakci mezi endogenními opioidními receptory a kanálem TRPA1, protože léčba morfinem byla schopna inhibovat nocicepci indukovanou aldehydem kyseliny skořicové (aktivátor TRPA1) a předběžná léčba s naloxonem tento účinek zvrátila [29].

Zvláště intenzivní výzkum je zaměřen na TRP termokanály, protože přecitlivělost na bolest, ke které dochází během několika patologických stavů, je často výsledkem zvýšení exprese a/nebo aktivity TRPV1 nebo TRPA1 kanálů. Tyto kanály mohou být také aktivovány několika

rostlinnými sloučeninami, jako je kapsaicin, který aktivuje TRPV1 a aldehyd kyseliny skořicové, který aktivuje TRPA1. Výsledky ukazují, že perorální podání buď hydroalkoholového extraktu *Polygala molluginifolia* nebo 5,3',4'-trihydroxy-6''-dimethylpyrano[2''3''7,6]isoflavonu snižuje nociceptivní chování indukované intraplantární a intratekální injekcí kapsaicinu (aktivátor TRPV1) a aldehydu kyseliny skořicové (aktivátor TRPA1), což zdůrazňuje celkovou spinální inhibici TRPA1 kanálu [29].

Neurotransmitery uvolňované škodlivými podněty mohou přispět ke zvýšení excitability po chirurgickém zranění. Pogatzki a Raja zdůrazňují, že pooperační bolest u lidí může být napodobena incizí tlapy u potkanů. Další zajímavé údaje vyplývající z této studie jsou ukázkou toho, že akutní nebo denní léčba vodnoalkoholovým extraktem významně snížila mechanickou a tepelnou hyperalgezi u pooperačních bolestí. Dále antihyperalgetický účinek vodnoalkoholového extraktu trval až 4 hodiny po akutní léčbě a nebyl náchylný k toleranci a/ nebo nevyvolal kumulativní účinek, protože vodnoalkoholový extrakt si udržoval svou účinnost při opakovaném podávání [29].

Navíc se zpozorovalo, že akutní léčba neovlivnila spontánní pohybovou aktivitu potkanů. Tyto výsledky naznačují, že sensorická a motorická schopnost zvířete zůstala normální, s výjimkou možnosti nespecifických účinků, jako je sedace nebo motorická dysfunkce [29].

Konečně, Maione a kol. naznačili funkční interakci mezi TRPV1 a μ -opioidními receptory v klesající antinociceptivní dráze, aby se vytvořila účinná analgetika. Studie ukazují, že odstranění primárních aferentních neuronů exprimujících TRPV1 potencuje spinální analgetický účinek agonistů delta-opioidu na mechanonociceptory. Navíc Vetter a kol. dokázali, že agonista opioidního receptoru morfinu působící prostřednictvím inhibice adenylátcykly vedla k inhibici PKA-zesílených TRPV1 odpovědí. Nicméně, Forster a kol. prokázali, že aktivace nociceptoru a senzitivace morfinem jsou zprostředkovávány TRPV1 a TRPA1. Společně tyto údaje mohou poskytnout přehled o interakcích mezi receptory opioidu, vanilloidu 1 a ankyrinu 1. Takové informace mohou vést k objevu analgetik s malými nebo žádnými vedlejšími účinky a zlepšením léčby bolestí různých etiologií, včetně pooperační bolesti. Tak se navrholo, že přímý účinek *Polygala molluginifolia* na centrálních a periferních dráhách, pozorovaný ve výsledcích, může být závislý na aktivaci opioidního systému a na inhibici TRPV1 a TRPA1 kanálů [29].

8.1.19. *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bureau ex Lavallée

Čeleď: Moraceae

Isoflavonoidy: Cundrasisoflavon A a B a 6,8-diprenylgenistein

Je trnitý strom, pěstuje se ve východní Asii, včetně Koreji. Plodem jsou bobule, jež se nejčastěji konzumují formou čerstvého ovoce, džemů a džusů. Plody jsou bohaté na různé biologicky aktivní látky, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, isoflavonoidy a výsledkem jsou účinky antioxidační, estrogenní, antiflogistické a antikancerogenní. Složení a obsah flavonoidů je závislý na podmínkách prostředí v průběhu kultivace (teplota, vlhkost, hmyz, zemědělská půda a chemikálie). Zrání je jedním z faktorů, které ovlivňuje složení a obsah aktivní složky. Proto je jedním z důvodů zaměření se na jednotlivé fáze zrání, které by mohlo odhalit nové bioaktivní látky [30].

Byla popsána inhibiční aktivita ethanolového extraktu z plodu na pankreatické lipasy, kde hlavním aktivním isoflavonoidem je 6,8-diprenylgenistein. Nalezené isoflavonoidy byly izolovány a použity v klinických studiích pro porovnání inhibiční aktivity obsažených isoflavonoidů na pankreatické lipasy z nezralých a zralých plodů *Curdrania Tricuspidata*. Složení a obsah aktivních složek a jejich biologická aktivita se mění v závislosti na různých faktorech, včetně jednotlivých fází zrání. Dřívější studie poukázaly na inhibiční vliv *Curdrania Tricuspidata* na pankreatické lipasy klíčového enzymu v tukové absorpci. Zkoumal se zde vliv u nezralých a zralých plodů. Nezralé plody mají celkově vyšší obsah fenolu, flavonoidů a vykazovaly silnější inhibici pankreatické lipasy oproti zralým plodům. HPLC analýza ukázala různé chemické uspořádání u nezralých a zralých plodů. Další frakcionace vedly k izolaci dalších 30 sloučenin, včetně dvou nových isoflavonoidů. Analýzou struktur bylo zjištěno, že 2,2-dimethylpyranový kruh je cyklizovaný prenylem. Tento postranní řetězec byl ve větší míře zjištěn u nezralých plodů. Tento isoflavonoid z nezralých plodů vykázal největší inhibiční vliv na pankreatické lipasy. Z tohož vyplývá, že stupeň zrání je velice důležitým faktorem pro maximální účinnost a že je obsah složek dobrým zdrojem biologicky aktivních látek pro regulaci obezity [30].

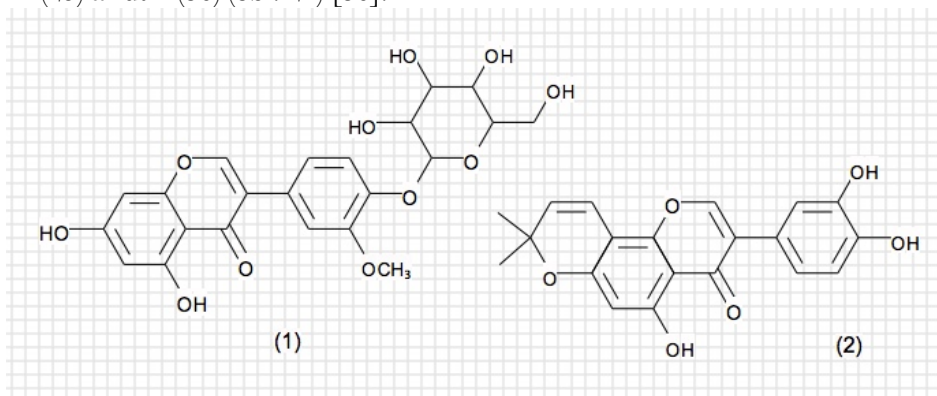
Globální nárůst obezity se stává celosvětovým problémem ve spojení s dalšími patologickými poruchami, jako jsou ateroskleróza, diabetes, hypertenze a rakovina. Vlivem vysoké spotřeby nasycených tuků je jedním z hlavních problémů a příspěvkem k obezitě, jak poukazuje epidemiologická studie, rozmezí mezi množstvím přísunu tuku v potravě a obezitou. Tuk je ester vyšší mastné kyseliny a glycerolu. Je absorbován po rozštěpení na monoglyceridy a mastné kyseliny lipásou. Lipasa je klíčovým enzymem v absorpci lipidů a pankreatické lipasa je

zodpovědná za hydrolyzu 50 - 70 % celkových tuků v potravě. Velice úspěšné v regulaci obezity je, jestliže dojde ke snížení absorpce tuků inhibicí pankreatické lipasy. Specifickým inhibitorem pankreatické lipasy je orlistat, jehož účinnou látkou je fentermin, nově přeregistrován a kontrolován jako psychotropní a omamné léčivo. Fentermin se hojně používá k terapii obezity jako doplněk při redukci váhy [30].

1 gram práškové drogy z netralých a zralých plodů se extrahuje 10 ml methanolu, filtrát se odpaří ve vakuu, čímž se získá extrakt z nezralého a zralého plodu pro další zpracování. Pro přípravu ethylacetátové frakce se použije 10 mg extraktu z nezralých a zralých plodů a postupně v pořadí se smíchá s 1 ml vody. Poté se přidá 1 ml ethylacetátu a důkladně se promíchá. Po odstředění směsi po dobu 30 minut se ethylacetátová a vodní frakce oddělí [30].

Z nezralých a zralých plodů byly připraveny vzorky v methanolu o koncentraci 10 mg/ml. Každý vzorek je přifiltrován přes 0,45 µm membránový filtr před vlastní analýzou. HPLC analýza byla provedena za použití systému Waters HPLC vybaveného Waters 600 Q - čerpadlem, 996 detektorem diodového pole a softwarem Waters Empower. Chromatografické dělení bylo provedeno za použití směsi acetonitril:voda (60:40), při průtokové rychlosti 1 ml/min. Vlnové délky pro detekční a retenční čas byly nastaveny na 254 nm po dobu 16 min. Nalezené sloučeniny jsou znázorněny na obr. 24 [30].

Dále bylo indentifikováno dvacet sedm známých sloučenin, byla porovnána spektrofotometrická analýza dat s hodnotami v literatuře. Jedná se o genistein (1), orobol (2), 7,4'-dimethoxy-5-hydroxyisoflavon (3), genistin (4), orobosid (5), 3'-*O*-methylorobol-7-glukosid (6), sphaerobosid (8), wighteon (9), gankaonin A (10), 4',5,7-trihydroxy isoflavonon (11), 5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-8-diprenylisoflavon (12), alpinumisoflavon (13), 4'-*O*-methylalpinumisoflavon (14), 5,3',4'-trihydroxy-6",6"-dimethylpyrano-[2",3";7,6] isoflavon (15), skandenon (16), derron (17), derron-4'-*O*-methylether (18), isochandalon (20), ulexin B (21), ulexon B (22), (+)-dihydrokempferol (23), (+)-taxifolin (24), (2*R*,3*R*)-7-(β-glukopyranosyloxy)-2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-on (25), astragalín (26), hirsutrin (27), populnin (28), nicotiflorin (29) a rutin (30) (obr. 24) [30].



Obr. 24: Izolované sloučeniny cundrasisoflavon A a B z nezralých plodů, nakresleno ChemPencil [30]

Inhibitory aktivity pankreatické lipasy izolovaných sloučenin se nejprve stanoví za použití *in vitro* testovacích systémů použitím vepřové pankreatické lipasy proti p-NPB jako substrátu. Ze sloučenin izolovaných z nezralých a zralých plodů sloučeniny 1, 9, 12, 15, 16, 17 a 19 vykazovaly > 50% inhibici při 100 μM . Nová sloučenina 19 z nezralých plodů odhalila potenciál inhibice IC_{50} 16,8 μM . Sloučenina 19 inhibovala také aktivitu pankreatické lipasy proti triglyceridům substrátu IC_{50} 41,8 μM . Pro další charakterizaci mechanismu inhibičního účinku sloučeniny 19 na pankreatické lipasy, byla provedena Lineweaver-Burk analýza. Ukázalo se že sloučenina 19 působí inhibičně na pankreatické lipasy nekompetitivním způsobem [30].

8.1.20. *Maclura pomifera* (Raf.) C. K. Schneid.

Český název: Maklura oranžová

Čeleď: Moraceae

Isoflavonoidy: Osajin a pomiferin

Některé isoflavonoidy byly nedávno popsány jako inhibitory cyklických nukleotidových fosfodiesterás (PDE) a indukující vazodilataci, i když výsledky popsané v literatuře jsou nesourodé. CGMP-selektivní izoforma PDE-5A představuje zejména cíl sildenafilu a jeho analogů při léčbě erektilní dysfunkce a plicní hypertenze podporou relaxace hladkého svalstva cév prostřednictvím aktivace dráhy NO/cGMP. Tato studie Ribaudoha a kol. vedla k ověření, zda osajin a pomiferin, dva přírodní prenylované isoflavony a hlavní složky extraktů z plodů *Maclura pomifera*, které byly dříve zkoumány pro jejich antikancerogenní, antibakteriální a antidiabetické vlastnosti, vykazují inhibiční aktivitu na PDE-5A. Tyto dva isoflavony byly izolovány z rostlinných extraktů a poté synteticky modifikovány, aby se získala sada polosyntetických derivátů s nepatrnými a zaměřenými modifikacemi. Sloučeniny byly nejprve testovány proti PDE-5A *in vitro* a na základě povzbudivých výsledků byly dále testovány pro jejich relaxační účinek na cévách potkana. Byly provedeny také výpočetní studie, které zkoumaly způsob interakce s cílovým proteinem. Získané údaje byly porovnány s mechanismem působení dobře známého PDE-5A inhibitoru sildenafilu. Výsledky ukazují, že polosyntetické deriváty osajinu a pomiferinu vykazují inhibiční účinek na izolovaný enzym, který je pro některé sloučeniny doprovázen vazodilatačním účinkem. Na základě zjištění se navrhuje zde popsané isoflavony jako potenciální sloučeniny vedoucí k vývoji nové třídy inhibitorů PDE-5A s vazodilatačními účinky, vycházející z přírodních látek [31].

PDE jsou třídou enzymů všudypřítomné v savcích tkáních, které inaktivují cyklický guanosin monofosfát (cGMP) a/nebo cyklický adenosin monofosfát (cAMP), podle stereospecifity hydrolyzuje intramolekulární fosfodiesterovou vazbu, čímž ovlivňuje různé signální dráhy v

buňce. Purifikace a charakterizace aktivity PDE byla poprvé objasněna Butcherem a Sutherlandem, zatímco pozdější studie zdůraznily důležitou úlohu jednotlivých izoenzymů fosfodiesterás v regulaci fyziologických a patologických stavů, jako jsou záněty, kardiovaskulární choroby a imunitní poruchy. Na základě těchto pozorování byly navrženy PDE jako možné farmakologické cíle při léčbě astmatu, chronické obstrukční plicní nemoci, systémové hypertenze a plicní arteriální hypertenze. V současné době inhibitory PDE-5 představují širokou škálu léčiv, které úspěšně nalézají využití ve farmakologickém léčení erektilní dysfunkce. Pokud jde o jejich mechanismus účinku, tato léčiva nejsou hydrolyzovatelné cGMP analogy, které působí tím, že zpomalují odbourávání cGMP pomocí PDE-5, a tím podporují uvolnění hladkého svalstva penisu, uvolnění cest, které vedou k erektilní účinku [31].

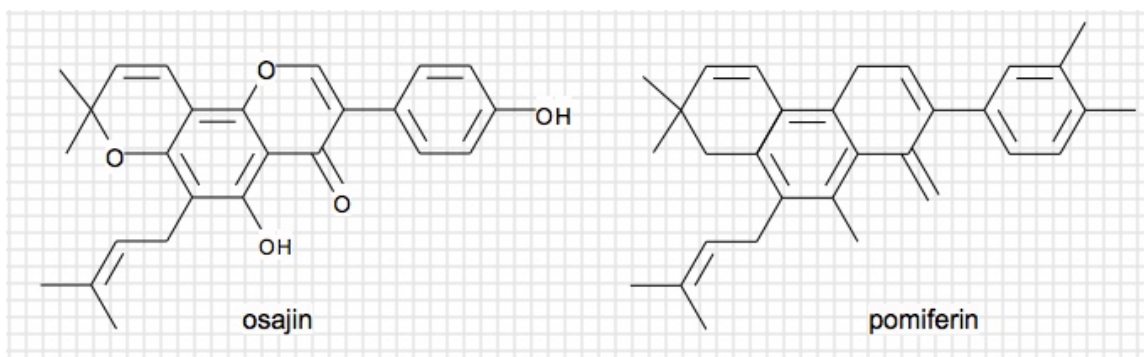
Sildenafil, vardenafil, tadalafil a avanafil jsou celosvětově schválené inhibitory PDE-5 používané při léčbě erektilní dysfunkce, zatímco udenafil a mirodenafil jsou schváleny pouze v Koreji. Podle jejich účinnosti, celkové bezpečnosti a různých farmakokinetických účinků se tyto molekuly používají jak v chronických, tak i v případě počátku erektilní dysfunkce. Na druhou stranu představují úskalí v pátrání po nových preparátech v léčbě erektilní dysfunkce, zvláště přírodního původu [31].

Přírodní flavonoidy představují širokou, dobře zdokumentovanou třídu biologicky aktivních molekul hluboce zkoumaných pro možnost jejich uplatnění v řadě oblastí. Některé isoflavony, zejména v poslední době, jsou hlášeny pro inhibici fosfodiesterasy a podporující relaxační účinek na izolované preparáty cév potkanů. Je také dobře známo, že prenylované flavonoidy mohou poukázat na zajímavý stupeň aktivity vůči PDE, příkladem byl test na potkaních *corpus cavernosum*, dříve léčených nitroprusidem sodným. Studie odhalila, že icariin inhibuje jak PDE5 a PDE4, tak zvyšuje hladinu cGMP. Icariin je jednou z hlavních složek rostliny z čeledi Berberidaceae (škornice - *Epimedium*). Přírodní a polosyntetické sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR analýzy a testovány na jejich inhibiční aktivitu proti PDE-5 ve srovnání se sildenafilem [31].

NMR analýzou se získaly tyto isoflavonoidy: hlavní 9-hydroxy-7-(*p*-hydroxyfenyl)-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxy-2H-fenantren-8-on (osajin) a 7-(3,4-dihydroxyfenyl)-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxy-2H-fenantren-8-on (promiferin) a syntetizovaný 10-[(3,3-dimethyl-2,3-oxiranyl)methyl]-9-hydroxy-3,4-epoxy-3,4-dihydro-7-(*p*-hydroxyfenyl)-2,2-dimethyl-1,5-dioxa-2H-fenantren-8-on, *p*-[9-acetoxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8-oxo-1,5-dioxy-2H-fenantren-7-yl]fenyl acetát, 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3-nitrofenyl)-6,8-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-chromanon, 7-{*p*-[*N,N*-dinitro(aminooxy)]fenyl}-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxy-2H-fenantren-8-on, 9-hydroxy-7-(4-hydroxy-3-nitrofenyl)-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxy-2H-fenantren-8-on, 7-(1,3-dioxy-5-indanyl)-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-

butenyl)-1,5-dioxa-2H-fenantren-8-on a 7-(1,4-dioxa-2,3-dihydronaft-6-yl)-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxy-2H-fenantren-8-on [31].

Na základě výsledků screeningu se zjistil způsob interakce mezi PDE-5A a nejúčinnějšími deriváty, kam patří *p*-[9-acetoxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8-oxo-1,5-dioxa-2H-fenantr-7-yl]fenylacetát, 7-{*p*-[*N,N*-dinitro(aminooxy)]fenyl}-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxa-2H-fenantren-8-on, 7-(1,3-dioxa-5-indanyl)-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxa-2H-fenantren-8-on a 7-(1,4-dioxa-2,3-dihydronaft-6-yl)-9-hydroxy-2,2-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-1,5-dioxa-2H-fenantren-8-on. Sloučeniny byly zakotveny do struktury cílené sildenafilem na PDE-5A, za předpokladu, že sdílejí podobný mechanismus účinku, jak naznačují *in vitro* studie [31].



Obr. 25: Struktura osajinu a pomiferinu, nakresleno ChemPencil [31]

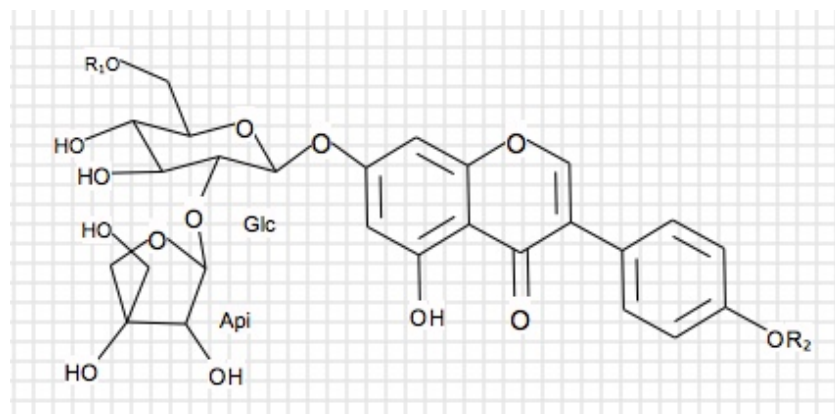
8.1.21. *Antidesma laciniatum* Müll. Arg.

Čeleď: Euphorbiaceae

Isoflavonoidy: Chevalierinosid A,B a C, biochanin A, genistein 7-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosid], genistein 7-*O*- β -D-glukopyranosid a kempferol 3-*O*- β -D-glukopyranosid

Během fytochemického zkoumání extraktu kůry kmene malého stromu *Antidesma laciniatum*, který je používán v Africe k prevenci potratu a léčbě střevních potíží, byly popsány nalezené struktury, kam patří chevalierinosidy B a C, dva nové isoflavonoidní glykosidy, charakterizované jako biochanin A 7-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosid] a genistein 7-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosid], společně se známými isoflavonoidy, kam patří chevalierinosid A, genistein 7-*O*- β -D-glukopyranosid, kempferol 3-*O*- β -D-glukopyranosid a triterpeny: friedelin, kyselina betulinová, kyselina 3-*O*-oxobetulinová, kyselina 3-*O*-hydroxybetulínová, které byly izolovány. Jejich struktury byly vytvořeny přímou interpretací jejich

spektrálních dat, zejména HR-TOFESIMS, 1D-NMR (^1H , ^{13}C a DEPT) a 2D-NMR (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC a HMBC) analýzou a porovnáním dat s literaturou [32].



Obř. 26: Žákladní struktura: (1) $R_1=H$, $R_2=Me$; (2) $R_1=H$; $R_2=H$; (3) $R_1=Rha$, $R_2=Me$, nakřesleno ChemPencil [32]

8.1.22. *Achyranthes bidentata* Blume

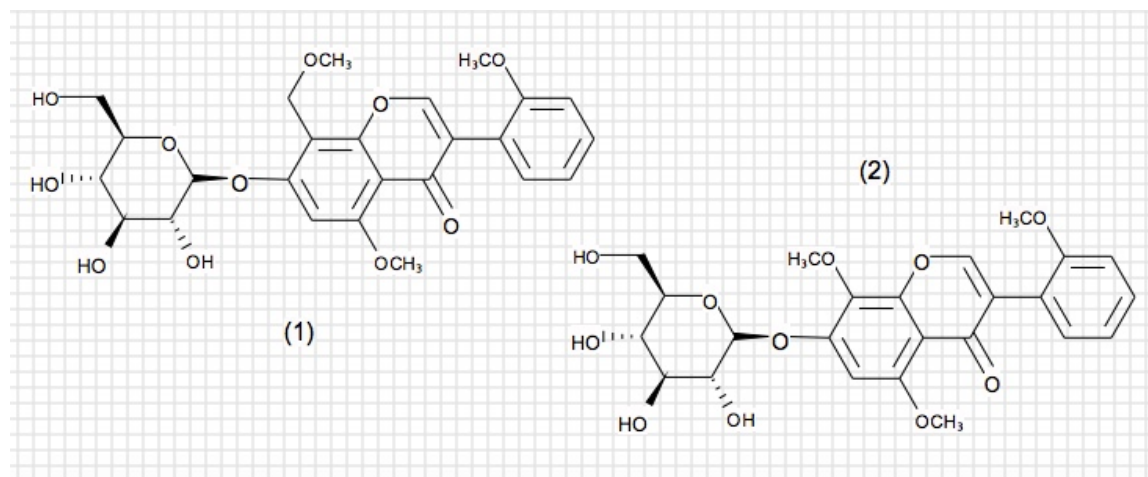
Český název: Achyřant dvouzubý

Čeleď: Amaranthaceae

Isoflavonoidy: Achyřanthosidy A a B

Dva nové isoflavonoidní glukosidy, achyřanthosidy A a B, byly izolovány z kořenů *Achyranthes bidentata*. Jejich struktury byly vytvořeny rozsáhlými analýzami za použití spektroskopických dat ^1H a ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC, NOESY a HREISMS. Struktury nových sloučenin jsou charakterizovány methoxylovými skupinami substituovanými na specifických polohách fenylových kruhů. Obě sloučeniny byly hodnoceny pro jejich antiflogistické účinky na lipopolysacharid (LPS) indukovanou produkci oxidu dusnatého (NO) v potkaních buňkách makrofágů RAW264.7. Sloučeniny vykazovaly významnou inhibici při produkci NO vyvolané LPS [33].

Rod *Achyranthes* zahrnuje asi patnáct druhů, z nichž mnohé jsou široce rozšířené v tropických a subtropických oblastech světa. *A. bidentata* je trvalá bylina nalezená v Africe, Vietnamu a Číně. Jeho kořeny byly používány v tradiční čínské medicíně k léčbě různých onemocnění, jako jsou zánětlivé a traumatické poranění. Předchozí zkoumání chemických složek rostliny vedlo k izolaci steroidů, lignanů a flavonoidů. Sloučeniny získané z této rostliny byly charakterizovány novými strukturami a významné biologické účinky vzbuzují vzrušující zájmy vědeckých pracovníků po celém světě. Při hledání objevujících se antiflogistických látek z přírodních zdrojů se podnítilo zaměření na *A. bidentata*. V této studii byly z kořenů *A. bidentata* izolovány dva nové isoflavonoidní glukosidy, achyřanthosidy A a B. Dále byly hodnoceny jejich antiflogistické účinky na produkci NO vyvolané LPS u RAW264.7 [33].



Obr. 27: Struktury achyranthosidu A a B, nakresleno ChemPencil [33]

Dvě nové sloučeniny byly hodnoceny na produkci NO indukované LPS u makrofágů RAW264.7. Obě sloučeniny vykazovaly významné inhibiční účinky s hodnotami IC_{50} 12,2 a 15,6 μ M. Pro pozitivní kontrolu byl použit aminoguanidin s hodnotami IC_{50} 1,8 μ M. Tento výsledek ukázal, že achyranthosidy A a B by mohly potenciálně léčit zánětlivé onemocnění. Dříve analyzované analogy isoflavonoidů vykazovaly různé antiflogistické hladiny, které byly ovlivněny především jejich různými substituenty. Současná studie Tana a kol. uvádí izolaci, strukturální objasnění a antiflogistické hodnocení nových isoflavonoidních glukosidů izolovaných z *A. bidentata*. Výsledky zdůraznily, že substituovaný vzorek na kruzích A a B těchto dvou sloučenin, byl v přírodě jen zřídka viděn. Navíc oba vykazovaly významné inhibiční účinky proti produkci NO, a tak položily základ pro objevení nových terapeutických látek pro léčení zánětlivých onemocnění [33].

Byla provedena extrakce a izolace kořenů *A. bidentata*, které byly vysušeny na vzduchu, nakrájeny na kusy a extrahovány za použití směsi ethanolu a vody při pokojové teplotě. Po filtraci a zahuštění se získaný surový extrakt solubilizuje v destilované vodě a potom se postupně rozdělí do 2 litrů petroletheru, 3 litrů ethylacetátu a 5 litrů n-butanolu. Butanol rozpustná frakce se podrobí sloupcové chromatografii na silikagelu a eluuje se gradientem dichlormethan:methanol. Bylo shromážděno sedm frakcí (A-G). Frakce C byla purifikována sloupcovou chromatografií na Sephadexu LH-20, následovanou semipreparativní HPLC elucí MeOH-H₂O (průtok 2,0 ml/min) pro achyranthosid A a achyranthosid B, jako eluátů [33].

Test na inhibiční schopnost proti LPS-indukované produkci NO se stanovil tak, že makrofágy RAW264.7 byly naočkovány do 24 jamkových destiček (105 buněk/jamka). Buňky byly společně s LPS inkubovány se sulfanilamidem a naftylethylendiaminu v roztoku kyseliny fosforečné po dobu 24 hodin. Množství NO bylo stanoveno stanovením koncentrace NO v kultivovaných RAW264.7. 100 μ l supernatantu se postupně inkubuje s 50 μ l 1% sulfanilamidu a 50 μ l 0,1% naftylethylendiaminu v 2,5% roztoku kyseliny fosforečné. Absorbance byla zaznamenávána na snímači mikrodestiček při 570 nm [33].

8.1.23. *Nicotiana tabacum* L.

Český název: Tabák virginský

Čeleď: Solanaceae

Isoflavonoidy: 4',8-dihydroxy-6,7-dimethoxyisoflavon, 4',6-dihydroxy-8-methoxykarbonyl-7-methoxyisoflavon, 4',7-dimethoxy-8-hydroxymethyl-6-hydroxyisoflavon

Tři nové isoflavony, 4',8-dihydroxy-6,7-dimethoxyisoflavon, 4',6-dihydroxy-8-methoxykarbonyl-7-methoxyisoflavon a 4',7-dimethoxy-8-hydroxymethyl-6-hydroxyisoflavon, spolu s třemi známými isoflavony: 7-hydroxy-3',4',5',6-tetramethoxy-isoflavonem, genisteinem a 2',4',5',6,7-pentamethoxyisoflavonem, byly izolovány z listů *Nicotiana tabacum*. Jejich struktury byly objasněny spektroskopickými metodami, včetně rozsáhlých 1D- a 2D NMR technik [34].

Nicotiana tabacum pochází z tropické Ameriky a nyní se pěstuje po celém světě jako primární komerční zdroj tabáku. Navíc je *N. tabacum* používána jako insekticid, anestetikum, diaforetikum, sedativum a emetikum v tradiční čínské medicíně. Předcházející fytochemické studie tabáku ukázaly přítomnost seskviterpenů, alkaloidů, lignanů, flavonoidů, fenyylpropanoidů, bifenyľů, fenolových amidů a isokumarinů [34].

8.1.24. *Azorella madreporica* (Phil.) Reiche

Čeleď: Apiaceae

Isoflavonoidy: Genistein-8-C- β -D-glukopyranosid, alpinum isoflavon, anguston C a 4'acetylalpinum isoflavon

Čtyři isoflavony byly izolovány z extraktu MeOH vzorku *Azorella madreporica* z vysokých And severního Chile pomocí selektivní frakcionace za použití DPPH radikálu. Sloučeniny byly identifikovány pomocí NMR spektroskopie a hmotnostní spektrometrie společně s osmnácti dalšími komplexními isoflavony přítomnými v rostlinném extraktu, které byly poprvé detekovány za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s vysokým rozlišením. Získané výsledky ukázaly, že vyvinutá metodologie je vhodná pro rychlou analýzu a identifikaci isoflavonů v extraktech *A. madreporica*, která mohou mít potenciální využití jako přísady do potravin nebo jako výživový doplněk kvůli vysokému obsahu isoflavonů. V *Azorella madreporica* byly izolovány tyto sloučeniny: genistein-8-C- β -D-glukopyranosid, alpinum isoflavon, anguston C a 4'acetylalpinum isoflavon. Posledně jmenovaná sloučenina 4'acetylalpinum isoflavon je nový derivát isoflavonu

izolovaný poprvé z rostlinného zdroje. Mírné antioxidační účinky a obsah isoflavonoidů, které se nacházejí v nadzemních částech, mohou alespoň částečně vysvětlit tradiční využití přirozených rostlinných složek a zdravotních prospěchů této rostliny [35].

8.2. LILIOPSIDA - JEDNODĚLOŽNÉ ROSTLINY

8.2.1. *Iris kashmiriana* Baker

Český název: Kosatec

Čeleď: Iridaceae

Isoflavonoidy: Glykosid I. a II.

Rakovina je jednou z obtížných onemocnění lidské populace. Chemoterapie je nezbytnou součástí léčby rakoviny. Ne všechny výsledky chemoterapie jsou pozitivní a úspěšnost terapie není u každého jedince stejná. Účinnost chemoterapie je omezená a doprovází ji nežádoucí účinky, z nichž některé jsou i život ohrožující. Očekává se, že nárůst rakoviny se zvýší o 70 % do dvou let. Bezpečnost chemoterapie je hnacím motorem pro biomedicínské výzkumné pracovníky a chemiky, aby prozkoumali možnosti chemoterapeutik přírodního původu. Výzkum rakoviny v posledním desetiletí ukázal, že fytoaktivita rostlin, zejména polyfenolu, jako jsou flavonoidy a isoflavonoidy a jejich syntetické analogy, jsou velmi účinné proti různým druhům rakoviny. Zjistil se jeden z hlavních mechanismů účinku antikancerogenní aktivity isoflavonoidu a jejich derivátů na inhibici nukleárního faktoru kappa B (NF-kappa B). NF-kappa B je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v karcinogenezi, imunitních a zánětlivých regulacích. Jeho karcinogenní a imunitní regulační účinek pochází z kombinace různých účinků, jako je například NF-kappa B indukující expresi genů, které podporují proliferaci buněk, angiogenezi a stymulují šíření a metastázování. Navíc aktivace NF-kappa B je také považována za jeden z hlavních faktorů odolnosti vůči chemoterapii a záření. Proto jsou isoflavonoidy a jejich deriváty zkoumány z hlediska hledání nových chemoterapeutik účinných v inhibici NF-kappa B. NF-kappa B (nukleární faktor kappa lehkého řetězce aktivovaných B-buněk) je proteinový komplex, řídící transkripci DNA [36].

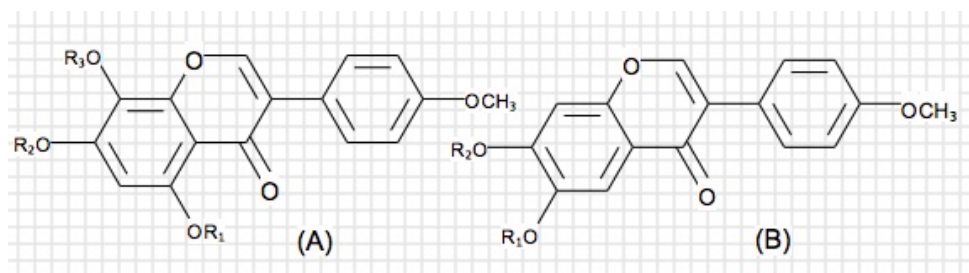
Extrakci a izolaci fytochemických látek z oddenku *Iris kashmeriana* se provádí obvyklým způsobem. Oddenky *Iris kashmiriana* byly usušeny, nakrájeny a rozdrobeny na prášek (500 g). Extrakce práškované drogy byla prováděna petroletherem (60-80°C) za použití Soxhletova zařízení (24 hodinový průběh). Získal se extrakt z petroletheru a matrice se extrahovala methanolem za použití Soxhletova zařízení (24 hodinový průběh). Methanолоvý extrakt (5 g) se podrobil postupně

frakcionaci toluenem, chloroformem, ethylacetátem a n-butanolem. Byl proveden fytochemický screening každého extraktu a frakce. Na základě výsledků fytochemického screeningu byly glykosidy přítomny v n-butanolové frakci. Sloupcová chromatografie byla provedena n-butanolovou frakcí v chloroformu:methanolu (9:1) jako rozpouštědlo systému. Frakce (1-100) se shromáždily a pozorovala se TLC. Tři různé jednotlivé skvrny byly nalezeny v rozmezí 40-50, 55-60 a 85-100 v jednotlivých zkumavkách. Stejně vzorky TLC byly shromážděny. Všechny nalezené teploty tání byly nekorigované. Pomocí ^1H NMR a ^{13}C NMR bylo zaznamenáno spektrum na BRUKER AVANCE II 400 NMR spektrometru, za použití rozpouštědla s TMS jako vnitřní standard. Byly provedeny fytochemické testy a v n-butanolové frakci byly identifikovány následující sloučeniny. To vedlo k izolaci dvou glykosidů (obr. 28) a třinácti analogů. Důvodem pro tento výběr je největší výtěžnost isoflavonoidů. Přibližně okolo dvěstě sloučenin bylo nalezeno v rodu *Iris* (flavonoidy, isoflavonoidy a jejich glykosidů, benzochinony, triterpenoidy a stilbeny) [36].

Studie 30 možných analogů byly prováděny v souvislosti s aktivním místem NF-kappa B. Všechny 30 molekul bylo zpracováno podle obvyklého postupu: hydrolýza, acetylace, methylace, demethylace a esterifikace v jiném místě obou glykosidů a jejich aglykonů (isoflavony). Tyto molekuly byly zabudovány do aktivního místa NF-kappa B. Použito a prezentováno je 15 hlavních sloučenin. Podle průtokové cytometrické analýzy většina molekul prokázala, že indukují zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M [36].

Biologická aktivita izolovaných glykosidů a jejich analogů, byly podrobeny antioxidantní aktivitě prostřednictvím DPPH a ABTS a antikancerogenní aktivity proti různým buněčným liniím [36].

Závěrem studie Alamy a kol. byla izolace nové řady isoflavonů a jejich analogů z oddenků *Iris kashmiriana*. *In vitro* screening izolovaných isoflavonů a jejich analogů byl proveden pro antikancerogenní účinnost za použití NF-kappa B pro jeho cílovou a antioxidantní účinnost. Izolované isoflavony a jejich analogy vykazovaly vynikající interakce s NF-kappa B. Většina sloučenin vykazovaly antikancerogenní účinky v různých rakovinových buněčných liniích. Mezi nimi sloučeniny (1b) a (1g) vykazovaly značnou širokospektrální antikancerogenní aktivitu indukci zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M. Slibná aktivita těchto sloučenin (1b) a (1g) vyžaduje další *in vivo* pokusy a klinické studie [36].



Obr. 28: Struktura glykosidu I.(A) a II.(B) a jejich aglykonů (isoflavonů) - (A); **Glycosid-I. 1)** $R_1 = H$, $R_2 = Glu$, $R_3 = H$; **1a)** $R_1 = OCOCH_3$, $R_2 = Glu$, $R_3 = OCOCH_3$; **1b)** $R_1, R_2, R_3 = H$; **1c)** $R_1, R_2, R_3 = OCOCH_3$; **1d)** $R_1 = OCH_3$; $R_2 = Glu$, $R_3 = OCH_3$; **1e)** $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$, $R_3 = OCH_3$; **1f)** $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCOCH_3$, $R_3 = OCH_3$; **1g)** $R_1, R_2, R_3 = H$; $OCH_3 = OH$, (B); **Glycosid-II. 2)** $R_1 = H$, $R_2 = Glu$, **2a)** $R_1 = COCH_3$, $R_2 = H$; **2b)** $R_1, R_2 = COCH_3$; **2c)** $R_1, R_2 = H$; **2d)** $R_1 = CH_3$; $R_2 = Glu$; **2e)** $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$; **2f)** $R_1 = CH_3$; $R_2 = OCOCH_3$, nakresleno ChemPencil [36]

8.2.2. *Iris germanica* L.

Český název: Kosatec německý

Čeleď: Iridaceae

Isoflavonoidy: 8-hydroxyirilon 5-methylether a 8-hydroxyirilon, 4-methylether, irilon, irisolidon, irigenin S, irigenin, irilon 4'-O-β-D-glukopyranosid a A iridin

Rostliny rodu *Iris*, včetně více než 300 dalších druhů, jsou rozšířenou skupinou rostlin s diverzifikovanou distribucí, sekundárními metabolity a významnými bioaktivitami. Jsou to kvetoucí rostliny s elegantními květy s charakterickou vůní a široce rozšířené v mírných oblastech po celé severní polokouli, které se vyskytují převážně v Euroasii a Severní Americe. Některé druhy *Iris* se nacházejí v mokřadech, většina druhů se vyskytuje v pouštních, polopouštních nebo suchých a skalnatých místech [37].

Iris germanica je nejdůležitějším zkoumaným druhem *Iris*. Jeho oddenky obsahují irony, které vykazovaly silné pesticidní a antikancerogenní účinky. Tectorigenin, isoflavon izolovaný z *I. germanica* se používá v léčbě chorob souvisejících s hormony v patentovaných farmaceutických kompozicích. Jeho silice se používá v kosmetickém a parfémovém průmyslu. Navíc jeho listy jsou prosperujícím zdrojem vitamínů a kyseliny askorbové [37].

Jeho vodný extrakt stimuluje dýchání, snižuje aktivitu hladkých svalů, má centrální inhibiční účinky vůči serotoninu a vyvolává přechodnou hypotenzi. Jeho kořenový odvar byl využit jako antiflogistické, antispasmodické, diuretické, stimulační, zesilující menstruaci, projímavě působící léčivo i na silnou kataraktu [37].

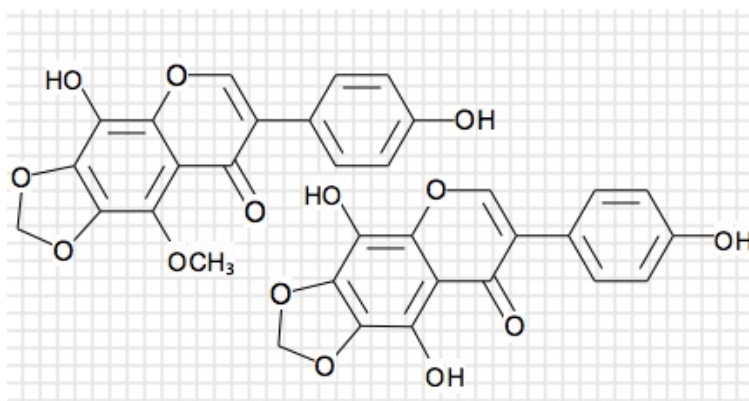
Předchozí fytochemické studie *I. germanica* odhalily izolaci různých složek, včetně flavonoidů, triterpenů, sterolů, fenolů, ceramidů a benzochinonů [37].

Z ethanolového extraktu oddenku *Iris germanica* byly izolovány dvě nové a osm již známých sloučenin, které byly zjištěny různými spektroskopickými analýzami a byla hodnocena antioxidační a α -amylasová inhibiční účinnost izolovaných sloučenin a porovnán vztah mezi strukturou a mechanismem účinku [37].

Diabetes je jedním z nejrychleji rostoucích, finančně nákladných a jeden z velmi vážných onemocnění dnešního moderního světa a účinná léčiva na jeho léčbu se stále nenalezla. Řízení hladiny cukru v krvi pacienta je účinným způsobem, jak zmírnit a omezit vznik hyperglykémie z exacerbace. Hyperglykémie má za následek autooxidaci glukósy, glykaci bílkovin a stimulaci metabolismu polyolu. Proto rostoucí množství volných radikálů a oxidativní stres mají významnou roli v patogenezi diabetu a souvisejících komplikací [37].

Lidská slinná α -amylasa je nejrozšířenějším enzymem v lidských slinách, která hydrolyzuje škrob na oligosacharidy. Inhibitory amylasy pro léčbu diabetu mohou účinně zpomalit digesti sacharidů a asimilaci v počátečním stadiu trávení a snížit absorpci glukósy, což vede k potlačení postprandiální hyperglykémie. Isoflavonoidy analogické s estradiolem ve strukturách se staly velkým zájmem zkoumání kvůli přínosům pro zdraví spojeným s jejich konzumací a jejich účinností pro zpomalení až zastavení vzniku některých zcela převládajících chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba a osteoporóza. Bylo zjištěno, že isoflavonoidy jsou účinnými antioxidanty a hypoglykemickými látkami při inhibici oxidativního stresu a při kontrole postprandiální hyperglykémie. Nedávné výzkumy byly zaměřeny přímo na objev přírodních účinných antioxidantů a inhibitorů amylasy s potenciálním použitím jako terapeutická léčiva pro léčbu diabetu a vzniku dalších poruch [37].

Druhy rodu *Iris* jsou dobře známé pro svůj vysoký obsah isoflavonoidů. Fytochemickým stanovením oddenku *Iris germanica* byly touto studií zjištěny dva nově izolované isoflavonoidy, mezi ně patří 8-hydroxyirilon-5-methyl-ether a 8-hydroxyirilon, spolu s osmi již známými isoflavonoidy: 4-methylether, irilon, irisolidon, irigenin S, irigenin, irilon 4'-O- β -D-glukopyranosid a A iridin. Izolované isoflavonoidy byly strukturně charakterizovány pomocí komplexních spektroskopických analýz (UV, IR, 1D a 2D-NMR a HRMS) a srovnány s publikovanými daty. Za použití inhibičních testů DPPH a α -amylás byla odhadnuta jejich antioxidační a antidiabetická kapacita. Sloučeniny 8-hydroxyirilon-5-methyl-etheru, 8-hydroxyirilonu a irilonu, vykazovaly prominentní antioxidační účinky s hodnotami IC_{50} 12,92, 9,23 a 10,46 μ M v porovnání s pyrogalátem (IC_{50} 7,11 μ M). Navíc 8-hydroxyirilon-5-methyl-ether a irisolidon vykazovaly nejvyšší inhibiční aktivitu α -amylasy s inhibicí 66,1, 78,3, 67,3 a 70,1 % v porovnání s akarbósu (eferenční inhibitor α -amylasy) obr. 29 [37].



Obr. 29: Základní struktura 8-hydroxyirilon 5-methyletheru a 8-hydroxyirilonu, nakresleno ChemPencil [37]

V rámci izolace antioxidantů a inhibitorů α -amylasy z rostlinného zdroje našlo nedávné vyšetření oddenku *I. germanica* dva nové isoflavonoidy: 8-hydroxyirilon-5-methylether (2) a 8-hydroxyirilon (3) a osm již známých metabolitů. Tato studie Ibrahimy a kol. podává popis strukturní charakteristiky pomocí spektrálních analýz, zejména 1D a 2D-NMR a HRMS, kromě porovnání s literárními zdroji. Antioxidační a antidiabetické potenciály izolovaných metabolitů byly odhadnuty s použitím inhibičních testů DPPH a α -amylasy. Navíc byl diskutován jejich vztah struktury s mechanismem účinku [37].

Vlastní analýza byla provedena ze shromážděných oddenků *Iris germanica* z botanické zahrady zemědělské fakulty (Univerzita Assiut - Egypt) v květnu 2014. Praškováná droga oddenků *Iris germanica* (270 g) byla extrahována pomocí methanolu za vzniku tmavě hnědého zbytku (12,9 g). Později se podrobila vakuové kapalinové chromatografii na oxidu křemičitém (VLC) za použití n-hexanu, CHCl_3 a EtOAc za získání 2,9 g n-hexanu (IG-1), CHCl_3 (IG-2 2,4 g), EtOAc (IG-3 1,1 g) a vodné frakce (IG-4, 4,6 g). Frakce IG-2 (2,4 g) se podrobila VLC za použití elučního systému (n-hexan:EtOAc), čímž se získalo sedm subfrakcí: IG-2A až IG-2G. SiO_2 CC subfrakce IG-2C (118,5 mg) za použití CHCl_3 :MeOH poskytlo 1 až 2 nečistoty, každá byla čištěna na LiChrolut EN/RP -18 v extrakční zkumavce v pevné fázi za použitím gradientu (H_2O :acetonitril) za vzniku sloučeniny 1 (17 mg žluté jehličky) a sloučeniny 2 (5,8 mg, žluté lesklé krystaly). Subfrakce IG-2D (67mg) se chromatografuje na SiO_2 CC za použití směsi chloroformu a methanolu v poměru 98:2 - 90:10 za získání nečistoty 3, která se čistí na LiChrolut EN/RP -18 v extrakční zkumavce v pevné fázi za použitím gradientu (H_2O :acetonitril) za získání sloučeniny 3 (11,2 mg, žluté krystaly). Subfrakce IG-2E (410 mg) se podrobí SiO_2 CC za použití CHCl_3 :MeOH. Sloučenina 5 (5,2 mg, žlutý amorfni prášek) se za použití eluční soustavy ze které se vytvořilo 35 g subfrakce IG-2F (218 mg) za použití směsi CHCl_3 :MeOH. Sephadex LH-20 CC IG-3 (1,1 g) za použití MeOH: CHCl_3 poskytlo pět subfrakcí: IG-3A až IG-3E. RP-18 CC IG-3A (118mg) za použití gradientu H_2O :MeOH poskytlo sloučeniny 10 (17 mg, žlutý amorfni prášek) a 9 (6,9 mg, žlutý amorfni prášek). Subfrakce IG-3B (130 mg) se chromatografuje na SiO_2 CC za použití směsi

CHCl₃:MeOH za vzniku sloučeniny 8 (14,1 mg žlutého amorfního prášku). SiO₂ CC subfrakce IG-3D (115,4 mg) za použití gradientu CHCl₃:MeOH poskytlo nečistoty 6 a 7, každá byla čištěna ve zkumavce LiChrolut EN/RP-18 za použití gradientu (H₂O:acetonitril), čímž se získá 6 (6,7 mg, žluté jehličky) a 7 (17 mg, žluté jehličky) [37].

Stanovení α -amylasy bylo provedeno za použití soupravy EnzCheck® Ultra Amylase Kit (E33651). α -amylasový enzym a roztoky DQ škrobu byly zředěny pufrům (pH 6,9). 50 μ l enzymu, 10 μ l/50 μ g každé sloučeniny (DMSO) a 40 μ l pufru bylo umístěno do mikrotitračních jamek a temperováno na 37°C po dobu 5 minut. Potom bylo přidáno 100 μ l DQ škrobu. Fluorescence získaných produktů (se sloučeninami nebo bez nich) z DQ škrobu byla hodnocena při λ_{max} 485 \pm 10 nm pomocí čtečky mikroděstiček Tecan Genios (0-30min). Inhibiční aktivita byla stanovena ve vztahu k akarbóse ve stejné koncentraci. Aktivita a inhibice % byly odhadnuty pomocí následujících rovnic:

$$\% \alpha\text{-amylasové aktivity} = 100 \times (F_s^{30} - F_s^0) / (F_c^{30} - F_c^0)$$

Kde F_s^{30} vzorku po 30 minutách, F_s^0 vzorku v 0 minutě, F_c^{30} kontrolního vzorku po 30 minutách a F_c^0 kontrolního vzorku po 0 minutě [37].

Test antioxidační schopnosti sloučenin 1-10, byl stanoven za použití 2,2'-difenylypikrylhydrazylvého (DPPH) stanovení, jak bylo uvedeno výše při koncentracích 5, 10, 20, 40, 80 a 100 μ M v HPLC MeOH. 1 ml testované sloučeniny se smísí s 1 ml DPPH a ponechá se 30 minut. Absorbance byla odhadnuta na 517 nm ve srovnání s DPPH v MeOH (blank). Aktivita % byla stanovena pomocí následujícího vzorce:

$$\text{antioxidační aktivita} = 100 \times \left(\frac{\text{absorbance vzorku}}{\text{absorbance blanku}} \right)$$

Propylgalát (PG) byl použit jako standardní antioxidant. Průměrné hodnoty byly vyneseny tak, aby získaly IC₅₀ proti DPPH lineární regresi [37].

Oxidace je doplňkový proces buněčného metabolismu. Volné radikály, které vznikají během metabolických procesů, mají nepárové elektrony, které jsou extrémně reaktivní a výsledkem je poškození buňky, což vede k membránové lipidové peroxidaci a poškození DNA a enzymů. Antioxidanty mají významnou roli při snížení vzniku různých chronických onemocnění, jakou jsou revmatoidní artritida, katarakta, srdeční onemocnění, Alzheimerova choroba, mrtvice a rakovina. Přírodní antioxidanty hrají velký význam při inhibici oxidačního stresu, který vyvolává poškození. *I. germanica* je uznávaným zdrojem isoflavonoidů (přirozených estrogenů, fytoestrogenů), které se akumulují hlavně v oddencích. Kvůli své fenolové povaze mohou isoflavonidy poskytnout atomy vodíku z jejich fenolové hydroxylové skupiny (skupin) k škodlivým

oxy radikálům, čímž vzniknou méně reaktivní fenoxylly. Také mají schopnost chelátovat kovové ionty a vykazují potenciální antioxidační aktivitu. Vodné a etanolové extrakty kořenů *I. germanica* vykazovaly silný antioxidační účinek. V této studii byly sloučeniny 1-10 hodnoceny pro své antioxidační schopnosti pomocí DPPH testu. Výsledky ukázaly, že sloučeniny 2, 3 a 4 vykazují významné antioxidační účinky s hodnotami IC₅₀ 12,92, 9,23 a 10,46 μM v porovnání s PG (IC₅₀ 7,11 μM). Avšak sloučeniny 1 a 5-10 vykazovaly mírné aktivity. Navíc předchozí práce ukázala, že isoflavonoidy zvyšují aktivitu antioxidačních enzymů, jako je glutathion reduktáza superoxid dismutasa, glutathion peroxidasa a katalasa [37].

Vztah mezi strukturou a aktivitou a porovnání antioxidačních a inhibičních účinků α -amylasy těchto skupin isoflavonoidů, byl prokázán vztah strukturální aktivity těchto sloučenin, který je v souladu s jinými studiemi. Jejich typické strukturální vlastnosti ovlivňující antioxidační a α -amylasové inhibiční účinky jsou ilustrovány na obr. 29. Bylo zjištěno, že poloha a počet hydroxylů je významným faktorem antioxidační účinnosti. C-4'hydroxyl je vysoce významný proti antioxidačním potenciálům a jeho substituce methoxyskupinou a/nebo její ztrátou snižuje vlastnosti těchto sloučenin. Zavedení hydroxylové skupiny na C-8 významně zvyšuje aktivitu. Ztráta hydroxylové skupiny C-5 snižuje aktivitu isoflavonoidů. Blokování hydroxylové skupiny C-7 glukózou nemělo žádný vliv na antioxidační účinky, což naznačuje, že existence C-7 hydroxylů má nepatrný vliv na aktivity těchto sloučenin. Při inhibiční aktivitě α -amylasy se zvyšuje hydroxylace na C-5 inhibiční aktivity α -amylasy. Glykosylace isoflavonoidů snížila jejich aktivitu. Nicméně methylace hydroxylových skupin a zvýšení počtu hydroxylů v kruzích A a B zvyšuje aktivitu. Výsledky získané v této studii nabízejí významné poznatky o použití *I. germanica* jako součásti stravy. Nicméně je zapotřebí prokázat *in vivo* účinky, aby se prozkoumal další pravděpodobný mechanismus účinku, který by ovlivňoval hyperglykémii [37].

8.2.3. *Gynandris sisyrinchium* (L.) Parl.

Český název: Protistojka

Čeleď: Iridaceae

Isoflavonoidy: 3'-methyltenuifon, gynandrinon, β -sitosterol, 7,3'-dimethoxy-5,6,4'-trihydroxyisoflavon, iristectorigenin, hispidulin, galangustin, 6-hydroxybiochanin A, kyselina ursolová, ladanetin, 4'-O-methylgenistein a β -sitosterol glukosid

Analýzou rostliny *Gynandris sisyrinchium* vedlo k izolaci a charakterizaci celkem dvanácti sloučenin, z nichž dvě jsou zde v přírodě poprvé popsány. Tyto nové sloučeniny obsahovaly

isoflavony: 3'-methyltenuifon, gynandrinon, β -sitosterol, 7,3'-dimethoxy-5,6,4'-trihydroxyisoflavon, iristectorigenin, hispidulin, galangustin, 6-hydroxybiochanin A, kyselinu ursolovou, ladanetin, 4'-O-methylgenistein a β -sitosterol glukosid. Izolované sloučeniny byly charakterizovány různými spektroskopickými metodami včetně NMR (1D a 2D), UV, IR a MS. Byly zkoumány antioxidační a cytotoxické účinky isoflavonů 3'-methyl tenuifonu, 7,3'-dimethoxy-5,6,4'-trihydroxyisoflavonu a gynandrinonu. Sloučenina 7,3'-dimethoxy-5,6,4'-trihydroxyisoflavonu vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu ($IC_{50} = 17,3 \text{ ug/ml}$) ve srovnání se sloučeninami gynandrinonu a 3'-methyl tenuifonu. Cytotoxická aktivita proti buňkám promyelocytické leukémie HL-60 ukázala, že sloučenina 3'-methyl tenuifonu byla nejaktivnější. Výsledky ukazují, že cytotoxicita sloučeniny 3'-methyl tenuifonu je zprostředkována apoptózou [38].

Iridaceae jsou velká a zajímavá rostlinná čeleď s rozmanitou květenou. Mnozí zástupci této čeledi jsou kvůli svým krásným květům používáni jako okrasné rostliny. Tato čeleď obsahuje asi 1750 druhů v 82 rodech. Iridaceae jsou distribuovány po celém světě, včetně tropických a mírných oblastí. Rostliny patřící do této čeledi byly použity v tradiční medicíně pro léčbu různých onemocnění včetně nachlazení, chřipky, malárie, bolesti zubů, modřin a popálenin. Mnoho rostlin patřících do rodu *Iris* bylo zkoumáno fytochemicky a biologicky. Studie zahrnují izolaci dvou nových isoflavonů a jednoho flavanolu z *Iris potaninii* a dvou isoflavonů, nigricinu a nigricaninu z oddenků *Iris nigricans*, druh *Iris*, který je endemický pro Jordánsko [38].

I když mnoho rostlin patřících k rodu *Iris* bylo zkoumáno pro jejich chemické složky, rostliny patřící do rodu *Gynandrinis* jsou v literatuře uváděny jen zřídka. Extrakt *G. sisyrinchium* byl zkoumán pro fungicidní účinky. V poslední době byla objevena chemická složení silic získaných z listů a cibulí *G. sisyrinchium* a byla zkoumána jejich antimikrobiální aktivita [38].

V pokračování rozsáhlého úsilí zaměřeného na fytochemické vyšetření a biologické hodnocení léčivých rostlin patřících do oblasti Středozemního moře, zejména těch, které rostou divoce v Jordánsku, tato studie Al-qudaha a kol. uvádí izolaci a strukturní objasnění dvou nových isoflavonů, 3'-methyl tenuifonu a gynandrinonu poprvé. Kromě toho *G. sisyrinchium* poskytlo deset dalších známých sloučenin [38].

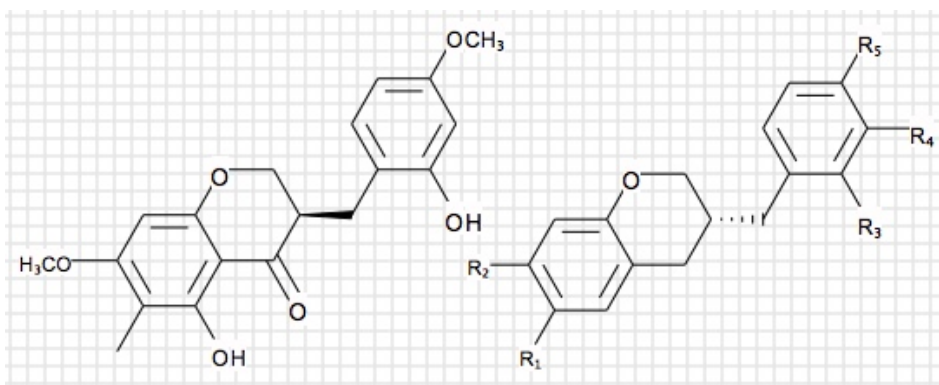
8.2.4. *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker Gawl.

Český název: Sedoulek japonský

Čeleď: Convallariaceae

Isoflavonoidy: Homoisopogon A, homoisopogon B, C a D

Fytochemická frakcionace methanolového extraktu hlíz *Ophiopogon japonicus* vedla k izolaci nového homoisoflavanonu, homoisopogonu A (1) a tří nových homoisoflavanů, homoisopogonu B-D (2-4). Jejich chemické struktury byly objasněny spektrálními metodami MS, NMR a cirkulárního dichroismu (CD). Homoisopogon A (1) vykazoval silnou cytotoxicitu proti LU-1 lidskému plicnímu adenokarcinomu, lidskému epidermoidnímu karcinomu a lidským melanomovým SK-Mel-2 rakovinným buňkám s hodnotami IC₅₀ v rozmezí od 0,51 do 0,66 μM [39].



Obr. 30: Struktura homoisoflavanonu homoisopogonu A (1) a tři homoisoflavanů (2, 3 a 4), nakresleno ChemPencil [39]

Tab. 7: Substituenty tři homoisoflavanů 2, 3 a 4 [39]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
2	CH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
3	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
4	CH ₃	OH	H	-OCH ₂ O-	-OCH ₂ O-

Ophiopogon japonicus je distribuován široce v jihovýchodní Asii. V tradiční vietnamské medicíně byla široce použita jako tonikum, pro léčbu kašle, horečky, epistaxe, zánětu, respiračních onemocnění, zácpy a gastrointestinálních poruch. Předchozí fytochemické studie ukázaly, že *O. japonicus* obsahuje steroidní saponiny, homoisoflavonoidy, polysacharidy, fenolové kyseliny a seskviterpeny. Byly zaznamenány antiflogistické, antikancerogenní, antidiabetické a antioxidantní účinky *O. japonicus*. Homoisoflavonoidy patří do speciální třídy flavonoidů, jejichž B-kruh je spojen s C-kruhu další skupinou CH₂. Bylo prokázáno, že homoisoflavonoidy izolované z *Ophiopogon japonicus* vykazují různé biologické účinky, včetně ochranných účinků na poranění cerebrální ischemie/reperfuze (I/R), antioxidantní, protizánětlivé a cytotoxické účinky [39].

Vysušená a práškováná droga hlízy *O. japonicus* (2,4 kg) byla extrahována methanolem v lázni po dobu 30 minut při 40°C. Extrakt se koncentruje ve vakuu, čímž se získá surový zbytek (360g), který se potom resuspenduje ve vodě (2 litry) a extrahuje chloroformem za získání chloroformu a zbytků vody. Chloroformový zbytek byl chromatografován na sloupci silikagelu za eluování gradientem 1 až 100 % ethylacetátu v hexanu, čímž bylo získáno devět frakcí F1-F9. Frakce F3 byla frakcionována na sloupci silikagelu eluovaném hexanem-ethylacetátem. Za vzniku tří frakcí F3.1 - F3.3. Sloučenina 2 (125,6 mg) a 4 (46,3 mg) byla izolována z F3.1 použitím kolony C₁₈ s obrácenými fázemi eluované směsí aceton-voda. Frakce F3.2 se nechala projít kolonou C₁₈ (aceton-voda) a získala se sloučenina 3 (31,5 mg). Sloučenina 1 (40,4 mg) byla purifikována z F3.3 za použití sloupce C₁₈ s reverzní fází (aceton-voda) a sloupce silikagelu (hexanethylacetát) [39].

Sloučeniny 1-4 byly hodnoceny na jejich cytotoxický účinek proti buňkám LU-1, KB a SK-Mel-2. Homoizopogon A (1) byl nejsilnější, následovaný homoizopogonem B (2) a homoisopogonem C (3). Je zajímavé, že sloučenina 1 vykazovala silný cytotoxický účinek na všechny testované buněčné linie s hodnotami IC₅₀ 0,51-0,66 μM. Účinnost je srovnatelná s aktivitou pozitivní kontroly na ellipticin. Sloučenina 1 byla pravděpodobně zodpovědná za pozorovaný cytotoxický účinek extraktu MeOH, protože jiné izolované složky vykazovaly slabý nebo nulový účinek. Cytotoxický účinek homoisoflavonoidů byl indikován i jinde a byl zkoumán vztah mezi strukturou a aktivitou. Zdá se tedy, že 2'-hydroxy a 4'-methoxy skupiny mají vliv na aktivitu. Ve studii sloučeniny 1, 2 a 3, které mají 2'-hydroxy a 4'-methoxy substituent, vykazovaly pozitivní účinek na alespoň jednu rakovinovou buněčnou linii. Sloučenina 4 s methylenedioxy skupinou na C-3'-C-4' a chybějící hydroxylová skupina na C-2' byla neúčinná proti všem testovaným buňkám [39].

Výsledky ukázaly, že homoisoflavonoidy z *O. japonicus* mohou být potenciálním materiálem pro vývoj antikancerogenních látek [39].

9. DISKUSE A ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zpracování nalezených článků obsahujících studie, izolaci a analýzu nově objevených nebo již známých, ale přesto méně často se vyskytujících isoflavonoidů v rostlinách. Isoflavonoidy představují skupinu nízkomolekulárních sekundárních metabolitů produkovaných především rostlinami z čeledi Fabaceae. Díky široké paletě svých biologických účinků vyvolaly isoflavonoidy v posledních deseti letech mimořádný zájem bioanalytiků, farmakologů a inženýrů. Isoflavonoidy mají také své opodstatnění jako fytoalexiny, fytoanticipiny, insekticidy a chemoatraktanty při navozování rhizobiální symbiózy. Isoflavonoidy zasluhují také pozornost pro svou fytoestrogenní aktivitu a jako zdraví prospěšná složka lidské stravy s antioxidantním, antidabetickým, antivirovým, kardioprotektivním a antikancerogenním účinkem. V článku jsem vyhledal a zpracoval 31 rostlin (*Crotalaria bracteata*, *Neorautanenienia mitis*, *Ononis spinosa*, *Erythrina excelsa*, *Erythrina senegalensis*, *Cicer arietinum*, *Indigofera heterantha*, *Caragana changduensis*, *Andira humilis*, *Astragalus membranaceus*, *Derris ferruginea*, *Tephrosia pumila*, *Campylotropis hirtella*, *Amphimas pterocarpoides*, *Millettia oblata*, *Spirotropis longifolia*, *Oxytropis falcata*, *Acca sellowiana*, *Psidium littorale*, *Psidium guajava*, *Polygala molluginifolia*, *Cudrania tricuspidata*, *Maclura pomifera*, *Antidesma laciniatum*, *Achyranthes bidentata*, *Nicotiana tabacum*, *Azorella madreporica*, *Iris kashmiriana*, *Iris germanica*, *Gynandris sisyrichium* a *Ophiopogon japonicus*). V diskusi se mimo jiné budu zabývat porovnáním článků provedených studií a jejich výsledky u *Ononis spinosa*, *Astragalus membranaceus* a *Iris germanica* a porovnáním s Comprehensive databází (CD), která obsahuje farmakologické využití, dávkování, interakce a kontraindikace [40].

V CD lze nalézt, že *Ononis spinosa* je užívána perorálně pro léčbu dny, ledvin a kamenů močového měchýře, při revmatických potížích, infekci močových cest, terapii zánětlivých onemocnění dolních močových cest a prevenci a léčbu ledvinových kamenů. V těhotenství a laktaci nejsou dostatečně známé informace a klinické studie o bezpečnosti jeho používání. Z *Ononis spinosa* se využívá kořen. Obsahuje kromě isoflavonoidů i ononinové triterpeny, alfaokeradendiol a silice. Silice obsahuje anetol, karvon a menthol. *Ononis spinosa* má hlavně prokazatelný diuretický účinek. Proto není vhodné ji kombinovat s léky i jinými doplňky stravy mající diuretickou účinnost a není vhodné ji užívat i při chorobách ledvin a srdce. Ve studii Gampeho a spol. v kapitole 8.1.3 na str. 18 potvrdili diuretický účinek, vliv na funkci ledvin a močových cest, ale účinné obsahové látky odpovědné za diuretický účinek jsou doposud neznámé. Analyzoval se extrakt z kořene, kde bylo potvrzeno několik derivátů, ale většinou se spoléhalo na retenční časy a UV data. Analýza proběhla pomocí HPLC s ionizací elektrospřejem, MS a NMR spektroskopii. Byly izolovány sloučeniny formononetin, ononin, tektoridin, trifolirhizin, pseudobaptigenin, genistein, biochamin A, maackiain, medikarpin a spinonin. Zajímavé je, že ve studii Gampeho a spol. byly izolovány další isoflavonoidy, fytosteroly, které vykazují podobnosti s estradiolem, včetně antioxidantních účinků a mohou hrát důležitou roli v prevenci a léčbě nádorů, osteoporózy,

kardiovaskulárních onemocnění, metabolického syndromu a polycystických vaječníků. Avšak je zajímavé, že při tradičním užívání nebyl prozatím pozorován z žádných testovaných účinků. Studie tedy prozkoumala více možností použití a účinků, než bylo doposud známo, ale jak bylo zmíněno, vlatní mechanismus účinku nebyl osvětlen. Účinky popsané v databázi se se studií a použitím v lidovém léčitelství shodují.

Podle CD *Astragalus membranaceus* se používá při běžném nachlazení, infekcích horních cest dýchacích, při alergické rýmě, při prasečí chřipce, při posilování a regulaci imunitního systému a hepatitidě typu B, rakovině plic, fibromyalgii, anémii a HIV/AIDS. Dále také na anginu pectoris, astma, beta-thalassemiu, chronickou nefritidu a nefritický syndrom, diabetes, symptomy menopauzy, tedy jako chemoterapeutikum, antibiotikum, antivirotikum, tonikum, hepatoprotektivum, antiinfektivum, antioxidant, diuretikum, vazodilatans a hypotenzivum. *Astragalus membranaceus* se užívá perorálně dlouhodobě podle dávky dva až tři měsíce. Intravenózně pod kontrolou lékaře řádově měsíc. Pro nedostatek informací a klinických studií se nedoporučuje užívat během těhotenství a kojení. Používanou částí *Astragalus membranaceus* je kořen. *Astragalus* obsahuje celou řadu aktivních složek včetně více než 40 saponinů, jako je astragalosid, několik flavonoidů včetně isoflavonů, pterokarpanů a isoflavanů, polysacharidů, stopových minerálů, aminokyselin a kumarinů. *Astragalus* má antioxidační účinky. Inhibuje produkci volných radikálů, zvyšuje superoxid dismutasu a snižuje lipidovou peroxidaci. *Astragalus* zlepšuje imunitní odpověď. *In vitro* se zdá, že polysacharidové složky váží a aktivují B lymfocyty a makrofágy, ale ne T lymfocyty. *Astragalus* potencuje účinky interferonu, zvyšuje hladiny protilátek IgA a IgG v nosní sliznici a zvyšuje hladiny interleukinu 2. Zlepšuje odezvu mononukleárních buněk a stimuluje produkci lymfocytů. *Astragalus* potencuje *in vitro* aktivitu LAK buněk při použití v kombinaci s IL-2. Navíc existují důkazy, že extrakty mohou obnovit nebo zlepšit imunitní funkci v případech imunodeficience. U zvířecích modelů může extrakt zvrátit cyklofosfamidem indukovanou imunitní nedostatečnost. Nižší dávky *Astragalus* stimulují imunitní systém, ale dávky vyšší než 28 gramů mohou potlačit imunitu, tedy působit opačně. Při intravenózním podání některé důkazy přepokládají, že extrakt může zvýšit proliferaci a diferenciaci kmenových buněk kostní dřeně a progenitorových buněk. *Astragalus membranaceus* má širokospektrální antibiotickou aktivitu *in vitro* pokusech. Zjišťuje se i možnost účinnosti na zvýšení plodnosti. *In vitro* pokusech zvyšuje motilitu spermií. U osob s chronickou hepatitidou zlepšuje funkci jater, jak dokazuje zlepšení hladin glutamát-pyruvát transaminasy v séru. *Astragalus* způsobuje vazodilataci a zvyšuje srdeční výkon, což může být prospěšné při angině pectoris, městnání krve při srdečním selhání a po infarktu myokardu. U zvířecích modelů *Astragalus membranaceus* zlepšil funkci myokardu a ledvin, pravděpodobně kvůli diuretickým a natriuretickým účinkům. Farmakokinetickou studií *in vitro* pokusech u zdravých dobrovolníků naznačuje, že flavonoidy v *Astragalus membranaceus* mohou být absorbovány gastrointestinálním traktem. Hlavní metabolity flavonoidních složek jsou

glukuronidy. Vysoké dávky mohou působit imunosupresivně. Některé druhy *Astragalus* obsahují neurotoxický alkaloid swainsonin a jsou spojeny s otravami zvířat. Cyklofosfamid, imunosupresiva a lithium interagují s *Astragalus*, proto se musí dávat pozor při jeho užívání. Studii Ma a spol. v kapitole 8.1.9 na str. 30 byl zkoumán kardioprotektivní účinek extraktu *Astragalus membranaceus*. Nalezené sloučeniny odpovědné za vliv na srdeční svalovinu jsou astragalosid IV, astragalosid I, astragalosid II a astragalosid III, kalykosin-7-*O*- β -D-glucosid, ononin, (6 α R,11 α R)-9,10-dimethoxypterokarpan-3-*O*- β -D-glucosid, (3R)-2'-hydroxy-3,4'-dimethoxyisoflavan-7-*O*- β -D-glucosid, kalykosin a formononetin. Studie Ma a spol. pomocí HPLC analýzy potvrdila moji hypotézu kardioprotektivního účinku. Kalykosin byl nalezen také např. v rostlinách *Caragana changduensis* na str. 25 a v *Ononis spinosa* na str. 18.

V CD je popsáno, že *Iris germanica* se používá perorálně a před použitím se musí pečlivě oloupat a osušit. *Iris germanica* zvyšuje činnost ledvin, působí na kožní onemocnění, bronchitidu, nachlazení, rakovinu, ischias, sklerózu, splenitidu a dále jako stomachikum, amarum a cholagogum. Používá se také jako diuretikum, emetikum, projímadlo a sedativum. Kořen se používá i na bolesti hlavy, bolesti zubů, bolesti svalů a kloubů, migrénu, zácpu, nadýmání, cukrovku, zánět močových cest a kožních onemocnění. Lokálně se používá kořen na halitózu, nosní polypy, klouby, nádory, dnu, kyfózu, revmatické potíže a popáleniny. Kořen obsahuje triterpeny, včetně irigermanalu a isoflavonoidů, včetně irilonu, irisolonu, irigeninu a tektoridinu. Obsahuje také C-glukosylxantony a silice. Hlavní složkou silice je železo. Kořen se obecně používá v kombinaci s jinými bylinami a nachází se v homeopatických a čajových přípravcích. Ve studii Ibrahimy a spol. v kapitole 8.2.2 na str. 62 byly izolovány isoflavonoidy 8-hydroxyirilon-5-methyl-ether a 8-hydroxyirilon, spolu s osmi již známými isoflavonoidy: 4-methylether, irilon, irisolidon, irigenin S, irigenin, irilon 4'-*O*- β -D-glukopyranosid a iridin. Byly popsány pesticidní, antikancerogenní, myorelaxační, sedativní, hypotenzní, antiflogistické, diuretické a hlavně účinky, kterými se studie Ibrahimy a spol. zabývala jsou antioxidační a antidiabetické (vlivem inhibice α -amylasy). Sloučeniny 8-hydroxyirilon-5-methyl-ether, 8-hydroxyirilon a irilon vykazovaly nejvyšší antioxidační účinky a 8-hydroxyirilon-5-methyl-ether a irisolidon vykazovaly nejvyšší inhibiční aktivitu α -amylasy. Tato studie potvrdila účinnost a některá použití, které jsou popsány v databázi.

Závěrem lze k tomuto porovnání říci, že u rostlin *Ononis spinosa* a *Iris germanica* byly víceméně výsledky studií shodné s databází. Jiné je to u *Astragalus membranaceus*, kde je účinek potvrzen, ale jeho mechanismus není doposud objasněn.

Dále byl nalezen bilitreson, toxický isoflavonoid rostliny merlíku. Rod *Disphania* patří do čeledi *Amaranthaceae*. Tato toxická látka se nachází v některých druzích merlíku např. *Disphania*

glomulifera (Nees) Paul G. Wilson, který roste především v Austrálii, tzn. že některé isoflavonoidy jsou potenciálně nebezpečné např. pro dobytek, ale i pro člověka [41].

V Bakalářské práci z roku 2015, je také zmíněna rostlina z rodu *Astragalus*, ale jedná se o jiný druh - *Astragalus mongholicus*, a to dokonce ve dvou studiích. Má shodné některé obsahové látky, ale je zajímavé, že byly testovány na jiné biologické účinky a byla potvrzena jejich účinnost při prevenci nebo léčení neurodegenerativních onemocnění způsobených oxidačním stresem. Je vidět, že je velmi důležité, zda je pro testování biologických účinků použita jedna izolovaná látka nebo celý komplex látek. Antikancerogenní účinek byl prokázán u obou zmíněných druhů [42].

Jak už bylo zmíněno v mé práci několikrát, jsou účinky isoflavonoidů zkoumány stále intenzivněji, např. byly nalezeny chelatační účinky některých isoflavonů a významný je zejména jejich účinek antiagregační [43, 44].

Výsledky epidemiologických studií zkoumajících roli isoflavonoidů v lidském zdraví nejsou jednoznačné. Některé studie podporují představu o ochranném účinku jejich konzumace při imunomodulaci, snížení rizika některých rakovin, kardiovaskulárních a kožních onemocnění, osteoporózy a obezity, stejně jako zmírnění symptomů menopauzy.

Zájem o možné zdravotní přínosy isoflavonoidů se zvýšil kvůli různým bioprotektivním účinkům, včetně antioxidačních, antimutagenních, antikancerogenních, antiproliferativních účinků, většinou posuzovaných v *in vitro* pokusech. Isoflavonoidy jsou klasicky definovány jako dietní antioxidanty, tj. sloučeniny, které mohou chránit před oxidačním stresem spojeným se zánětem a rizikem poškození makromolekuly volnými radikály a příbuznými oxidačními látkami na bázi kyslíku a dusíku. Mohou ochránit tělo před hormonálními onemocněními, kam patří prsa, endometrium a prostata. Navzdory širokému spektru zdravotních ochranných schopností, které jim byly připsány, např. imunomodulace, snížení rizika chronických onemocnění včetně kardiovaskulárních onemocnění, cukrovky, rakoviny, osteoporózy a obezity, které se projevují především u pacientů s menopauzálními onemocněními, rostou důkazy z dietních a epidemiologických studií, že úloha isoflavonoidů v lidském zdraví je sporná. Některé studie hovoří ve prospěch ochranného účinku konzumace isoflavonoidů jako doplňků stravy a jako přírodní alternativa estrogenové substituční léčby, jiné studie neprokázaly příznivé účinky [45].

10. BIBLIOGRAFIE

1. Spilková J., Martin J. a Siatka T.: *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016, 343, 119—121. ISBN 978-80-246-3264-3
2. Mehriardestani, M., Aliahmadi, A., Toliat, T., Rahimi, R.: Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-Trichomonas vaginalis- activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88, 885–893. ISSN 0753-3322
3. Selvam, C., Jordan, B. C., Prakash, S., Mutisya, D., Thilagavathi, R.: Pterocarpan scaffold: A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 128, 219–236. ISSN 0223-5234
4. Raghuvanshi, A., Kumar, A., Tyagi, A. M., Kureel, J., Awasthi, P., Purohit, D., Goel, A.: 3-Piperidylethoxypterocarpan: A potential bone anabolic agent that improves bone quality and restores trabecular micro-architecture in ovariectomized osteopenic rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 448, 41–54. ISSN 0303-7207
5. TRUVEN HEALTH ANALYTICS LLC.: Ipriflavone. *Micromedex Solution* [online] 2017. [cit. 2017-07-12]. Dostupné z: http://www.micromedexsolutions.com.ezproxy.is.cuni.cz/micromedex2/librarian/CS/4D1794/ND_PR/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/ABCACD/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_AppProduct/evidencexpert/ND_T/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.IntermediateToDocumentLink?docId=7310-z&contentSetId=30&title=Ipriflavone&servicesTitle=Ipriflavone
6. Lutter, S., Schmalbach, K., Esch, H. L., & Lehmann, L.: The isoflavone irilone contributes to the estrogenic potential of dietary supplements containing red clover. *Archives of Toxicology*, 2014, 88(2), 309–321. ISSN 0340-5761, 1432-0738
7. Ponti, G., Rodriguez-Gomez, A., Farinetti, A., Marraudino, M., Filice, F., Foglio, B., Gotti, S.: Early postnatal genistein administration permanently affects nitrenergic and vasopressinergic systems in a sex-specific way. *Neuroscience*, 2017, 346, 203–215. ISSN 0306-4522
8. Yazdani, Y., Sharifi Rad, M. R., Taghipour, M., Chenari, N., Ghaderi, A., Razmkhah, M.: Genistein Suppression of Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Mesenchymal Stem Cell Like Cells Isolated from High and Low Grade Gliomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 2016, 17(12), 5303–5307. ISSN 2476-762X

9. Piegholdt, S., Rimbach, G., Wagner, A. E.. Effects of the isoflavone prunetin on gut health and stress response in male *Drosophila melanogaster*. *Redox Biology*, 2016, 8, 119–126. ISSN 2213-2317
10. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2011, 278, 15–26. ISBN 978-80-246-2015-2
11. Sudanich, S., Tiyaworanant, S., Yenjai, C.: Cytotoxicity of flavonoids and isoflavonoids from *Crotalaria bracteata*. *Natural Product Research*, 2017, 1(1), 1–6. ISSN 1478-6419
12. Lasisi, A. A., Adesomoju, A.: Neoraudiol, a new isoflavonoid and other antimicrobial constituents from the tuberous root of *Neorautanenia mitis* (A. Rich) Verdcourt. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, 19(4), 404–409. ISSN 1319-6103
13. Gampe, N., Darcsi, A., Lohner, S., Béni, S., Kursinszki, L.: Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 123, 74–81. ISSN 0731-7085
14. Kuete, V., Sandjo, L. P., Kwamou, G. M. N., Wiench, B., Nkengfack, A. E., Efferth, T.: Activity of three cytotoxic isoflavonoids from *Erythrina excelsa* and *Erythrina senegalensis* (neobavaisoflavone, sigmoidin H and isoneorautenol) toward multi-factorial drug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 2014, 21(5), 682–688. ISSN 0944-7113
15. Megias, C., Cortés-Giraldo, I., Alaiz, M., Vioque, J., Girón-Calle, J.: Isoflavones in chickpea (*Cicer arietinum*) protein concentrates. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21, 186–192. ISSN 1756-4646
16. Rahman, T. U., Uddin, G., Nisa, R. U., Ludwig, R., Liaqat, W., Mahmood, T., Ayub, K. Spectroscopic and density functional theory studies of 7-hydroxy-3'-methoxyisoflavone: A new isoflavone from the seeds of *Indigofera heterantha* (Wall). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 148, 375–381. ISSN 1386-1425
17. Sun, X., He, C., Yang, X., Guo, L., Li, X.: Isoflavones and pterocarpanes from *Caragana changduensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 61, 516–519. ISSN 0305-1978
18. Garcez, W. S., Garcez, F. R., Tieppo, C., Freitas, O. N. de, Hamerski, L. Isoflavones and flavonols from *Andira humilis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(6), 1242–1245. ISSN 0305-1978

19. Ma, X., Zhang, K., Li, H., Han, S., Ma, Z., Tu, P.: Extracts from *Astragalus membranaceus* limit myocardial cell death and improve cardiac function in a rat model of myocardial ischemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 149(3), 720–728. ISSN 0378-8741
20. Morel, S., Helesbeux, J.-J., Séraphin, D., Derbré, S., Gatto, J., Aumond, M.-C., Richomme, P.: Anti-AGEs and antiparasitic activity of an original prenylated isoflavonoid and flavanones isolated from *Derris ferruginea*. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(3), 498–503. ISSN 1874-3900
21. Ganapaty, S., Pannakal, S. T., Srilakshmi, G. V. K., Lakshmi, P., Waterman, P. G., Brun, R.: Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Letters*, 2008, 1(4), 175–178. ISSN 1874-3900
22. Ma, J., Zhang, J., Shen, Z.: Two unusual isoflavonoids from *Campylotropis hirtella* – A new biosynthesis route of flavonoids. *Tetrahedron Letters*, 2017, 58(15), 1462–1466. ISSN 0040-4039
23. Tchoumtchoua, J., Makropoulou, M., Ateba, S. B., Boulaka, A., Halabalaki, M., Lambrinidis, G., Alexis, M. N.: Estrogenic activity of isoflavonoids from the stem bark of the tropical tree *Amphimas pterocarpoides*, a source of traditional medicines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 158, 138–148. ISSN 0960-0760
24. Derese, S., Barasa, L., Akala, H. M., Yusuf, A. O., Kamau, E., Heydenreich, M., Yenesew, A.: 4'-Prenyloxyderrone from the stem bark of *Millettia oblata* ssp. *teitensis* and the antiplasmodial activities of isoflavones from some *Millettia* species. *Phytochemistry Letters*, 2014, 8, 69–72. ISSN 1874-3900
25. Basset, C., Rodrigues, A. M. S., Eparvier, V., Silva, M. R. R., Lopes, N. P., Sabatier, D., Stien, D.: Secondary metabolites from *Spirotropis longifolia* (DC) Baill and their antifungal activity against human pathogenic fungi. *Phytochemistry*, 2012, 74, 166–172. ISSN 0031-9422
26. WANG, D., TANG, W., YANG, G.-M., CAI, B.-C.: Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2010, 8(6), 461–465. ISSN 1875-5364
27. YANG, G.-M., YAN, R., WANG, Z.-X., ZHANG, F.-F., PAN, Y., CAI, B.-C.: Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2013, 11(5), 519–524. ISSN 1875-5364
28. Lapčík, O., Klejdus, B., Kokoška, L., Davidová, M., Afandi, K., Kubáň, V., Hampl, R.: Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, 33(10), 983–992. ISSN 0305-1978

29. Nucci-Martins, C., Nascimento, L. F., Venzke, D., Brethanha, L. C., Sako, A. V. F., Oliveira, A. S., Santos, A. R. S.: Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. *Phytomedicine*, 2016, 23(5), 429–440. ISSN 0944-7113
30. Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Do, S.-G., Hwang, B. Y., Lee, M. K.: Comparison of pancreatic lipase inhibitory isoflavonoids from unripe and ripe fruits of *Cudrania tricuspidata*. *PLoS One*, 2017, 12(3), e0172069. ISSN 1932-6203
31. Ribaudó, G., Pagano, M. A., Pavan, V., Redaelli, M., Zorzan, M., Pezzani, R., Zagotto, G.: Semi-synthetic derivatives of natural isoflavones from *Maclura pomifera* as a novel class of PDE-5A inhibitors. *Fitoterapia*, 2015, 105, 132–138. ISSN 0367-326X
32. Djouossi, M. G., Mabou, F. D., Foning Tebou, P. L., Ngnokam, D., Tapondjou, L. A., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L.: Chevalierinoside B and C: Two new isoflavonoid glycosides from the stem bark of *Antidesma laciniatum* Muell. Arg (syn. *Antidesma chevalieri* Beille). *Phytochemistry Letters*, 2014, 9, 149–152. ISSN 1874-3900
33. Tan, Y., An, N., Li, Y., Cheng, S., Zhang, J., Zhang, X., Li, Y.: Two new isoflavonoid glucosides from the roots of *Achyranthes bidentata* and their activities against nitric oxide production. *Phytochemistry Letters*, 2016, 17, 187–189. ISSN 1874-3900
34. Li, L., Shen, Q.-P., Liu, C.-B., Wang, Y., Yao, J.-J., Zhang, T., Yang, G.-Y.: Isoflavones from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities. *Phytochemistry Letters*, 2015, 13, 156–159. ISSN 1874-3900
35. Bórquez, J., Kennelly, E. J., Simirgiotis, M. J.: Activity guided isolation of isoflavones and hyphenated HPLC-PDA-ESI-ToF-MS metabolome profiling of *Azorella madreporica* Clos. from northern Chile. *Food Research International*, 2013, 52(1), 288–297. ISSN 0963-9969
36. Alam, A., Jaiswal, V., Akhtar, S., Jayashree, B. S., Dhar, K. L.: Isolation of isoflavones from *Iris kashmiriana* Baker as potential anti proliferative agents targeting NF-kappaB. *Phytochemistry*, 2017, 136, 70–80. ISSN 0031-9422
37. Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Zayed, M. F., Ross, S. A.: 8-Hydroxyirilone 5-methyl ether and 8-hydroxyirilone, new antioxidant and α -amylase inhibitors isoflavonoids from *Iris germanica* rhizomes. *Bioorganic Chemistry*, 2017, 70, 192–198. ISSN 0045-2068

38. Al-Qudah, M. A., Saleh, A. M., Al-Jaber, H. I., Tashtoush, H. I., Lahham, J. N., Abu Zarga, M. H., Abu Orabi, S. T.: New isoflavones from *Gynandris sisyrinchium* and their antioxidant and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 2015, 107, 15–21. ISSN 0367-326X
39. Dang, N. H., Chung, N. D., Tuan, H. M., Hiep, N. T., Dat, N. T.: Cytotoxic Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* Tubers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2017, 65(2), 204–207. ISSN 0386-3691
40. Natural Medicines Comprehensive Database: *Unbiased, Scientific Clinical Information on Complementary, Alternative, and Integrative Therapies* [online] 2017. [cit. 2017-07-12]. Dostupné z: <http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/>
41. Patman, G.: Biliary tract: Newly identified biliatresone causes biliary atresia. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 2015, 12(7). ISSN 1759-5053
42. Raabová, Karin: *Rostliny jako zdroje isoflavonoidů*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.
43. Karlíčková, J., Macáková, K., Říha, M., Pinheiro, L. M. T., Filipický, T., Horňasová, V., Mladěnka, P.: Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015, 437381. ISSN 1942-0994
44. Karlíčková, J., Říha, M., Filipický, T., Macáková, K., Hrdina, R., Mladěnka, P.: Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway. *Planta Medica*, 2016, 82(1–2), 76–83. ISSN 1439-0221
45. Míadoková, E.: Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology*, 2009, 2(4), 211–218. ISSN 1337-6853