

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

Rigorózní práce

2012

Mgr. Petra Mikšátková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

Rigorózní práce

**Antiradikálová aktivita extraktů nati
a plodů *Fagopyrum esculentum* Moench.**

Vypracovala: Mgr. Petra Mikšátková

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

2012

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

28.3.2012

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení a pomoc při řešení této rigorózní práce. Dále děkuji PharmDr. Janu Martinovi, Ph.D. za provedení HPLC analýz.

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AP-1	aktivační protein 1
BchE	butyrylcholinesterasa
COX-2	cyklooxygenasa 2
ČL 2009	Český lékopis 2009
DAD	diode-array detektor, detektor s diodovým polem
DPPH	2,2,difenyl-1-pikrylhydrazyl
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GSH	redukovaný glutathion
HDL	lipidy vysoké hustoty (high density lipoproteins)
HepG2	buňky hepatomu
HL-60	buňky lidské promyelocytární leukemie
HMG-CoA reductasa	β -hydroxy- β -methylglutaryl-koenzym A reductasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
<i>i.p.</i>	intraperitoneální podání
<i>i.v.</i>	intravenózní podání
IC ₅₀	koncentrace, která způsobí 50% redukci radikálu DPPH
IgE	imunoglobulin E
IGF1-R	receptor pro inzulínu podobný růstový faktor 1
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin 6
IRS-1	substráty inzulínového receptoru (Insulin receptor substrate protein)
LDL	lipidy nízké hustoty (low density lipoproteins)
LTB	leukotrien B
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NF- κ B	nukleární faktor κ B

NOS	reaktivní formy dusíku
NSAID	nesteroidní antiflogistika
<i>p.o.</i>	perorální podání
PEG	polyethylenglykol
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PVC	polyvinylchlorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SP-1	stimulační protein 1
TAG	triacylglyceroly
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TGF-β1	transformující růstový faktor β1
TMT	trimethyltin
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	lipidy velmi nízké hustoty (very low density lipoproteins)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	3
3	Teoretická část	4
3.1	Rod <i>Fagopyrum</i>	4
3.2	Využití pohanky ve výživě.....	6
3.2.1	Nať	6
3.2.2	Plody	6
3.2.3	Další produkty z pohanky	9
3.3	Rutin.....	10
3.3.1	Metabolismus rutinu	11
3.3.2	Terapeutické využití rutinu	14
3.3.2.1	Léčiva s obsahem rutinu	14
3.3.2.2	Potravinové doplňky s obsahem rutinu	16
3.3.3	Účinky rutinu, které jsou předmětem výzkumu.....	17
3.3.3.1	Protizánětlivé účinky	17
3.3.3.2	Antikancerogenní účinky.....	19
3.3.3.3	Diabetes mellitus	22
3.3.3.4	Ovlivnění lipidů.....	25
3.3.3.5	Ovlivnění erytrocytů.....	27
3.3.3.6	Kardioprotektivní účinky.....	28
3.3.3.7	Ovlivnění centrálního nervového systému	29
3.3.3.8	Ovlivnění bolesti	30
3.3.3.9	Ovlivnění oka	31
3.3.3.10	Ovlivnění svalstva	31
3.3.3.11	Ischemie/reperfuze	32
3.3.3.12	Antibakteriální účinky	34
3.3.3.13	Antifungální účinky.....	35

3.3.3.14	Antivirové účinky	35
3.3.3.15	Antiprotozoární účinky.....	35
3.3.3.16	Ovlivnění trávicího ústrojí.....	35
3.3.3.17	Ovlivnění hyperurikémie a dny	37
3.3.3.18	Ovlivnění močového ústrojí	37
3.3.3.19	Příjem ethanolu.....	39
3.3.3.20	Vliv na metabolismus jiných látek	40
4	Experimentální část.....	41
4.1	Použitý materiál, chemikálie a přístrojové vybavení	41
4.1.1	Vzorky	41
4.1.2	Použité chemikálie	41
4.1.3	Přístrojové vybavení	41
4.2	Příprava vzorků	43
4.3	Stanovení antioxidační aktivity.....	43
4.4	HPLC stanovení obsahu rutinu dle ČL 2009	45
4.5	Výsledky	46
4.5.1	Tabulky	46
4.5.1.1	Stanovení antioxidační aktivity	46
4.5.1.2	HPLC stanovení obsahu rutinu.....	54
4.5.2	Grafy	55
4.5.2.1	Stanovení antioxidační aktivity	55
4.5.2.2	HPLC stanovení obsahu rutinu.....	61
5	Výsledky a diskuze	62
6	Závěr	65
7	Literatura.....	66
8	Abstrakt.....	74
9	Abstract.....	75

1 Úvod

V potravinářství i v medicíně nachází významné uplatnění někteří zástupci rodu *Fagopyrum* z čeledi *Polygonaceae*, a to především *Fagopyrum esculentum* Moench (pohanka obecná) a *Fagopyrum tataricum* Gaerth (pohanka tatarská). Tyto rostliny obsahují řadu látek, které předurčují jejich výhodné použití v potravinářství. Jde především o flavonoidy, z nichž jsou nejvíce zastoupeny rutin, kvercetin, vitexin, isovitexin, orientin a isoorientin a další polyfenolické látky, jako například anthokyany a katechiny. V pohance byly dále detekovány například skvalen, fagopyritoly, kyselina γ -aminomáselná, 2''-hydroxynikotinamin a nikotinamin. Nutriční hodnota pohanky vyplývá z příznivého obsahu proteinů, vlákniny, lipidů, minerálů a vitamínů (např. C, E a řady B). Nevýhodou ale může být obsah fototoxického fagopyrinu nebo některých proteinů, které vyvolávají alergickou reakci. [1-4]

Plody pohanky, trojboké nažky, jsou chemicky i strukturně podobné běžným obilninám a proto je pohanka často přiřazována právě k obilninám. Označuje se někdy jako pseudocereálie. [5]. Před použitím jako potravina se nažky mohou zbavovat slupek a tepelně upravovat. [6] Pohanková mouka, samotná nebo ve směsi např. s pšeničnou moukou, se používá tradičně v Japonsku, Koreji a severovýchodní Číně na přípravu těstovin. [7] U nás jsou pohankové nažky k dostání neloupané i loupané, celé nebo upravené jako mouka, kroupy a další formy. Bývají součástí nejrůznějších kaší, pečiva či směsí na pečení a vaření. Svě využití má i pohanková nať, která se používá jako listová zelenina, suší a mele se na mouku nebo se z ní připravuje čaj. [2, 8]

Z flavonoidů obsažených v pohance je nejvíce rutinu a pohanka je považována za hlavní potravní zdroj této důležité látky. [9] Rutin vykazuje řadu účinků na živý organismus a pro terapeutické účely je nejvýznamnější jeho pozitivní vliv na fragilitu a permeabilitu kapilár. Používá se proto především pro posílení cévní stěny a současně pro potlačení zánětu. Je součástí některých registrovaných léčiv i celé řady potravinových doplňků.

Rutin je stále předmětem celé řady experimentů, které si dávají za cíl ověřit jeho další pozitivní účinky, které by mohly nalézt uplatnění v terapii.

Byly tak prokázány protizánětlivé účinky rutinu, [10] velká pozornost je věnována jeho vlivu na rakovinné buňky, kdy byla pozorována inhibice proliferace buněk i

cytotoxicita. [11, 12] Další oblastí zájmu je ovlivnění některých onemocnění souvisejících s metabolismem. Pozitivně působí při diabetu mellitu, ovlivňuje také hladiny lipidů v těle. [13] Brání peroxidaci lipidů, která je častým projevem oxidačního stresu a představuje ohrožení pro celou řadu buněk. Na úrovni centrální nervové soustavy vykazuje rutin protektivní efekt při poškození některých neuronů, [14] pozitivně působí při Alzheimerově chorobě [15] nebo depresi. [16, 17]

V některých studiích vykazuje rutin účinky antibakteriální, antifungální nebo antivirové. [18-20]

S antioxidačními účinky souvisí také protektivní efekt rutinu při poškození tkání po reperfuzi, která následuje po ischemii, kdy se do těla uvolňuje velké množství volných radikálů. [21]

Z výsledků plyne, že rutin může působit na celou řadu zdravotních komplikací. Většina jeho účinků vychází z antioxidační aktivity této látky. Volné radikály se významně podílí na rozvoji některých patologických stavů a proto se schopnosti jejich zhášení může využít v prevenci i léčbě některých onemocnění. Jedná se o vysoce reaktivní látky, které se do organismu dostávají zvenčí nebo vznikají přímo v těle v průběhu metabolismu. Mohou pak reagovat prakticky s jakoukoli molekulou. Dochází tak k oxidačnímu poškození nukleových kyselin, fosfolipidů buněčných membrán nebo třeba bílkovin.

Oxidačnímu poškození lze zabránit jednak kontrolou vzniku volných radikálů a dále záchytem a odstraněním (tzv. zhášením) těch, které se už vytvořily. Působí tak některé antioxidační enzymy (glutathionperoxidasa, glutathiontransferasa, katalasa, superoxidodismutasa) nebo proteiny (např. transferin). Antioxidačně působí také některé nízkomolekulární látky, jako třeba vitamíny (A, C), koenzym Q a nebo polyfenolické látky, například flavonoidy. [22]

Rutin, hlavní obsahová látka pohanky, volné radikály zháší a je tedy pravděpodobné, že konzumace potravin, které ho obsahují, může mít příznivé účinky na zdravotní stav člověka.

2 Cíl práce

Cílem rigorózní práce bylo prokázat a zhodnotit antioxidační vlastnosti extraktů nati, plodů a výrobků z plodů pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*) a zpracovat přehled nových poznatků o účincích rutinu.

3 Teoretická část

3.1 Rod *Fagopyrum*

Mezi rostliny, které mají významné místo v medicíně i v potravinářství, patří někteří zástupci rodu *Fagopyrum* z čeledi *Polygonaceae*. Nejčastěji používanými druhy jsou *Fagopyrum esculentum* Moench (pohanka obecná) a *Fagopyrum tataricum* Gaerth (pohanka tatarská). [23] *Fagopyrum esculentum* se pěstuje především v Evropě, USA, Kanadě, Jižní Africe, Austrálii, Japonsku a severních částech Číny, *F. tataricum* je častější v hornatých oblastech. Oproti *F. esculentum* roste i v méně příznivých podmínkách. [24]

Pohanka obecná je jednoletá, až 60 cm vysoká bylina. Lodyha je vzpřímená, málo větvená, později červeně zbarvená. Listy jsou dlouze řapíkaté, srdčité střelovité, na bázi špičatě dvoulaločnaté. Jsou jen o málo delší než širší. Řapík má na bázi krátce trubkovitou pochvu ze dvou palistů. Bílé nebo méně často světle růžové květy s pěti okvětními lístky vyrůstají v úžlabních, dlouze stopkatých vrcholících. Plodem jsou tříhranné nažky, [25] jejichž hrany jsou hladké po celé délce. Jsou strukturně i chemicky podobné plodům běžných obilnin a proto je pohanka často označována jako pseudoobilnina, pseudocereálie. [5]

Pohanka obsahuje řadu významných látek. Důležitou skupinou jsou flavonoidy. Z nich se v této rostlině v největším množství setkáváme s rutinem, kvercetinem, vitexinem, isovitexinem, orientinem a isoorientinem. [1] Tyto látky jsou zodpovědné za hlavní část významných antioxidačních účinků pohanky. Další látky polyfenolického charakteru, obsažené ve velké míře v pohance, jsou anthokyany a některé katechiny. Obsah nutričně hodnotných proteinů a některých vitamínů (např. C, E a řady B) přispívá k vhodnosti využití jako potravin. Dále byl prokázán obsah isoprenoidní látky skvalenu, derivátů *D-chiro*-inositolu fagopyritolů nebo kyseliny γ -aminomáselné (GABA), 2''-hydroxynikotinaminu a nikotinaminu. Především v čerstvých rostlinách byl nalezen fagopyrin, fototoxický derivát hypericinu. Ten může způsobovat fotosenzitivitu u dobytka krměného pohankou, nebo u lidí po dlouhodobé expozici prachu z pohankové mouky. [2, 3, 26, 27]

Pohanka má široké využití, ať už jako potravina, nebo také ve formě nálevů a extraktů při nejrůznějších zdravotních komplikacích. Především díky vysokému obsahu rutinu působí pohanka při redukci fragility kapilár. Dále snižuje vysoký krevní tlak, odstraňuje otoky dolních končetin, chrání před diabetickou retinopatií. [2] Pohanka normalizuje hladiny cholesterolu a triglyceridů. [28]

3.2 Využití pohanky ve výživě

Pohanka je často používaná jako potravina. Je to především díky příznivému obsahu nutričně hodnotných proteinů, vlákniny, lipidů, minerálů a vitamínů. I další látky, jako jsou například flavonoidy nebo steroly, přispívají k vhodnosti tohoto využití. Pohanka je stále považována za hlavní potravní zdroj rutinu. [9]

3.2.1 Nať

Listy a klíčky jsou často používány jako listová zelenina. Po tepelném opracování se mohou využít podobně jako špenát. [2] Další možností je zelený pohankový čaj. Mletá sušená nať se například v Japonsku přidává do některých potravin, třeba zmrzliny, kvůli své výrazné zelené barvě a také pro zvýšení obsahu rutinu. [8]

3.2.2 Plody

Plodem pohanky jsou trojboké nažky. Jejich vlastnosti se mezi jednotlivými druhy liší. Nažky *F. esculentum* jsou sladší, větší a snadněji se loupou než nažky *F. tataricum*. Obsahují však méně rutinu. [9]

Před použitím v potravinářství se plody mohou loupat, případně tepelně upravovat. Ve střední a východní Evropě se nažky zbavují slupek spařením vodní parou. Po pražení jsou tyto kroupy připravené k vaření. [6] Pohankové nažky jsou tradiční součástí stravy v Japonsku. Nejčastěji jsou používány ve formě předvařených drcených nažek, pohankových knedlíků vzniklých zaděláním pohankové mouky s horkou vodou (sobagaki) nebo jako pohankové těstoviny. [3]

Pohankové těstoviny jsou běžné také v Koreji a severovýchodní Číně. Používá se buď samotná mouka z pohanky, nebo se pro zlepšení vlastností těsta mísí s moukou pšeničnou nebo třeba s bramborovým škrobem. V Japonsku jsou tyto těstoviny známé pod názvem Soba. V roce 2000 zde tvořily zhruba 8,5% celkové produkce těstovin. [7]

V Evropě a Severní Americe je pohanka běžně k dostání jak neloupaná tak loupaná, jako kroupy (výrobky z vyčištěných plodů zbavených obalových vrstev broušením a leštěním), vločky (vyčištěné a oloupané nažky upravené mačkáním nebo příčným

řezáním), lámané nažky (lámanka; jde o zlomkové drobné netříděné kroupy. Velikost těchto částic je charakterizována jako % propadu/průměru kruhových ok síta (μm) a je nejméně 98/3000, nejvýše 1/1000). Dále mohou být nažky jemně namleté pro přípravu kaší. Běžně se mísí s řadou dalších obilovin. Používají se potom do těstovin, energetických tyčinek, lívanců, směsí na palačinky a kaše, celozrnných lupínků nebo chleba. [5, 29]

Mezi méně časté produkty z pohankových nažek patří například pohankový ocet nebo pohankové pivo. Ty však, nejspíš díky dlouhému výrobnímu postupu, obsahují jen velmi málo rutinu, případně neobsahují žádný. V Japonsku se používá také instantní čaj z pohankových krup, vyrobených z loupaných nažek. Ten je naopak na rutin poměrně bohatý. [8]

Relativně vysoký je i obsah inhibitorů angiotensin-I konvertujícího enzymu, nikotinaminu a 2''-hydroxynikotinaminu, které jsou nejvíce zastoupeny právě v nažkách. Látky s tímto účinkem pozitivně působí na některé zdravotní komplikace spojené s životním stylem (snižují krevní tlak, brání remodelaci srdce, mají příznivý vliv na mikroalbuminurii a inzulinovou resistenci u diabetiků II. typu), a proto by se pravidelná konzumace produktů z pohankové mouky mohla podílet na zlepšení zdravotního stavu. Nikotinamin a 2''-hydroxynikotinamin jsou však rozpustné ve vodě, a proto se jejich obsah v nejčastěji konzumovaném výrobku (pohankových těstovinách) během vaření snižuje. V čaji je ale tato vlastnost pozitivem. [3]

Pohankové těsto obsahuje mimo jiné řadu anthokyanů, které se podílí na redukcii kyseliny dusičné na oxid dusnatý. Vyšší obsah NO v žaludku může zlepšit jeho aktivitu při trávení potravy, nitrace a nitrosace proanthocyanidinů může přispět k zhašení reaktivních forem dusíku (NOS) produkovaných NO a kyselinou. [30]

Nažky obsahují také fytoosteroly, které mají pozitivní vliv na hladinu cholesterolu v krvi. V loupaných nažkách po extrakci lipidů bylo nalezeno 700 mg/kg β -sitosterolu, 95 mg/kg kampesterolu a stopy stigmasterolu. [27]

Pohankové plody obsahují také řadu minerálů. Detekovány byly například K, Mg, P, Fe, Ca, Cu, Zn, Se, Ba, B, I, Pt, Co. [27]

Velmi výhodnou vlastností pohankových plodů je spektrum jejich bílkovin. Tyto proteiny mají vyvážené složení aminokyselin s vysokým obsahem esenciálních. Většinou jsou zastoupeny globuliny a albuminy. Neobsahují prolaminy (hlavní zásobní

proteiny obilovin), ani lepek (gluten). Proto je pohanková mouka vhodná pro pacienty trpící celiakií, kteří nesnášejí lepek a tedy ani běžné obiloviny. [31, 32]

Další výhodou je nízký glykemický a inzulínový index výrobků z pohankové mouky. Tato vlastnost může být výsledkem tvorby komplexů škrobu a dalších obsahových látek, které vznikají po tepelném opracování mouky a jsou rezistentní vůči amylase. [33] V *in vitro* studii byla porovnána stálost pohankové mouky a mouky, ze které byly extrahovány mastné kyseliny, rutin a proanthocyanidiny, vůči amylase katalyzující trávení škrobu. V extrahované mouce došlo k většímu poklesu obsahu škrobu oproti mouce neupravené. Po přidání vyextrahovaných látek do mouky se mastné kyseliny vázaly na amylosu, zatímco rutin a epikatechin se vázaly na amylosu i amylopektin, a tím tyto látky bránily trávení škrobu. To potvrzuje, že díky odolnosti škrobu a následnému snížení glykemického indexu mohou být výrobky z pohankových nažek vhodnými potravinami pro diabetiky. [34]

Pozitivní je také složení lipidů obsažených v pohankových nažkách. Obsahují přibližně 80% nenasycených a více než 40% polynenasycených mastných kyselin, což dělá z pohanky nejvýhodnější potravinový zdroj těchto látek mezi cereáliemi. [27]

Nevýhodou pohankových potravin může být alergická reakce, která se někdy vyskytuje po požití pohanky nebo po vystavení prachu z mouky (například při používání polštářů plněných slupkami z nažek, obsahujících stopy mouky). Jedná se o hypersensitivitu zprostředkovanou IgE specifickými proti pohankovým proteinům a projevuje se jako astma, alergická rhinitis, urticaria a angioedém. Alergenem je zřejmě 16kDa protein, albumin BWp16, který je rezistentní vůči pepsinu, nebo taktéž o globuliny Fig e1 (22kDa) a Fig e2 (15kDa). [4, 27, 35, 36]

Pro kvalitu chuti a vůně plodů je při pěstování důležitá nízká teplota během kvetení pohanky. Protože teplota výrazně ovlivňuje vlastnosti nažek, je nutné dodržovat nízkou teplotu i během mletí na mouku. Po odstranění slupek se vůně a chuť rychle ztrácí. [7] Mění se také rozložení flavonoidů v nažkách. Protože semena obsahují pouze rutin a isovitexin, zatímco slupky obsahují rutin, orientin, vietxin, kvercetin, isovitexin i isoorientin, navíc ve vyšších koncentracích, dochází jejich odstraněním ke ztrátám velké části těchto látek. Touto úpravou se také snižuje obsah vlákniny, minerálů a vitamínů. [37] Z tohoto důvodu se liší i obsah některých látek v bílé a tmavé mouce. Bílá mouka, obsahující převážně vnitřní část endospermu, je bohatá převážně na škrob. Jeho obsah je

přibližně 75%. Dále jsou přítomny proteiny (6%), lipidy (1%), sacharidy (1%), vláknina (3%), minerály (1%) a ostatní látky, což jsou převážně organické kyseliny, fenolické látky, třísloviny, nukleotidy nebo nukleové kyseliny. V tmavé mouce, která obsahuje menší množství endospermu, je zato výrazně více proteinů (36%), vlákniny (15%) nebo lipidů (11%). Tmavá mouka je také bohatší na fagopyritoly (galaktosylové cyklitoly). [5, 27]

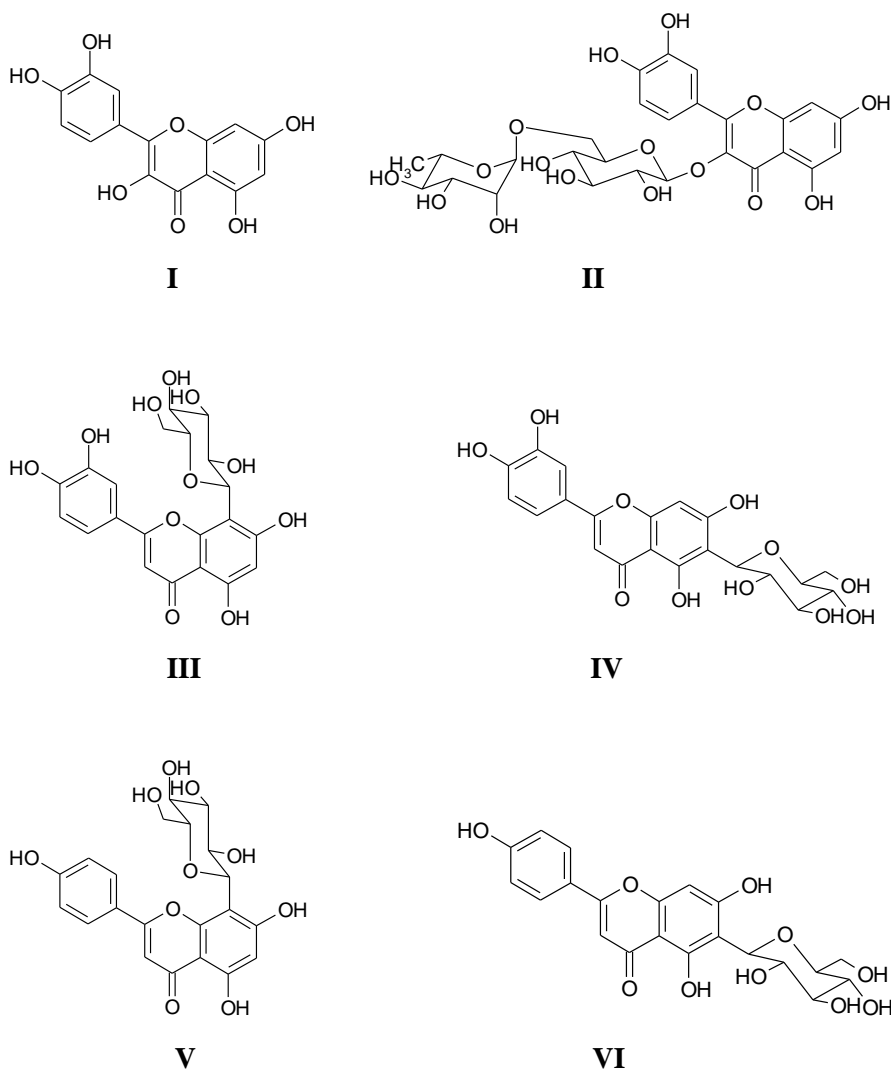
Stejně tak se spektrum obsahových látek mění během případného tepelného zpracování rostliny. Tepelnou úpravou nažek například klesá obsah inositol fosfátu, tokoferolů a tokotrienolů, melatoninu a především flavonoidů. Koncentrace flavonoidů v celých nažkách po tepelném opracování klesá na polovinu původních hodnot. Pražené kroupy jich obsahují třikrát méně než pražené slupky. [6]

3.2.3 Další produkty z pohanky

Dalším používaným pohankovým produktem je květní med. [8] Kvetoucí pohanka je důležitým zdrojem medu v době, kdy jiné kvetoucí rostliny nejsou k dispozici. [27] Med obsahuje řadu fenolických látek (například kyseliny 4-hydroxybenzoovou, 3,4-dihydroxybenzoovou, chlorogenovou, ferulovou a 4-hydroxyskořicovou a flavonoidy pinobanksin, pinocembrin, chrysin, myricetin, kvercetin, kaempferol, galangin), což může být příčina významných antioxidačních účinků. Po konzumaci pohankového medu bylo u lidských dobrovolníků pozorováno zvýšení antioxidační a redukční aktivity plazmy. Použití tohoto medu jako sladidla může proto posílit antiradikálovou obranu organismu.[38-40]

3.3 Rutin

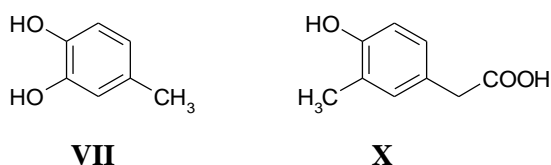
V zástupcích rodu *Fagopyrum* byla detekována řada flavonoidů, polyfenolických derivátů fenylchromanu se základní strukturou založenou na C6-C3-C6 uspořádání. V pohance jsou nejvíce zastoupeny kvercetin (**I**), orientin (**III**), isorientin (**IV**), vitexin (**V**) a isovitexin (**VI**) a v největším množství rutin, kvercetin-3-O- β -rutinosid (**II**) (*Obr. 1*). [1] Vykazuje několik významných účinků, pro které se již používá v terapii. Jiné jsou zatím předmětem výzkumu.



Obr. 1: Flavonoidy nejvíce zastoupené v pohance.

3.3.1 Metabolismus rutinu

Pouze malá část rutinu přijatého potravou je absorbována stěvem. Větší část je metabolizována střevní mikroflórou na řadu látek, které se také vstřebávají. V krvi zvířat, kterým byl orálně podáván rutin byly identifikovány kvercetin a monofenoly (3,4-dihydroxytoluen (**VII**), kyseliny (3,4-dihydroxyfenyl)octová (**VIII**), (3-hydroxyfenyl)octová (**IX**) a homovanilinová (**X**). [41]



Obr. 2: Příklad metabolitů rutinu.

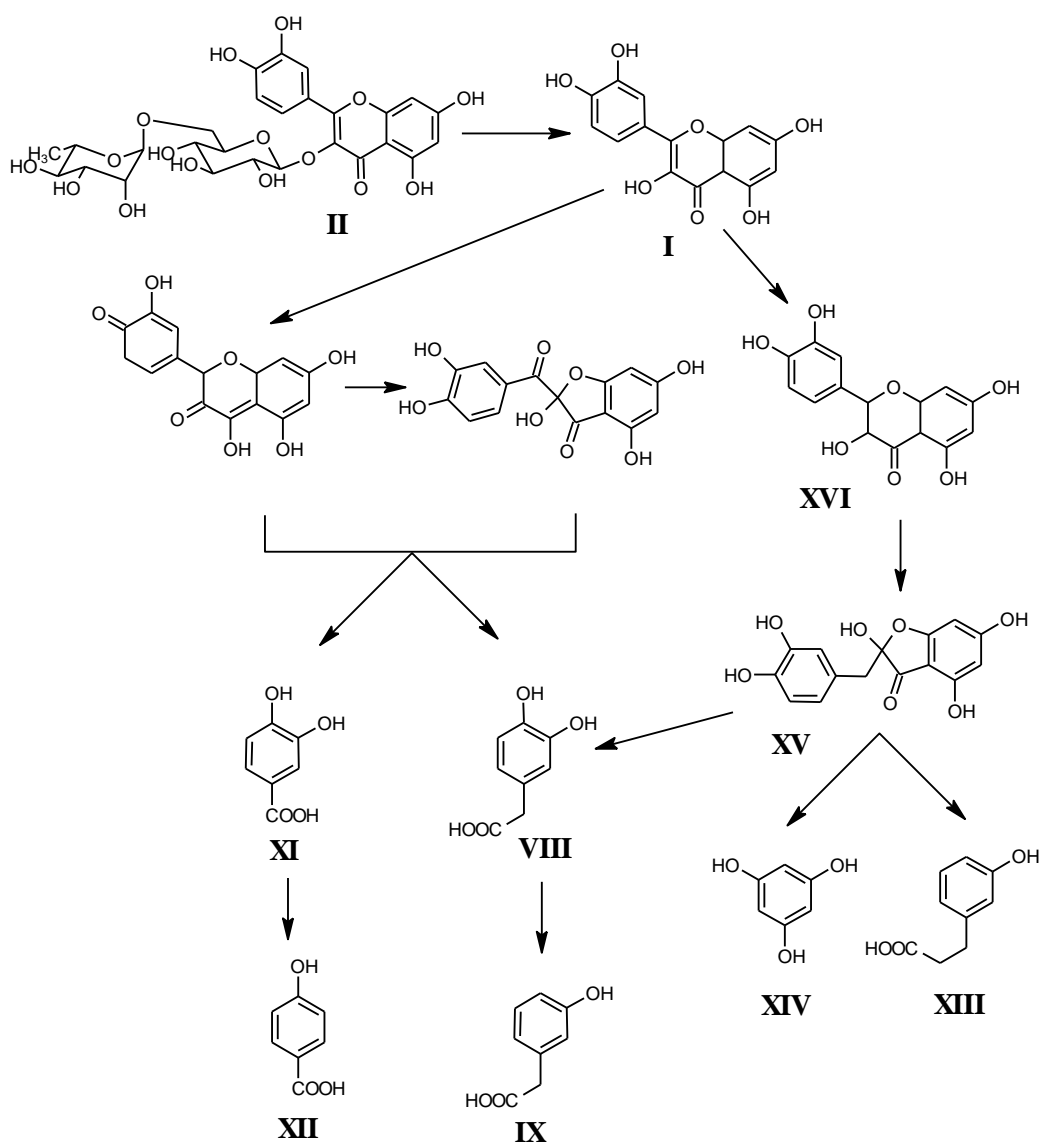
Monoglukosidy kvercetinu jsou v tenkém střevě enzymaticky hydrolyzovány a tím je usnadněna absorpce jednotlivých metabolitů. Glykosidy, které v cukerné části neobsahují glukózu, nejsou substráty těchto hydrolytických enzymů. Jejich hydrolyza probíhá až působením mikroflóry tlustého střeva. Je proto možné, že absorpce rutinu je oproti jiným glykosidům nižší a je zpožděna kvůli transportu do tlustého střeva. [42]

V průběhu postupu do tlustého střeva se mohou projevat antioxidační účinky rutinu. V lumen kolorekta se pak mohou koncentrovat jeho hlavní metabolity ((3,4-dihydroxyfenyl)octová kyselina a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (**XI**)), které tyto vlastnosti vykazují také. Tyto látky tak mohou přispívat k udržení zdravé střevní mikroflóry a mukózy.

Předpokládaný postup rutinu až do tlustého střeva byl ověřen při jeho podávání lidským dobrovolníkům. Plazmatická koncentrace vybraných metabolitů (konjugáty kvercetinu a isorhamnetinu) byla výrazně nižší než při podání glykosidů obsahujících glukózu. Ty mohou být hydrolyzovány již v tenkém střevě, a proto jsou jejich metabolity dříve detekovatelné. [43]

Prostředí tlustého střeva bylo simulováno v *in vitro* pokusu, při kterém byla sledována přeměna rutinu v přítomnosti mikroflóry obsažené ve lidské stolici. Množství bakterií produkujících β -rhamnosidasu ovlivnilo účinnost hydrolyzy na kvercetin. Přidání glukózy do reakční směsi usnadnilo růst těchto bakterií a hydrolyza byla

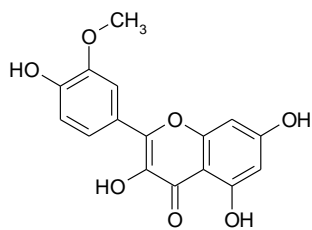
účinnější. Metabolismus dále pokračuje přeměnou kvercetinů. Po jeho inkubaci za stejných podmínek byly identifikovány tyto látky: kyseliny (3-hydroxyfenyl)octová, (3,4-dihydroxyfenyl)octová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová (**XII**) a 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (**XIII**), 1,3,5-trihydroxybenzen (**XIV**), alphitonin (**XV**) a taxifolin (**XVI**) (*Obr.3*). Zastoupení jednotlivých sloučenin se lišilo mezi jednotlivými vzorky a zároveň v závislosti na přítomnosti glukózy během inkubace. Z toho vyplývá, že složení potravy a uvolnění glukózy v tlustém střevě může ovlivnit metabolismus rutinu. [42]



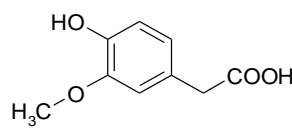
Obr.3: Schéma metabolismu rutinu. [42]

Vliv složení potravy na absorpci rutinu byl zkoumán ve studii, ve které bylo potkanům podáváno krmění obsahující rutin buď s pektinem, nebo s celulosou. Směs s pektinem výrazně ovlivnila složení střevní flóry. Koncentrace metabolitů rutinu (kvercetin a isorhamnetin (**XVII**)) v plazmě byla v této skupině výrazně vyšší, což ukazuje na lepší vstřebání rutinu. [44]

V dřívější studii byl po podávání rutinu lidem sledován obsah jednotlivých metabolitů v moči. Detekovány byly opět kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3-hydroxyfenyloctová a také 3-methoxy-4-hydroxyfenyloctová (**XVIII**). Ta po *in vitro* působení střevních bakterií nalezena nebyla, jedná se proto zřejmě o produkt další fáze metabolismu 3,4-dihydroxyfenylocové kyseliny, probíhající nejspíš v játrech. U osob po ileostomii (po odstranění tlustého střeva) tyto látky v moči nalezeny nebyly. Pravděpodobně se jedná o důsledek absence bakterií tlustého střeva, které rutin hydrolyzují. [45] Rutin v nezměněné formě byl detekován v krvi a lymfě potkanů, kterým byl tento glykosid podáván přímo do duodena. [46] Je možné, že se hydrolyza střevní mikroflorou, která je většinou považována za nezbytnou k absorpci rutinu, neprojevila díky rozpouštění ve směsi polyethylenglykol 400 (PEG)/ethanol (4:1). PEG obecně může zlepšit rozpustnost látky a usnadnit její přechod přes biologické bariéry, zde zřejmě přes stěnu střeva. [47]



XVII



XVIII

Obr. 4: Příklad metabolitů rutinu.

3.3.2 Terapeutické využití rutinu

V přípravcích obsahujících rutin se využívá především jeho schopnosti ovlivňovat lomivost a permeabilitu kapilár, případně protizánětlivého účinku. Je součástí řady léčiv i potravinových doplňků.

3.3.2.1 Léčiva s obsahem rutinu

Anavenol

Jedná se o léčivo vázané na lékařský předpis, používané při chronické žilní insuficienci, posttrombotickém syndromu, posttraumatických cirkulačních poruchách nebo jako adjuvans při ulcus cruris a tromboflebitidách. Anavenol obsahuje dihydroergokristin, eskulin a rutin trihydrát. Jedna tableta obsahuje 32,7 mg trihydrátu, což odpovídá 30 mg rutinu. Dihydroergokristin rozšiřuje arterioly a prekapilární sfinktery, zvyšuje žilní tonus působením na hladké svalstvo cév a tím zlepšuje dodávku kyslíku do tkání. Rutin a eskulin snižují permeabilitu a lomivost kapilár, mají protizánětlivý účinek. Přípravek tedy působí antiedematózně, venulotonicky a arteriolospazmolyticky, což zlepšuje mikrocirkulaci a vede ke snížení subjektivních potíží.

Ascorutin

Ascorutin je volně prodejné léčivo obsahující kyselinu askorbovou a rutin trihydrát, 20 mg v jedné tabletě. Mezi terapeutické indikace přípravku patří symptomatické ovlivnění zvýšené lomivosti a permeability kapilár, hlavně při nedostatku vitamínu C, při anafylaktoidní ruptuře a jiných vaskulárních poruchách, nedostatečnosti žil dolních končetin, léčbě místních otoků dolních končetin po traumatického nebo lymfatického původu, při hemoroidech. Dále se používá k ovlivnění místních příznaků krvácení při diabetické retinopatii, při polycytemii, ulcerózní proktokolitidě a dalších onemocněních.

Pharmaton Geriavit

Jde o multivitaminový registrovaný přípravek, který není vázaný na lékařský předpis. Obsahuje základní vitamíny, minerály a stopové prvky, dále pak standardizovaný extrakt z kořenů Panax ginseng a rutin (20 mg v jedné tobolce). Používá se při stavech vyčerpání, únavě, pocitech slabosti, snížené koncentraci a snížené duševní vnímavosti. Dále při nevyvážené nebo nedostatečné výživě, v době rekonvalescence po nemoci a pro posílení celkové odolnosti. Další indikací je zmírnění obecných příznaků stárnutí a prevence nedostatku vitamínů a minerálů u starších osob.

Phlogenzym

Phlogenzym je volně prodejné léčivo. Obsahuje enzymy bromelain a trypsin a rutin trihydrát (100 mg v jedné tabletě). Může se použít k odstranění poúrazových a pooperačních otoků. Jako podpůrná léčba je Phlogenzym vhodný při zánětlivých onemocněních například v oblasti urogenitálního a žilního systému, nebo při zánětlivých revmatických onemocněních, jako je revmatoidní artritida, revmatismus měkkých tkání, zánětlivá aktivace degenerativních onemocnění kloubů a páteře.

Enzymy zde působí svými účinky antiflogistickými a antiedematozními, fibrinolytickými, trombolýtickými a imunomodulačními. Protože tyto enzymy působí na faktory bolesti vyvolané akutní zánětlivou reakcí, lze jimi dosáhnout analgetického účinku. Uvedené účinky proteáz doplňuje a potencuje rutin. Využívá se zde jeho protizánětlivých účinků a schopnosti snižovat permeabilitu kapilár a extravazaci.

Wobenzym

Wobenzym je také volně prodejný registrovaný přípravek s obsahem enzymů. Obsahuje pankreatin, trypsin, chymotrypsin, bromelain, papain, amylasu a lipasu a také rutin trihydrát, kterého je v jedné tabletě 50 mg. Wobenzym je možné použít k odstranění poúrazových otoků, lymfedémů nebo při fibrocystické mastopatii. Jako podpůrná léčba je tento přípravek vhodný při některých pooperačních stavech v chirurgii, zánětech povrchových žil, potrombotickém syndromu dolních končetin, revmatoidní artritidě, revmatismu měkkých tkání, artróze, mnohočetné mozkomíšni

skleróze. Může se použít také při chronických a recidivujících zánětech a jako podpůrná léčba při podávání antibiotik.

Přípravek a jednotlivé složky působí antiflogisticky, antiedematózně, fibrinolyticky, lipolyticky a imunomodulačně a sekundárně také analgeticky. Účinky enzymů rutin podporuje a doplňuje. [48]

3.3.2.2 Potravinové doplňky s obsahem rutinu

Rutin je obsažen v řadě potravinových doplňků a to jak samostatně, tak v kombinaci s dalšími látkami. Častá je například kombinace s vitamínem C nebo s koenzymem Q10.

Příklad některých potravinových doplňků obsahujících rutin je uveden v tabulce:

Název	Výrobce	Složení	Obsah rutinu v jedné tabletě
C-Vitamin 100mg – Rutin se sukralózou	Rapeto a.s.	vitamín C beta-karoten rutin	30 mg
Escirutin	Stylpharma spol.s r.o.	aescin rutin	10 mg
HemoStop Probio	Simply You a.s.	rutin hesperidin diosmin probiotické kmeny inulin vitamíny C a E, selen	neuveдено
Hesperutin	Naturvita a.s.	vitamín C rutin bioflavonoidy z citrusových plodů	12 mg
Koenzym Q10 + rutin	UniosPharma	koenzym Q10 rutin	30 mg
Nature's Bounty Rutin	Nature's Bounty	rutin	50 mg
Rosen C + rutin	RosenPharma	vitamín C rutin	5 mg
Rutascorbit	Generica s r.o.	vitamín C rutin	20 mg

Venufit gel	Virde, spol. s r.o.	výtažky z plodů kaštanu koňského rutin	neuveдено
-------------	---------------------	--	-----------

3.3.3 Účinky rutinu, které jsou předmětem výzkumu

3.3.3.1 Protizánětlivé účinky

Rutin vykazuje protizánětlivé účinky. Tato vlastnost souvisí s jeho vysokou antioxidační aktivitou, protože volné radikály hrají významnou roli v rozvoji zánětu.

Tento účinek byl hodnocen pomocí *in vitro* inhibice významných enzymů účastnících se rozvoje zánětu, cyklooxygenasy 2 (COX-2), hyaluronidasy a sojové lipoxygenasy. Rutin všechny tyto enzymy inhibuje, avšak pouze v případě lipoxygenasy je jeho aktivita vyšší než u kyseliny acetylsalicylové. [10, 49]

Rutin také inhibuje uvolňování oxidu dusnatého (NO), reaktivního radikálu, který má také podíl na zánětlivé reakci. Jeho větší část vzniká v těle jako odpověď na patologický podnět například v makrofázích, neutrofilech, endoteliálních buňkách i jinde. Za použití buněčné kultury myších makrofágů klesala v přítomnosti rutinu produkce NO, vyvolaná přítomností polysacharidů. [50] Příčinou potlačení jeho vzniku bylo omezení aktivity NF- κ B, jaderného faktoru, který je například při infekci aktivován lipopolysacharidy, váže se na jadernou DNA a spouští transkripci některých genů zodpovědných za zánětlivou a imunitní odpověď (například gen pro inducibilní NO-synthasu). Součástí pozitivního účinku rutinu bylo také přímé zhasení volného radikálu NO. [51]

V další studii byly využity lidské neutrofilie, které byly stimulovány k produkci leukotrienu B (LTB) a prostaglandinu E₂ (PGE₂). Oba eikosanoidy hrají významnou roli v rozvoji zánětu. PGE₂ reguluje funkce makrofágů a lymfocytů. Indukuje hyperalgesii (zvýšená odpověď na bolest) a zvyšuje permeabilitu kapilár, čímž se podílí na vzniku bolesti a svědění během zánětu. Prostaglandin E₂ má ale také některé protizánětlivé účinky. Inhibuje aktivitu 5-lipoxygenasy a indukuje uvolňování lipoxinu A₄, „stop signálu“ zánětu. LTB₄ zvyšuje vaskulární permeabilitu, průtok krve v místě reakce. Uvolňuje lysosomální enzymy, kyslíkové volné radikály a cytokiny.

Po inkubaci takto stimulovaných neutrofilů s rutinem byla prokázána snížená produkce leukotrienu, což byl zřejmě důsledek inhibice aktivity 5-lipoxygenasy. Hladina prostaglandinu E₂ byla při použití některých koncentrací rutinu snížena, avšak při vyšších koncentracích byla produkce PGE₂ naopak vyšší. Rutin zřejmě neinhibuje

cyklooxygenasu univerzálně. Je možné, že snížení aktivity 5-lipoxygenasy vede k přeměně arachidonové kyseliny právě pomocí cyklooxygenasy, čímž se zvýší její aktivita. PGE₂ pak může indukovat uvolnění lipoxinu A₄ a tím působit proti zánětu. [10]

In vivo byl protizánětlivý účinek studován na potkanech, u kterých byl podáním sodné soli sulfátu dextranu vyvolán zánět tlustého střeva. Tento model vykazuje několik symptomů vyskytujících se u lidí trpících ulcerózní kolitidou (průjem, krev ve stolici, pokles tělesné hmotnosti, ulcerace střevní mukózy a zkrácení kolorekta). U zvířat, kterým byl do potravy přidáván rutin, docházelo ke snížení produkce interleukinu 1 β (IL-1 β), mediátoru zánětu, který je uvolňován jako odpověď na oxidační stres. Došlo tak k pozitivnímu ovlivnění zánětu a ke zmírnění poškození střeva. [52]

V další studii byl zánět střeva potkanů vyvolán pomocí 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny. Po orálních i rektálních podávání rutinu došlo ke zmírnění projevů zánětu a ke zlepšení stavu střeva. Ve střevě se pozitivní účinky rutinu projevíly zmenšením ulcerací a nekrotizací tkáně, dále zmírněním krvácení. U léčených zvířat nebyl dále pozorován průjem. [53] V jiném experimentu byl vliv rutinu srovnán s účinky léčiva běžně užívaného při zánětlivém onemocnění střeva. Dávka rutinu 10mg/kg měla srovnatelné účinky jako 30 mg/kg sulfasalazinu. Dále byl prokázán pozitivní účinek kvercetinu, který se v tlustém střevě uvolní hydrolyzou rutinu. Součástí účinku je nejspíš částečná inhibice aktivace NF- κ B zprostředkovaná TNF- α (tumor nekrotizující faktor α). [54]

Léčba cytostatikem cisplatinou je spojena s nefrotoxicitou. Na jejím rozvoji se významně podílí prozánětlivý účinek léčiva. Po podávání cisplatinu potkanům bylo v ledvinách sledováno snížení aktivit některých antioxidačních enzymů a pokles hladiny redukovaného glutathionu GSH. V případě, že byl zvířatům předem podáván rutin, byla antioxidační obrana po podání cisplatinu opět zvýšena. Cytostatikum dále podporovalo peroxidaci lipidů, čemuž rutin také bránil. Dále bylo pozorováno zvýšení hladin prozánětlivého cytokinu TNF- α , podávání flavonoidu tuto hladinu snižovalo, stejně jako zvýšenou expresi NF- κ B. Rutin tak podporoval přirozenou antioxidační ochranu organismu a bránil rozvoji zánětu, který se podílí na nefrotoxicitě cisplatinu. [55]

Jedním ze základních projevů zánětu je vznik otoku. Toho se často využívá v hodnocení protizánětlivých účinků látek. U potkanů byl proto otok způsoben subkutánním podáním karagenu do zadní packy. Studován byl protektivní vliv frakce extraktu z *Nepeta sibthorpii*. Tato frakce obsahovala především rutin, dále pak ještě

kyselinu chlorogenovou a luteolin-7-O-glukosid. Otok byl po tomto ošetření výrazně snížen. [56] Stejný účinek mělo i podání samotného rutinu. [57]

Rutin byl také jednou z obsahových látek extraktu *Solidago chilensis*. Protizánětlivé účinky extraktu byly hodnoceny na potkanech, u kterých byla zánětlivá reakce vyvolána podáním extraktu z latexu *Euphorbia milii* na vnitřní stranu ucha. Následné intraperitoneální a lokální podání extraktu ze *Solidago chilensis* vyvolalo snížení otoku. Naproti tomu po perorálním podání nebyl pozorován žádný efekt, což může být následek přeměny účinných látek po průchodu střevem či játry. Dále byla po systémovém podání extraktu pozorována snížená migrace leukocytů, především neutrofilních granulocytů, k ohnisku zánětu. [58]

Hodnocen byl také vliv rutinu na zánět způsobený infekčním patogenem. Do zadní packy potkanů byl vstříknut roztok obsahující buněčné stěny *Candida albicans*, která je častým původcem infekční arthritidy. Zvířatům s otokem byl podáván intraperitoneálně rutin. Po několika dnech docházelo k postupnému zmenšování otoku. K objasnění možného mechanismu účinku byla opět zhodnocena *in vitro* inhibice produkce NO makrofágy, který přispívá k rozvoji zánětu v synoviální membráně. V závislosti na dávce rutinu byla pozorována inhibice produkce NO makrofágy aktivovanými lipopolysacharidy z buněčné stěny *C. albicans*. Dále byl v přítomnosti rutinu sledován pokles proliferace T-lymfocytů, které také přispívají k rozvoji zánětlivé reakce. Bylo tak prokázáno, že rutin působí i proti zánětu vyvolanému infekčním činitelem. [59]

3.3.3.2 Antikancerogenní účinky

Volné radikály mají významné místo v rozvoji kancerogeneze. Antioxidanty, jako je rutin, tak mohou příznivě působit proti rakovinnému bujení. V případě zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) dochází k porušení rovnováhy mezi prooxidačními a antioxidačními mechanismy, což může vést k poškození buněk a jejich částí. Poškození DNA, spojené s nedostatečnou opravou, souvisí s kancerogenezí. Proto by prevence narušení a podpora oprav DNA mohla přispět k obraně před vznikem rakoviny.

Jako modelová látka pro oxidační poškození buněk se používá *tert*-butylhydroperoxid (*t*-BHP), který zvýšením uvolňování iontů železa způsobuje vznik volných radikálů, které se podílí na poškození DNA, peroxidaci lipidů a dalších mechanismů ovlivňujících integritu buňky. Další negativní účinky *t*-BHP jsou spojeny s jeho metabolizací glutathionperoxidasou, což vede k poklesu antioxidačně působícího GSH.

Buňky hepatomu HepG2 byly vystaveny působení *t*-BHP a byl sledován vliv antioxidantů rutinu a kvercetinů na poškození DNA. V případě současného působení obou látek i při předchozí inkubaci buněk s flavonoidem bylo pozorováno zmírnění poškození nukleových kyselin pouze za použití kvercetinu. Ten dále prokázal i pozitivní vliv na reparaci již vzniklých poškození DNA. Rutin žádné pozitivní výsledky nevykazoval. V případě současného vystavení buněk vlivům *t*-BHP i flavonoidů je ochrana před poškozením zřejmě způsobena snížením uvolňování volných radikálů a chelatací iontů železa. V případě předchozí inkubace je mechanismem účinku nejspíš zvýšení hladiny buněčných enzymatických i neenzymatických antioxidantů nebo zvýšení účinnosti enzymů podílejících se na detoxikaci. Rozdíl mezi účinky rutinu a jeho aglykonu kvercetinů je vysvětlován nižší lipofilitou glykosidu. I přes negativní výsledky z experimentu se rutin z potravy může podílet na ochraně poškození DNA a to díky jeho metabolizaci v tenkém střevě, kdy dochází k uvolnění kvercetinu. [60]

Antikancerogenní účinky rutinu byly prokázány během jeho inkubace s buňkami lidského glyoblastomu. S vyšší dávkou rutinu (až 100 μ M) a delší dobou inkubace docházelo k výraznější inhibici proliferace buněk. Působením 100 μ M rutinu po 24 hodin nebo 50-100 μ M po 72 hodin byla indukována apoptóza buněk. [11] Během působení rutinu na lidské buněčné linie karcinomu prsu, hormon-dependentního karcinomu prostaty, hepatomu a karcinomu plic nebyly pozorovány žádné antiproliferační účinky. [61]

V další studii byly využity buňky hepatomu potkana. Po jejich inkubaci s rutinem byly cytotoxické účinky pozorovány až u vyšší koncentrace flavonoidu (810 μ M). Stejná koncentrace se projevila jako účinná při hodnocení životaschopnosti buněk. Nejnižší množství přeživších buněk bylo pozorováno po 72 hodinách působení. Stejně bylo pozorováno snížení proliferace buněk. Po 24 hodinách tato ani nižší koncentrace rutinu nepůsobovala apoptózu. Ani nejvyšší koncentrace rutinu nepůsobila genotoxicky,

naopak, v případě poškození DNA indukovaným benzo[a]pyrenem, bylo pozorováno ochranné působení rutinu (koncentrace 90 μ M a více). [12]

U buněk lidského hepatomu HepG2, inkubovaných s kyselinou olejovou a rutinem, nebyl ani při koncentraci 200 μ M pozorován cytotoxický efekt rutinu. [62] Neprokázal se při použití buněk myší kostní dřeně, které byly po 12 hodin vystaveny působení 100 μ M rutinu, [63] po 24 hodinovém působení 94,8 μ M na buňky karcinomu prsu [64] a ani u koncentrací do 200 μ M rutinu inkubovaného s lidskými buňkami monocytární leukémie, hepatomu a karcinomu plic. [15] Naopak 50 μ M rutinu inkubovaného po 24 hodin s buňkami lidského nádoru plic cytotoxicky působilo. [65] Apoptóza buněk nebyla pozorována u buněk lidské leukémie vystavených 24 hodinovému působení 200 μ M rutinu, [66] buněk hladkých svalů potkanů po 18 hodinách s 30 μ M, [67] ani lidských buněk nádoru tlustého střeva po 24 hodinách s 100 μ M. [68] Naopak 50 a 75 μ M rutinu působícího po 24 hodin na buňky prostaty k apoptóze vedlo, [69] stejně jako v případě buněk lidského hepatomu (koncentrace nad 100 μ M). [70]

Proteolytický systém plasminogen/plasmin se mimo jiné také podílí na vzniku a šíření rakovinných buněk. Podporuje invazi a migraci buněk nádoru a také angiogenezi, což podporuje výživu tumoru. V *in vitro* studii s lidským plasminogenem a plasminem byl sledován vliv flavonoidů na tyto enzymy. Z výsledků plyne, že rutin je kompetitivním inhibítozem plasminu (váže proenzym plasminogen). Inhibuje také plasminem zprostředkované uvolňování proteinů, které způsobují adhezi buněk a tím šíření tumoru. [71]

Angiogeneze hraje v rozvoji nádoru významnou roli, protože rostoucí nádor nutně vyžaduje zásobení živinami a kyslíkem prostřednictvím nově vytvořených cév. Největší význam pro tento proces má vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Jde o angiogenní faktor produkovaný buňkami endotelu, který reguluje cévní proliferaci i permeabilitu. Podporuje růst některých solidních tumorů a akutní leukémie, významně se podílí na vaskularizaci například rakoviny prsu nebo plic. Expresi VEGF je ovlivněna transkripčními faktory AP-1 (aktivační protein-1), NF- κ B (nukleární faktor kappa B) nebo SP-1 (stimulační protein-1). Aktivace jejich vazebných míst může vést k transkripci VEGF a následně k metastáze. Synergický vliv rutinu a vitamínu E na expresi VEGF byl sledován na kultuře buněk lidské promyelocytární leukémie HL-60. Směs obou látek inhibovala expresi VEGF proteinu a mRNA ve zkoumaných buňkách, což ukazuje, že vitamin E a rutin působí na expresi VEGF na úrovni transkripce. Ve

studii nebyl prokázán vliv vitamínu E a rutinu na hladinu ROS v buňkách, z čehož plyne, že antioxidační účinek se může podílet na výsledném efektu, není to však zřejmě hlavní mechanismus účinku. Tím je nejspíš snížení vazebné aktivity aktivačního proteinu-1 AP-1 na DNA prostřednictvím down-regulace exprese proteinu receptoru pro inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF1-R) a proteinu IRS-1 (Insulin receptor substrate protein). Inhibice angiogeneze tak může představovat nový přístup k léčbě rakoviny. [72]

Vliv rutinu na angiogenezi byl sledován také na kultuře buněk lidského glioblastomu. Po inkubaci s flavonoidem bylo pozorováno snížení produkce proangiogenních cytokinů VEGF a TGF- β 1 (transformující růstový faktor β 1). [73]

In vivo byl hodnocen vliv rutinu na buňky myší myelomonocytární leukémie. Buňky byly vpraveny do zvířat a následně jim byl perorálně podáván roztok rutinu. Porovnáním hmotností a histopatologických ukazatelů bylo zjištěno, že rutin inhibuje růst nádoru sleziny v myších, který byl vyvolán podáním buněk leukémie. Sledování buněčných markerů ukázalo, že podáváním rutinu je inhibována diferenciací prekurzorů makrofágů a T-buněk. [74]

3.3.3.3 *Diabetes mellitus*

Pozornost je věnována také vlivu rutinu na průběh diabetu.

Jednou z možností léčby diabetu je podávání inhibitorů α -glukosidasy, která v tenkém střevě štěpí oligosacharidy na monosacharidy a tím umožňuje jejich vstřebávání. V *in vitro* experimentu byl hodnocen inhibiční účinek rutinu a kvercetinu na tento enzym. Bylo prokázáno, že jak aglykon, tak glykosid se vážou na α -glukosidasu a tím jí inhibují. Kvercetin účinkoval silněji než rutin. Pro porovnání intenzity účinku byla použita akarbose, inhibitor α -glukosidasy používaný jako perorální antidiabetikum. Její účinek byl slabší než účinek kvercetinu. [75] V další studii byl použit homogenát duodena potkanů. Po jeho inkubaci s rutinem byl sledován vliv flavonoidu na aktivitu některých α -glukosidas (maltasa, sacharasa, laktasa). Už v koncentraci 3,125 μ M inhiboval rutin maltasu. Maximální dosažená inhibice byla 55%, akarbose měla maximum 56%. Na ostatní enzymy neměl rutin vliv.

K ohodnocení *in vivo* účinku byl potkanům podán rutin a po 30 minutách glukóza. Poté byla měřena její hladina v krvi. Ta byla vždy nižší než u neléčených zvířat. Pokud však byl rutin podán ve stejný okamžik jako glukóza, nebyl pozorován žádný významný účinek. [76]

Pro experimentální účely se v pokusech na zvířatech používá uměle navozený diabetes. Po podání streptozotocinu (antibiotikum produkované *Streptomyces achromogenes*) dochází k destrukci β -buněk pankreatu a následně k nedostatku inzulínu, který se projeví zvýšením hladiny glukózy v krvi. Jedním z možných účinků streptozotocinu je inhibice antioxidantních enzymů, a proto dochází ke zvýšení hladiny ukazatelů oxidačního stresu v těle. [77] U potkanů s takto vyvolaným zvýšením glykémie došlo ke snížení hladiny cukru po intraperitoneálním podávání extraktu z třezalky tečkované. Hlavní účinnou látkou extraktu byl právě rutin, následovaný kvercetinem. [78] Po sedmidenním intraperitoneálním podávání rutinu (4 mg/kg) potkanům s diabetem vyvolaným streptozotocinem byl sledován pokles hladiny glukózy v krvi oproti skupině bez flavonoidu, a to po dvanáctihodinovém lačnění i po podání glukózy. [79]

Jeden z možných mechanismů účinku flavonoidů při diabetu pravděpodobně vychází z antioxidantních vlastností těchto látek, které se uplatní při inhibici poškození β -buněk pankreatu. Bylo prokázáno, že dlouhodobá hyperglykémie u diabetiků i v experimentálních zvířecích modelech rozvíjí oxidační stres. Byla zjištěna vysoká hladina peroxidů lipidů a dalších reaktivních sloučenin kyslíku. Oxidační stres pak může být zodpovědný za pokles funkce β -buněk. [77] Flavonoidy se pak podílí na regeneraci poškozených pankreatických buněk nebo na stimulaci sekrece inzulínu. Po podávání kvercetinu (10-15 mg/kg po 10 dní) byl u potkanů, kterým byl předem podán streptozotocin, pozorován nárůst počtu β -buněk. [80] Intraperitoneálním podáváním kvercetinu (15 mg/kg) tři dny před aplikací streptozocinu byly jeho účinky na pokles hladiny inzulínu a zvýšení koncentrace glukózy v krvi částečně zmírněny. Kvercetin částečně zabránil poškození β -buněk a zároveň snížil hladiny ukazatelů oxidačního stresu. [77] Také rutin působil proti poklesu plazmatické hladiny inzulínu. Podávání 100 mg/kg po 45 dní vedlo ke snížení koncentrace reaktivních forem thiobarbiturové kyseliny a hydroperoxidů lipidů v pankreatu diabetických potkanů a naopak zvýšení aktivity antioxidantních enzymů. Snížily se hladiny glukózy a glykosylovaného inzulínu v krvi. [81, 82]

Diabetes je spojen také s produkcí glukózy v játrech. Dochází k ní buď glykogenolýzou nebo glukoneogenezí. Inzulínová rezistence je často způsobena nedostatečnou inhibicí glykogenolýzy. Klíčovým enzymem v regulaci tohoto děje je glykogenfosforylasy. Předpokládá se proto, že inhibice enzymu by mohla vést k potlačení glykogenolýzy, což by bylo výhodné pro léčbu diabetu. V *in vitro* experimentu byl hodnocen inhibiční vliv některých flavonoidů na aktivitu glykogenfosforylasy. Ve směsi enzymu a glykogenu se sledovalo množství uvolněné glukózy. Příklad rutin vyvolal nižší koncentraci glukózy oproti kontrole. Kvercetin byl v tomto pokusu ještě více aktivní. Dále byly inkubovány hepatocyty potkanů s kvercetinem. I zde se projevil inhibiční efekt tohoto flavonoidu. Rutin i kvercetin by tedy mohly být použity pro ovlivnění hladiny glukózy v krvi diabetiků. [83]

Redukující sacharidy mohou v krvi reagovat s aminoskupinami proteinů. Oxidací těchto produktů vznikají tzv. pozdní produkty glykace, které jsou spojeny s řadou patologických jevů. Tyto látky se hromadí v proteinech s delší životností (např. v kolagenu) a mění jejich strukturní, biochemické a fyzikální vlastnosti. Pozměněný kolagen vzniká během přirozeného stárnutí nebo také při diabetu. Jeho kumulace může mít za následek snížení elasticity arterií, srdce nebo plic, což může vést k poklesu některých fyziologických funkcí (srdečního indexu, vitální kapacity plic, průtoku krve ledvinami). Dále může dojít k urychlení vývoje neuropatií, nefropatií, retinopatií, stařecké katarakty, Alzheimerovy nemoci nebo kardiovaskulárních onemocnění. V *in vitro* studiích byl zkoumán vliv rutin a některých jeho metabolitů na vznik pozdních produktů glykace. Prokázalo se, že rutin a metabolity obsahující vicinální hydroxylové skupiny (kvercetin, 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina a 3,4-dihydroxytoluen) jsou schopné inhibovat tvorbu glykovaných produktů kolagenu a dalších proteinů (histon H1). Z výsledků vyplývá, že rutin a jeho metabolity by mohly být podávány jako doplňky stravy nebo jejich zdroj přímo jako součást běžné potravy k potlačení rozvoje komplikací nemocí a normálního stárnutí spojených s glykací proteinů. [41, 84]

Během diabetu také dochází ke změnám v plazmatických hladinách lipidů. U potkanů s diabetem vyvolaným streptozotocinem se snížila hladina HDL a naopak vzrostla koncentrace LDL, triacylglycerolů a celkového cholesterolu. U zvířat, kterým byl intraperitoneálně podáván rutin, došlo naopak ke zvýšení koncentrace HDL a snížení LDL i TAG. Příčinou může být inhibice HMG-CoA reductasy rutinem. [13]

3.3.3.4 *Ovlivnění lipidů*

Rutin vykazuje také některé účinky na lipidy. Zřejmě ovlivňuje jejich hladiny v krvi a dále brání jejich peroxidaci, čímž se může mimo jiné podílet na ochraně buněčných membrán.

U myší krmených po deset dní potravou s vysokým obsahem cholesterolu byl sledován vliv současně podávání rutinu na sérové hladiny lipidů. U neléčených zvířat bylo pozorováno zvýšení hladin celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu, zatímco hladina HDL-cholesterolu a triglyceridů byla nižší než v kontrolní skupině. V případě, že byl zvířatům perorálně podáván rutin (70 mg/kg), došlo ke snížení hladin celkového cholesterolu, triglyceridů i LDL-cholesterolu, hladina HDL-cholesterolu byla zvýšena. Krmení potravou s vysokým obsahem cholesterolu vedlo také ke zvýšení hladin malondialdehydu, který vzniká jako rozkladný produkt oxidovaných polynenasycených mastných kyselin a je tedy ukazatelem peroxidace lipidů, v játrech. Rutin tyto hladiny opět snižoval a peroxidaci tak bránil. [85]

Potkanům byly potrava s vysokým obsahem cholesterolu a rutin podávány perorálně po čtyři týdny. Ve skupině bez rutinu byly pozorovány zvýšené hladiny celkového cholesterolu, triglyceridů a LDL-cholesterolu. Současné podávání rutinu tyto koncentrace snižovalo. Snížené hodnoty HDL-cholesterolu byly ve skupině s 10 mg/kg rutinu opět zvýšeny, zatímco ve skupině se 100 mg/kg byly ještě nižší. Oxidační stres, způsobený dietou s vysokým obsahem cholesterolu, se v játrech projevil jako zvýšené hladiny aspartát-aminotransferasy a alanin-aminotransferasy. Rutin hodnoty snižoval. Změna stravy se odrazila také v histologickém obraze jater. Zvířata bez flavonoidu měla v hepatocytech kapičky tuku, bylo pozorováno zúžení cév a infiltrace mononukleárů, což souvisí s rozvojem zánětlivé reakce. Při podávání nižších dávek rutinu byl stav jaterních buněk stejný, ale po užívání 100 mg/kg rutinu nebyla pozorována kumulace tuku ani indikátory zánětu. Zúžení cév se ještě částečně objevovalo. Rutin tedy může ovlivňovat hladiny sérových lipidů a ukládání tukových částic v těle. [86]

Vysoký obsah tuků v potravě souvisí také s rozvojem obezity. Potkani byli proto po čtyři týdny krmeni stravou s vysokým obsahem tuků. To vedlo ke zvýšení hmotnosti celého těla, jater a tukové tkáně. U zvířat, kterým byl po dalších osm týdnů podáván rutin, byly tyto hodnoty výrazně nižší. Dále byly sníženy koncentrace jaterních triglyceridů a cholesterolu. Vysoký obsah tuku v potravě vedl opět k oxidačnímu stresu a snížení aktivit antioxidantních enzymů. Působením rutinu byly tyto hodnoty opět

zvýšeny. Rutin tak může pomoci proti rozvoji dyslipidemie, hepatosteatosy a obezity. [87]

Rutin může také ovlivňovat reakce lipidů, které by mohly vést ke vzniku škodlivých produktů. Oxidace LDL částic indukovaná *in vitro* pomocí CuSO₄ byla výrazně potlačena inkubací buněk s extraktem listů *Zanthoxylum ailanthoides* (*Rutaceae*), který obsahuje především rutin a hyperosid. [88]

Hlavní formou lipidů přijímaných potravou jsou triacylglyceroly, které jsou v žaludku emulgovány pomocí amfifilních proteinů a fosfolipidů ze stravy. Železo přijaté potravou, kyslík a emulgované lipidy interagují s prostředím žaludku, následkem čehož může být až oxidace lipidů. Vzniklé hydroperoxy nemusí dosáhnout střeva, ale mohou být rozloženy v žaludku za vzniku mastných hydroxykyselin, aldehydů a epoxidů. Ty mohou být dále zabudovány do žaludeční tkáně ještě před tím, než se dostanou do krevního oběhu jako součást VLDL částic. Vazba aldehydů na lipoproteiny je navíc silně spojena s atherogenicitou LDL částic. [89]

V *in vitro* pokusu byl sledován vliv metmyoglobinu, jedné z hlavních forem potravního železa, na oxidaci lipidů a inhibice tohoto děje pomocí potravních polyfenolů, např. rutinu. Tato oxidace vede ke vzniku konjugovaných dienu odvozených od lipidů a těkavých aldehydů. Proto byly kontrolovány koncentrace těchto látek. Po přidání rutinu do reakční směsi docházelo ke vzniku menšího množství sledovaných látek než ve směsi bez flavonoidu. Z výsledků vyplývá, že rutin může inhibovat oxidaci potravních lipidů v žaludku a tím omezit množství produktů této reakce navázaných na lipoproteiny, což se může projevit jako snížení rizika vzniku některých kardiovaskulárních onemocnění. [89, 90]

Častou příčinou chronického onemocnění jater je kumulace lipidů. Jedním z nejdůležitějších faktorů pro rozvoj tohoto postižení je příjem lipidů potravou. Buňky lidského hepatomu HepG2 byly inkubovány s kyselinou olejovou a byl sledován vliv rutinu na obsah lipidů v buňkách. Sledovaný flavonoid inhiboval jejich hromadění a snižoval lipogenezi. Působil snížení tvorby triacylglycerolů díky podpoře β -oxidace mastných kyselin. [62]

3.3.3.5 Ovlivnění erytrocytů

Hemolýza erytrocytů může být způsobena volnými radikály. Proto se pro jejich obranu může využít antioxidačních vlastností rutinu. V *in vitro* testu byla hemolýza lidských erytrocytů vyvolána přidavkem 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochloridu. Toto činidlo se ve vodném prostředí teplem rozkládá za vzniku volného radikálu, který atakuje polynenasycené lipidy v membráně erytrocytů a iniciuje tak peroxidaci lipidů. Tím dojde k narušení buněčné membrány a hemolýze. Rutin jako antioxidant může zastavit vznik peroxylových radikálů a tím zabránit rozpadu erytrocytů, a proto se po jeho přidavku hemolýze výrazně zabránilo. [91]

Dále byl vliv volných radikálů na erytrocyty sledován při působení bifenthrinu, pyrethroidního insekticidu. Při jeho metabolismu vznikají ROS. Ve studii byly sledovány obranné reakce erytrocytů proti těmto volným radikálům a také vliv rutinu a kvercetinů na tyto aktivity. Hlavními antioxidačními enzymy erytrocytů jsou katalasa a superoxiddismutasa. V přítomnosti bifenthrinu se jejich aktivita snižovala. Příčina může být ve vyčerpání enzymů při velkém nárůstu koncentrace radikálů nebo v jejich přímé inhibici bifenthrinem. V případě, že byly erytrocyty před přidáním bifenthrinu inkubovány s rutinem nebo kvercetinem, byla následná aktivita katalasy vyšší než bez flavonoidů. Rutin i kvercetin se podílí na vychytávání vzniklého H_2O_2 . Aktivita superoxiddismutasy byla také oběma flavonoidy pozitivně ovlivněna, avšak rutin byl výrazně méně aktivní než kvercetin. Po přidání rutinu se aktivita oproti kontrole dokonce snížila, což však může být způsobenou možnou kooperací rutinu a enzymu při vychytávání superoxidu. Dalším sledovaným parametrem aktivity antioxidantů byla koncentrace malondialdehydu, který je ukazatelem peroxidace lipidů a následného narušení buněčné membrány erytrocytů. Působením volných radikálů proto koncentrace malondialdehydu roste. Přidání rutinu prokázalo snížení jeho hladiny a tedy protektivní efekt. Kvercetin byl aktivní pouze při nejnižší koncentraci oxidačního činidla. [92] Podobně byl sledován vliv dalšího pyrethroidu, β -cyfluthrinu. Vyšší koncentrace tohoto insekticidu působily snížení aktivit antioxidačních enzymů, předchozí inkubace s rutinem je opět zvyšovala. Koncentrace malondialdehydu se po přidání cyfluthrinu zvýšila, ale po přidání rutinu opět klesla. [93]

3.3.3.6 Kardioprotektivní účinky

Reaktivní formy kyslíku hrají významnou roli při rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Jejich cytotoxický efekt souvisí s negativním působením na buněčné membrány. Kromě narušení srdečních buněk mohou být tyto látky zodpovědné za uvolnění lysosomálních enzymů, které vede k dalšímu poškození až nekróze buněk.

U testovaných potkanů byla podáním isoproterenolu vyvolána nekróza myokardu podobná infarktu. Předchozí perorální podávání rutinu (80 mg/kg) mělo potvrdit jeho vliv na stabilizaci membrán, což se projeví rozdílnou koncentrací sledovaných lysosomálních enzymů v séru. Sledovanými ukazateli srdečního poškození byly aktivity sérové kreatinkinasy, T- a I-troponinu a sérové a srdeční aktivity lysosomálních enzymů (β -glukuronidasy, β -N-acetylglukosaminidasy, β -galaktosidasy a kathepsinů B a D). Po podání isoproterenolu hladiny těchto markerů výrazně stoupaly, zatímco u zvířat, kterým byl předem podáván rutin, byly koncentrace prokazatelně nižší. Histopatologické nálezy prokázaly příznivý vliv rutinu na výskyt nekrózy, jejíž stupeň byl u zvířat, která dostávala rutin, výrazně nižší. Vychytáváním reaktivních forem kyslíku, které se uvolňují během poškození buněk, se rutin zřejmě podílí na stabilizaci membrán a tím brání dalšímu poškození. [94] Dále byl sledován vliv na mitochondrie srdečních buněk, které hrají zásadní roli při zabezpečení dostatku energie v buňkách. Po aplikaci isoproterenolu v nich bylo sledováno zvýšení hladiny lipidů, produktů jejich peroxidace a vápníku, snížily se naopak hladiny mitochondriálních antioxidantů a enzymů. Podávání rutinu těmto změnám bránilo. Flavonoid tak snižoval rozsah poškození mitochondrií buněk myokardu a bránil narušení jejich funkcí, což zřejmě plyne z jeho schopnosti zhášet volné radikály, bránit peroxidaci lipidů a podporovat aktivity některých enzymů. [95]

Zatímco předchozí studie sledovaly vliv rutinu podávaného *p.o.*, v dalším pokusu byl zkoumán vliv rutinu aplikovaného *i.v.* V tomto případě nebyl prokázán žádný pozitivní účinek rutinu na poškození myokardu vyvolané podáním isoproterenolu. Vyšší dávka (46 mg/kg) dokonce způsobila zhoršení příznaků poškození srdce (koncentrace vápenatých iontů v srdci a uvolnění troponinu T v myokardu). Ani histologické vyšetření neprokázalo příznivý vliv rutinu. *In vivo* studie byla potvrzena *in vitro* pokusem s kulturou srdečních buněk.

Jedno z možných vysvětlení rozdílu mezi výsledky těchto studií bere v úvahu různou cestu podání rutinu. Bylo prokázáno, že po *p.o.* podání se nevstřebává samotný

rutin, ale jeho metabolity, vznikající v tlustém střevě. Z toho by vyplývalo, že při tomto způsobu podávání se v ochraně myokardu uplatňují pouze metabolity místo rutinu samotného. Po *i.v.* podání tato přeměna chybí a na srdeční buňky by měl působit přímo rutin. [96]

3.3.3.7 *Ovlivnění centrálního nervového systému*

Rutin vykazuje také některé účinky na úrovni CNS.

Při poranění a zánětlivém poškození mozku dochází k aktivaci gliových buněk (mikroglíí a astrocytů). K aktivaci dochází také působením trimethyltinu (TMT), látky, která se používá při výrobě některých plastů (PVC). Neuroprotektivní účinek rutinu byl hodnocen na potkanech, u kterých byla podáním TMT vyvolána ztráta neuronů v některých oblastech hippocampu. U sledovaných zvířat došlo k up-regulaci exprese mRNA některých markerů značících aktivaci gliových buněk, dále byla pozorována up-regulace exprese některých prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF- α). U zvířat, kterým byl podáván v potravě rutin, byly tyto hladiny opět sníženy. Rutin tedy vykazoval protektivní efekt při poškození neuronů hippocampu potlačením aktivace glií a prozánětlivých cytokinů. [14]

Buněčná smrt a snížení proliferace neuronů hippocampu je jedním z následků dlouhodobého podávání glukokortikoidů. Potkanům byl po 21 dní podáván dexamethason, což se kromě anxiety, agresivního chování a snížení hmotnosti projevilo narušením schopnosti učení a paměťových funkcí. V případě, že byl zvířatům před každou dávkou kortikoidu podáván *p.o.* rutin, nedocházelo k poškození sledovaných buněk mozku a zvířata obstála výrazně lépe v testu hodnotícím učení a paměť. [97]

Rozvoj Alzheimerovy choroby je spojen s nedostatkem neurotransmiteru acetylcholinu. Hlavní roli v jeho odbourávání hraje v těle acetylcholinesterasa, jejíž inhibice je základem jednoho z léčebných postupů. Minoritní úlohu v hydrolýze tohoto přenašeče v mozku má butyrylcholinesterasa (BchE). Při Alzheimerově chorobě však její aktivita v nejzasazenějších oblastech mozku stoupá (temporální kortex, hippocampus). Zvýšené hladiny hrají roli také při agregaci β -amyloidu (fragmentu prekursoru membránového proteinu neuronů) v počáteční fázi tvorby plaků. Inhibice BchE by proto mohla mít klinický význam při léčbě symptomů neurodegenerativních

onemocnění a demence. V *in vitro* pokusu byl sledován vliv rutinu na BchE izolovanou z lidské plazmy. 100 $\mu\text{mol/l}$ byla koncentrace rutinu, která vykazovala reverzibilní inhibici sledovaného enzymu. [15]

Možný antidepresivní účinek rutinu byl hodnocen podle chování myší ve stresových situacích. 60 minut po podání rutinu byly myši vloženy do vody nebo zavěšeny za ocas do vzduchu. Následně se měřil čas, za který se myš uklidní. V pokusu s vodou nebyl pozorován žádný účinek rutinu, avšak při zavěšení do vzduchu se oproti kontrole čas nutný k uklidnění zkrátil. Po předchozím podání methylesteru *p*-chlorfenylalaninu (inhibitoru tryptofanhydroxylasy), který snižuje hladinu serotoninu v krvi nebo α -methyl-*p*-tyrosinu, (inhibitor tyrosinhydroxylasy), způsobujícího pokles koncentrace katecholaminů a následném podání rutinu se jeho antidepresivní účinky výrazně snížily. Tento výsledek zřejmě potvrzuje mechanismus účinku rutinu přes ovlivnění koncentrací monoaminů v krvi. [16]

Pro posouzení vlivu rutinu na mozek byly po orálním podávání rutinu potkanům hodnoceny elektrofarmakogramy získané ze signálů mozku. Jako pozitivní kontrola byl podáván moklobemid (inhibitor aminooxidasy). Z porovnání výsledků plyne, že jedním z možných mechanismů antidepresivních účinků rutinu je právě inhibice aminooxidasy. Signály rutinu byly také podobné signálům po podání donepezilu a galanthaminu, což jsou inhibitory acetylcholinesterasy. [17]

3.3.3.8 Ovlivnění bolesti

Pro ohodnocení vlivu rutinu na vnímání bolesti byl myším injekčně podán do packy glutamát. Ten způsobil bolest, která se projevila olizováním citlivého místa. Před jeho aplikací byl zvířatům intraperitoneálně podán rutin (1-100 mg/kg) a byla pozorována doba, kterou zvíře stráví olizováním. Ve srovnání s kontrolou způsobil rutin snížení bolestivosti packy a to v závislosti na koncentraci. [98] Rovněž u potkanů s uměle vyvolaným diabetem bylo pozorováno snížení bolesti po intraperitoneálním podávání extraktu z třezalky tečkované, který obsahoval především rutin a kvercetin. [78]

3.3.3.9 Ovlivnění oka

Hypoxie, oxidační stres a vysoká hladina glutamátu jsou důležité rizikové faktory při rozvoji řady onemocnění očí. Tyto jevy ovlivňují gangliové buňky retiny a mohou vést až k jejich smrti. Smrt těchto buněk při glaukomu je zřejmě vyvolaná apoptózou. Bylo zjištěno, že hypoxie a glutamát vedou buňky k apoptóze, kdežto oxidační stres ústí v nekrózu. Těmto třem rizikovým faktorům byly vystaveny kolonie gangliových buněk retiny potkanů. K buňkám byl přidáván roztok rutinu, který měl v koncentracích menších než 1nM příznivý vliv na životaschopnost buněk vystavených škodlivým vlivům. Prokázal inhibiční účinky na dráhu apoptózy (snížení aktivity kaspasy) i nekrózy (snížení aktivity kalpainu). Rutin tak prokázal své neuroprotektivní účinky. [99]

3.3.3.10 Ovlivnění svalstva

S přibývajícím věkem dochází u živočichů k úbytku svalové hmoty. To je zřejmě způsobeno řadou faktorů, zahrnujících kromě snížení fyzické aktivity, podvýživy a endokrinologických změn také oxidační stres a častější výskyt zánětlivých procesů v těle. Působením antioxidantů může dojít ke snížení těchto projevů a tím i k ovlivnění kvality svalové hmoty.

Jedním z možných mechanismů, které se podílí na snížené tvorbě svalů, je snížení schopnosti starých svalů vhodně reagovat na anabolické podněty, jako je příjem potravy a aminokyselin. Syntéza proteinů je pak méně stimulována a jejich rozklad naopak méně inhibován příjmem aminokyselin. Pro adekvátní odpověď je pak nutný jejich vyšší příjem, než je běžné u svalů mladších jedinců. [100, 101]

Směs obsahující rutin a další antioxidanty (vitamin E, vitamin A, zinek a selen) pozitivně ovlivňuje anabolickou odpověď svalů starších potkanů na aminokyselinu leucin. Tato odpověď je však zřejmě spíš výsledkem pozitivního ovlivnění oxidačního stavu a zánětlivých procesů v celém organismu než lokálního účinku ve svalech. Ve studii bylo prokázáno, že podávání směsi antioxidantů nezlepšilo oxidační stav ve svalech. Došlo však ke zlepšení antioxidačních vlastností v játrech (obsah glutathionu),

ledvinách a srdci. To může vést k vylepšení oxidačního stavu celého organismu a k ovlivnění zánětlivých procesů v těle. [100, 101]

Sledován byl také vliv rutinu na svalovinu ilea. Na izolovanou část tenkého střeva morčat se působilo acetylcholinem a sledovaly se kontrakce vzorku. V případě, že bylo ileum před přidáním acetylcholinu inkubováno s rutinem, došlo k inhibici kontrakcí. K porovnání účinku byl použit papaverin a atropin, které inhibovaly 100% kontrakcí, zatímco rutin způsobil 93,4% inhibice. Mohl by proto mít význam při ovlivnění stavů spojených s hypermotilitou tenkého střeva. [102]

3.3.3.11 Ischemie/reperfuze

Ischemie a následná reperfuze způsobuje poškození tkání v těle. Klíčovou roli v tomto procesu zřejmě hraje zvýšená produkce superoxidu a snížené uvolňování oxidu dusnatého. Uvolňování superoxidu dále vede k tvorbě dalších radikálů kyslíku. Tyto látky vyčerpávají kapacitu endogenního antioxidačního systému, což následně vede k zvýšené peroxidaci lipidů a dále k poškození buněk. Snížená hladina vasodilatačně působícího NO způsobuje nižší průtok krve poškozenou oblastí. Dochází k uvolňování mediátorů zánětu a tvorbě trombů. [21]

Při ischemickém poškození mozku hraje významnou roli právě oxidační stres, protože mozek spotřebovává velké množství kyslíku, obsahuje vysoké množství polynenasycených mastných kyselin a vykazuje relativně nízkou antioxidační aktivitu. [103] Podávání antioxidantů tedy může vést ke zmírnění poškození mozku, jak bylo prokázáno dále uvedenými experimenty.

Ischemie mozku byla navozena u potkanů okluzí střední mozkové tepny. Po tři týdny před zákrokem byl zvířatům podáván rutin. Po následné reperfuzi bylo sledováno poškození mozkové tkáně. Ze studie vyplynulo, že rutin zmírňuje apoptózu neuronů poškozených ischemií díky potlačení exprese genu p53, prevenci morfologických změn a zvýšením aktivit endogenních antioxidačních enzymů. Po podávání rutinu byla infarktem zasažena menší část mozku, byl poškozen nižší počet neuronů. Dále rutin zeslabil změny v chování postižených zvířat. U zvířat s ischemií bylo zaznamenáno významné snížení aktivity antioxidačních enzymů (glutathionperoxidasy, glutathionreduktasy, katalasy a superoxidodismutasy) a také obsahu glutathionu. Zvířata,

kteřá dostávala rutin, byla před tímto poklesem výrazně chráněna. Byl také ovlivněn obsah reaktivních derivátů kyseliny thiobarbiturové a peroxidu vodíku, u premedikovaných zvířat byla prokázána nižší hladina těchto látek. Celkově tedy podáváním rutinu došlo ke zmírnění následků ischemie a následné reperfuze mozku potkanů. [103]

Dočasná ischemie ledvin u potkanů byla spojena s poklesem renálních funkcí, což se projevilo zvýšením sérových hladin kreatininu a laktátdehydrogenasy. U zvířat, kterým byl před zákrokem podáván rutin, byly tyto hladiny výrazně sníženy. Poškození ledvin bylo spojeno s oxidačním stresem, neboť byly detekovány zvýšené hladiny malondialdehydu a snížené hladiny redukovaného glutathionu. Antioxidačně působící rutin tyto hladiny pozitivně upravoval. Pozorovány byly také histologické změny, narušení stavby ledvinných buněk i nekróza. I zde působil rutin proti poškození. [104]

Podávání rutinu bylo testováno také u potkanů, u kterých byla navozena ischemie varlete. Po dvou hodinách došlo k reperfuzi a v tomto okamžiku byl jedné skupině zvířat podán intravenózně rutin. Ve varlatech těchto zvířat byla pozorována nižší hladina malondialdehydu a vyšší aktivita superoxiddismutasy a katalasy než ve skupině neléčené. Po ischemii došlo ke snížení spermatogeneze, která byla podáním rutinu navrácena do normálu. Protektivní účinek rutinu je zřejmě způsoben jeho schopností zhášet ROS a zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů. [105]

Třicetiminutová okluze srdeční tepny a následné obnovení průtoku krve u potkanů vedlo k rozsáhlé nekróze myokardu, zvýšení hladin ukazatelů peroxidace lipidů a enzymů aspartát-aminotransferasy a alanin-aminotransferasy. Dále bylo pozorováno snížení aktivity katalasy a hladin redukovaného glutathionu. U zvířat, kterým byl intraperitoneálně podán rutin, byl rozsah nekrózy výrazně nižší a došlo k upravení hladin složek antioxidační ochrany srdce. Také peroxidace lipidů byla výrazně snížena. [106]

Králíkům, u kterých byl sledován účinek ischemie a následné reperfuze v kosterních svalech, byl předem podán Phlogenzym, přípravek obsahující rutin a enzymy bromelain a trypsin. Všechny složky by měly zmírňovat následky poškození. Antioxidační účinky preparátu se projevily při ovlivnění koncentrace aduktu malondialdehydu a kyseliny thiobarbiturové, který je indikátorem peroxidace lipidů. U zvířat, kterým byl Phlogenzym podán, byla tato koncentrace shodná s kontrolou bez ischemie a výrazně nižší, než u ischemických zvířat, která premedikována nebyla. U ischemických zvířat byla také sledována vyšší koncentrace sodíku v krvi, což může být

způsobeno poškozením svalových buněk a následným uvolněním intracelulárního sodíku. U léčených zvířat tento jev pozorován nebyl, což naznačuje, že buňky byly lépe chráněny před poškozením. Po obnovení krevního průtoku byl u postižených zvířat pozorován otok, který byl podáním Phlogenzymu výrazně snížen, což může být také následek antioxidačního působení rutinu. Všechny pozorované účinky jsou však zřejmě způsobeny kombinací účinků obsažených antioxidantů a enzymů. [21]

3.3.3.12 Antibakteriální účinky

Antibakteriální účinky byly hodnoceny podle inhibice růstu některých bakterií v přítomnosti různých koncentrací rutinu. Tento flavonoid byl aktivní proti všem studovaným bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*). Výsledné minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly u *P. aeruginosa* a *A. baumannii* srovnatelné s hodnotami ofloxacinu a levofloxacinu (64 mg/ml), v případě *S. aureus* podobné s levofloxacinem (128 mg/ml). U ostatních kmenů byl rutin méně aktivní než použité standardy antibiotik. [18]

Rutin a kyselina chlorogenová byly stanoveny jako hlavní látky obsažené v extraktu listů tabáku. V *in vitro* experimentu byla sledována aktivita tohoto extraktu proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Extrakt vykazoval antibakteriální účinnost proti všem sledovaným bakteriím. V porovnání s gentamycinem byl extrakt prakticky stejně účinný. [20]

Porphyromonas gingivalis je Gram-negativní anaerobní bakterie a *Streptococcus mutans* je Gram-pozitivní fakultativně anaerobní kok. Obě tyto bakterie, které jsou orálními patogeny a hrají výraznou roli v rozvoji zubního kazu, byly inkubovány s roztokem rutinu. Následně byla hodnocena inhibice jejich růstu. *P. gingivalis* byl inhibován rutinem pouze slabě (MIC > 1 mg/ml), avšak nárůst *S. mutans* byl zastaven již při nižších koncentracích (MIC = 0,25 mg/ml). Pro porovnání byl použit roztok chlorhexidinu, který má výrazně vyšší účinek (MIC_{*P.gingivalis*} = 0,0003 mg/ml a MIC_{*S.mutans*} = 0,0012 mg/ml). [19]

3.3.3.13 Antifungální účinky

Účinek rutinu proti původcům některých mykóz byl sledován na kultuře *Candida albicans* a *C. krusei*. Vzorke byly inkubovány s roztokem rutinu o různých koncentracích. Následně byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace a porovnány se standardy běžně užívanými v léčbě (ketokonazol, flukonazol). Rutin byl účinný proti oběma zástupcům, proti *C. krusei* byl dokonce více aktivní než flukonazol. [18]

3.3.3.14 Antivirové účinky

Pro ohodnocení antivirové aktivity rutinu byl použit *Herpes simplex* virus typ-1 (DNA-virus) a virus *Parainfluenzy-3* (RNA-virus). Rutin vykazoval aktivitu proti oběma virům, proti viru parainfluenzy byl srovnatelně aktivní s oseltamivirem. [18]

3.3.3.15 Antiprotozoární účinky

Plasmodium juxtannucleare je patogen, který často způsobuje malárii u kuřat. V experimentu jím byla infikována desetidenní kuřata. Po 35 dnech jim bylo podáno imunosupresivum methylprednison, který měl podpořit rozvoj infekce. Následně byl kuřatům podáván sondou do žaludku roztok rutinu nebo antimalarika chlorochinu. V průběhu infekce byl sledován pozitivní vliv chlorochinu, zatímco rutin nevykazoval žádné inhibiční účinky, počet plasmodií v krvi byl dokonce vyšší než u neléčené kontroly. [107]

3.3.3.16 Ovlivnění trávicího ústrojí

Na patogenezi žaludečního vředu a gastritidy se podílí i volné radikály a ROS. Mechanismus účinku zahrnuje peroxidaci lipidů, což vede k porušení membrán buněk a následnému uvolnění intracelulárního obsahu (např. lysosomálních enzymů). To dále

vede k poškození tkáně. Volné radikály také způsobují poškození mukózy a změny v buněčném metabolismu. Možnostmi, jak kontrolovat rozvoj ulcerace jsou proto stimulace syntézy mucinu v žaludku, podpora antioxidační ochrany žaludku a zhášení ROS. [108]

Poškození trávicího traktu je často vyvoláno podáváním nesteroidních antiflogistik (NSAID). Vliv rutinu na gastropatii, která byla vyvolána perorálním podáváním indometacinu, byl sledován na potkanech. Ulcerace, ke kterým při podávání těchto látek dochází, jsou spojeny se zvýšením kyselosti žaludku a především se snížením tvorby prostaglandinů. Dále dochází ke zvýšení tvorby prozánětlivých cytokinů v mukóze žaludku a ROS a ke zvýšení peroxidace lipidů. Je usnadněna infiltrace neutrofilů, hladina cytoprotektivních nitrit/nitrátů klesá. Rutin (200 mg/kg), který byl podán zvířatům hodinu před podáním indometacinu, zabránil většině těchto příznaků. V žaludeční tkáni bylo nalezeno méně hemorhagických lézí a ulcerací než ve skupině bez rutinu. Došlo také k redukci infiltrace leukocytů. Hladina nitrit/nitrátů a aktivita myeloperoxidasy, které byly podáním indometacinu ovlivněny, byly ve skupině s rutinem navráceny k hodnotám srovnatelným s kontrolou. Hladiny ukazatelů oxidačního stresu byly pomocí rutinu sníženy. Kyselá reakce žaludečního obsahu, kterou indometacin zvýšil, nebyla podáním rutinu nijak ovlivněna.

Bylo tak prokázáno, že rutin má jisté ochranné účinky proti gastropatii vyvolané indometacinem. Mechanismem účinku je zřejmě inhibice infiltrace neutrofilů, potlačení oxidačního stresu a zvýšení hladin nitrit/nitrátů bez ohledu na ovlivnění kyselosti žaludku. [109]

V další studii byla ulcerace žaludku potkanů vyvolána podáváním ethanolu, kyseliny octové nebo stresem. Ochranný vliv nízkých dávek rutinu (20-80 mg/kg) byl porovnáván s účinky cimetidinu. Obě látky byly podávány hodinu po zahájení ulcerace, za další hodinu byly pozorovány výsledky. Rutin už v dávkách 20 mg/kg působil významně gastroprotektivně, v některých případech srovnatelně jako cimetidin. Po dávce 80 mg/kg rutinu se žaludek podobal kontrolní skupině. Rutin snižoval hladiny malondialdehydu, což naznačuje, že gastroprotektivní účinky jsou spojeny s ochranou před volnými radikály a následně peroxidací lipidů. [108]

3.3.3.17 Ovlivnění hyperurikémie a dny

Hyperurikémie, zvýšená hladina kyseliny močové, je rizikový faktor pro rozvoj dny. Dochází k ní zvýšením produkce kyseliny močové v těle nebo snížením její exkrece, případně kombinací obou vlivů. Na jejím metabolismu se podílí xantinoxidasa, která oxiduje hypoxanthin a xanthin právě na kyselinu močovou. Inhibitory tohoto enzymu, například allopurinol, se proto používají k normalizaci hladiny této látky.

Jako možný inhibitor xanthinoxidasy byl zkoušen také rutin. V *in vitro* pokusu neměl žádný vliv na aktivitu enzymu. V *in vivo* studii byly použity myši, u kterých byla uměle vyvolána hyperurikémie. Sérová hladina kyseliny močové těchto myší po podání rutinu (75 a 300 mg/kg) mírně klesla, avšak ve srovnání s kontrolou (či s účinkem allopurinolu) zůstala stále vysoká. Po podání 150 mg/kg rutinu se výsledky nelišily od neléčených myší. Podání rutinu zdravým myším vedlo dokonce ke zvýšení hladiny kyseliny močové oproti neléčené kontrole.

Sledována byla také aktivita xanthinoxidasy. U normálních myší po podání rutinu stoupla aktivita sérové xanthinoxidasy, jaterní nebyla ovlivněna. U myší s hyperurikémií byl pozorován pokles aktivity jaterního enzymu, zatímco sérový ovlivněn nebyl. K ohodnocení vlivu na renální funkce byly měřeny hladiny kreatininu, které v obou skupinách po podání rutinu klesly. Rutin tedy neovlivňuje exkreci kyseliny močové a naopak její sérové hladiny zvyšuje, a proto není vhodný pro léčbu hyperurikémie. [110]

3.3.3.18 Ovlivnění močového ústrojí

Léčba alkylujícím cytostatikem cyklofosfamidem bývá spojena s řadou nežádoucích účinků. Jde především o urotoxicitu. Metabolit cyklofosfamidu, akrolein, je zodpovědný za poškození močového epitelu. Interferuje s tkáňovým antioxidačním systémem, produkuje ROS a působí mutagenně. Poškození mukózy močového měchýře se může projevovat jako hemorhagická cystitida spojená s hematurií a zvýšenou dráždivostí měchýře. Dalšími příčinami mohou být infekce močových cest nebo ozařování v pánevní oblasti.

Poškození močového měchýře u myši bylo vyvoláno právě podáním cyklofosfamidu. Před a po jeho podání dostala zvířata *p.o.* rutin (10 a 20 mg/kg) a sledoval se jeho protektivní vliv. Protože akrolein aktivuje některé sensorické neurony a působí krutou akutní bolest, byly hodnoceny reakce myši na tyto příznaky. Rutin však viscerální bolest nezmiřňoval. Nepůsobil ani změny v motorice zvířat. Cyklofosfamid také aktivuje některé transkripční faktory (NF- κ B, AP-1), indukuje produkci některých mediátorů zánětu (cytokiny, volné radikály, prostanoidy, NO), což vede k rozvoji zánětu a často i ke krvácení. Ve skupině, která dostávala rutin, byly příznaky zánětu výrazně zmírněny. Rutin zmiřňoval celkové makroskopické příznaky poškození močového měchýře, došlo ke snížení otoku a potlačení krvácení. Pozitivní účinky rutinu byly podobné účinkům mesny, která bývá použita jako ochrana močového ústrojí při podávání cyklofosfamidu. [111]

Nefrotoxicita je hlavním nežádoucím účinkem dalšího cytostatika cisplatiny. Po jejím podávání potkanům bylo pozorováno výrazné překrvení glomerulů a peritubulární části ledvin, spojené s infiltrací buněk podílejících se na zánětlivé reakci. Cisplatina způsobila nekrózu tubulů a poškození dalších částí. Předchozí perorální podávání rutinu těmto změnám výrazně zabránilo, v dávce 150 mg/kg byl histologický obraz ledvin podobný kontrolnímu. [55]

Častou zdravotní komplikací v močových cestách je tvorba močových kamenů. Hlavním rizikovým faktorem pro vznik oxalátových kamenů je hyperoxalurie. Ta byla u potkanů vyvolána podáváním ethylenglykolu a chloridu amonného. Současně byl podáván rutin a byl sledován jeho vliv na močové cesty. Zvířata, u kterých byl indukován vznik kamenů, tvořila větší množství moči, než skupina kontrolní. Podávání rutinu objem moči snižovalo, i když zůstával stále vyšší než u skupiny kontrolní. V ledvinách a moči neléčených zvířat bylo nalezeno zvýšené množství oxalátu a vápníku, ve všech částech ledvin docházelo k usazování kamenů. Rutin snižoval obsah obou látek, stejně jako množství i velikost uložených kamenů. Zabraňoval také peroxidaci lipidů, která se vyskytovala při ukládání krystalů. Ovlivněny byly také renální funkce, bez rutinu došlo ke zvýšení sérového kreatininu. Vznik kamenů byl doprovázen fibrosou intersticia ledvin spolu s infiltrací eosinofilů. Zvířata, která dostávala rutin, vykazovala minimální histologické změny ledvin. Rutin tedy prokázal své pozitivní vlastnosti při prevenci tvorby oxalátových močových kamenů. [112]

Dalším poškozením ledvin je diabetická nefropatie, jejíž hlavní příčinou je hyperglykémie. Jedním z důležitých faktorů zapojených do patogeneze tohoto

poškození je oxidační stres. V *in vitro* experimentu byly použity kultury mezangiálních buněk, které byly ovlivňovány vysokou koncentrací glukózy. Rutin byl použit k ochraně těchto buněk. Bylo pozorováno, že rutin inhiboval hromadění extracelulární matrix a hypertrofii buněk, která souvisela se zastavením buněčného cyklu vlivem glukózy. Výsledky tak napovídají, že rutin může zpomalit rozvoj glomerulosklerózy při diabetické nefropatii. [113]

V další studii bylo poškození ledvin u potkanů vyvoláno *i.p.* podáváním CCl₄. Den po jeho aplikaci byl *p.o.* podán roztok rutinu. Vystavení působení CCl₄ vede k řadě nežádoucích účinků: peroxidaci lipidů, snížení obsahu proteinů, snížení aktivity některých antioxidačních enzymů (superoxiddismutasy, katalasy, peroxidasy a jiných). Ovlivněny jsou také pH moči, sérové hladiny kreatininu, albuminů a bilirubinu. Dochází k oxidačnímu poškození proteinů a jejich akumulaci v ledvinách, což vede k poruše jejich metabolických funkcí. Dále dochází k infiltraci buněk. To vede ke zvětšování ledvin a nárůstu jejich hmotnosti. Pozorovány byly i další morfologické změny, jako je intersticiální fibrosa, degenerace glomerulů a tubulů a infiltrace mononukleárů do intersticia. Objevuje se vasokonstrikce, což vede k ischemii a poškození buněk, následně až k nekróze tubulů. U zvířat, která dostávala rutin, bylo poškození ledvin mnohem menší, stav proteinů se vrátil k normálu. CCl₄ ovlivnil oxidační obranný systém zvířat, poklesla aktivita sledovaných antioxidačních enzymů. Po působení rutinu byly aktivity těchto enzymů opět vyšší. [114]

3.3.3.19 Příjem ethanolu

Konzumace ethanolu vede ke vzniku některých zdravotních komplikací, neboť při metabolismu této látky vznikají volné radikály. Potkanům byl dlouhodobě podáván ethanol a byl sledován ochranný vliv rutinu proti hepatotoxicitě. Ethanol byl zvířatům podáván po 60 dní, posledních 30 dní byl navíc *p.o.* podáván rutin. Byly sledovány hladiny a aktivity některých enzymů, k jejichž uvolnění do séra dochází po poškození buněk. Zvýšená hladina sérové transaminasy a vyšší aktivita sérové alkalické fosfatasy a γ -glutamyltranspeptidasy ukazovaly na zvýšenou permeabilitu až možnou nekrózu hepatocytů. U zvířat, kterým byl podáván rutin, byly hladiny sledovaných enzymů v normě. Vznikající volné radikály poškozovaly také membránové lipidy, což se

projevilo zvýšenými hladinami reaktivních sloučenin thiobarbiturové kyseliny, konjugovaných dienů a hydroperoxidů lipidů. Rutin poškození membrán bránil a sledované hodnoty byly v normálu stejně jako aktivity endogenních antioxidantů (superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa). Rutin tak bránil hepatotoxicitě ethanolu. [115]

3.3.3.20 Vliv na metabolismus jiných látek

Rutin a jeho metabolity mohou ovlivňovat metabolismus jiných, současně podaných látek. Po podání flavonoidu potkanům bylo pozorováno například zvýšení aktivity cytochromu P-450 3A4, v *in vitro* studii pak P-glykoproteinu. Ty se podílí na metabolismu a transportu řady látek. To je zřejmě důvod snížení biodostupnosti cyklosporinu, který byl podáván potkanům společně s rutinem. Cyklosporin je imunosupresivum s poměrně úzkým terapeutickým oknem. Sérové hladiny vyšší než terapeutické tak mohou vést k nefrotoxicitě, hepatotoxicitě či neurotoxicitě. Naopak nižší hladiny mohou zapříčinit odmítnutí transplantovaného štěpu. Proto by se měla věnovat pozornost současně užívaným lékům, jejichž hladiny mohou být díky rutinu pozměněny. [116]

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál, chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Vzorky

Instantní pohankové vločky (Arax National s.r.o., Hostivice, ČR)

Pohanková mouka hladká GMO-free (PRO-BIO obch. spol. s r.o., Staré Město pod Sněžníkem, ČR)

Pohankové lupínky BIO (Semix pluso s.r.o., Otice, ČR)

Sušená nať Fagopyrum esculentum (Botanická zahrada léčivých rostlin, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, ČR)

Sušené nažky pohanky (Pohanka neloupaná; PRO-BIO obch. spol. s r.o., Staré Město pod Sněžníkem, ČR)

4.1.2 Použité chemikálie

Acetonitril (Lachema, ČR)

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Hyperosid (Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Německo)

Methanol p.a. (Penta Chrudim, ČR)

Rutin (Carl Roth GMBH, Karlsruhe, Německo (metoda DPPH); Sigma, St. Louis, MO, USA (HPLC analýza))

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Kern, Německo)

Dvoupaprskový spektrofotometr (Shimadzu, Japonsko)

HPLC kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) a předkolonka (Merck, Německo)

HPLC sestava – čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055(Jasco,
Velká Británie)

Laboratorní síta (Retsch, Německo)

Mlýnek (Bosch, Německo)

Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex, Německo)

4.2 Příprava vzorků

Nať *Fagopyrum esculentum* byla sušena při laboratorní teplotě. Část pohankových nažek byla použita v celku, zbytek byl zbaven osemení. Nažky byly tlakem rozrušeny a následně byly pomocí soustavy sít odděleny slupky. Všechny vzorky byly upráškovány na jemno a nevyhovující částice byly odstraněny pomocí síta s velikostí ok 355 μm .

4.3 Stanovení antioxidační aktivity

Roztok DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl)

0,0501 g DPPH se za pomoci ultrazvukové lázně rozpustilo v 50,0 ml methanolu. Hotový roztok o koncentraci 2,5 mmol/l byl uchováván v chladu a temnu.

Extrakce vzorků

K navážce práškovaného vzorku se přidalo 50,0 ml methanolu. Směs byla umístěna na 30 minut do ultrazvukové lázně, poté zfiltrována přes filtrační papír a doplněna methanolem do 50,0 ml odměrné baňky. Takto vzniklý extrakt byl připraven k reakci s DPPH. V případě pohankové nati byl odebrán 1 ml výchozího extraktu a v 10,0 ml odměrné baňce doplněn methanolem.

Reakce s DPPH

Do 5,0 ml odměrných baněk se postupně přidávalo rostoucí množství extraktu, 0,2 ml roztoku DPPH a methanol do doplnění objemu. Po promíchání se baňky nechaly 30 minut stát při laboratorní teplotě ve tmě.

Následně byla měřena absorbance.

Slepý vzorek

0,2 ml roztoku DPPH bylo doplněno methanolem do 5,0 ml. Slepý vzorek se inkuboval za stejných podmínek jako vzorky pohanky.

Měření absorpance

Absorbance vzorků pohanky a slepého vzorku se měřila při 517 nm proti methanolu. Z naměřených hodnot se vypočítalo, kolik procent DPPH se redukovalo při daných koncentracích extraktu. Následně byla určena hodnota IC₅₀, která udává koncentraci extraktu, která způsobí redukci 50% DPPH.

Z každého vzorku byla provedena tři stanovení.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1-9 a grafech 1-9.

Vzorec pro výpočet procent inhibice DPPH

$$\% = (1 - A_{vz}/A_{sl}) \times 100$$

A_{vz} – absorbance roztoků obsahujících extrakt

A_{sl} – absorbance slepého vzorku

Standardy

Použit byl methanolvý roztok rutinu o koncentraci 0,1 mg/ml (0,16 mmol/l) a roztok hyperosidu o koncentraci 0,1 mg/ml (0,22 mmol/l).

4.4 HPLC stanovení obsahu rutinu dle ČL 2009

Zkouška byla provedena dle článku *Fagopyri herba*, Stanovení obsahu.

Zkoušený roztok

0,500 g práškovaného vzorku se promíchalo s 30 ml roztoku methanolu R 80% (V/V) a zahřívalo se 30 minut ve vodní lázni při 60°C. Pak se směs extrahovala 15 minut v ultrazvukové lázni. Po ochlazení se zředila roztokem methanolu R 80% (V/V) na 50,0 ml a zfiltrovala se. [117]

HPLC-UV analýza

Složení mobilní fáze: A – 5% acetonitril + 0,15% H₃PO₃ ve vodě

B – 100% acetonitril

Eluce mobilní fáze probíhala prvních 6 minut izokraticky, dále gradientově, podle tabulky:

čas (min)	% mobilní fáze A	% mobilní fáze B
0	96	4
6	96	4
16,5	80	20
22	65	35
23	60	40

Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min.

Teplota kolony byla 25°C.

Nastříkovaný objem vzorku byl 20 µl.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 – 450 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 350 nm. Obsah rutinu byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu těže látky.

Z každého vzorku byla provedena dvě stanovení.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11.

4.5 Výsledky

4.5.1 Tabulky

4.5.1.1 Stanovení antioxidační aktivity

Tabulka 1 – Antioxidační aktivita nati *Fagopyrum esculentum*

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (0,5008g)		2. navážka (0,5001g)		3. navážka (0,5001g)		průměr
	A _{sl} =1,160		A _{sl} =1,011		A _{sl} =1,054		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
0,002	0,995	14,22	0,910	9,99	0,909	13,76	12,66
0,004	0,881	24,05	0,754	25,42	0,819	22,30	23,92
0,006	0,885	23,71	0,698	30,96	0,676	35,86	30,18
0,008	0,791	31,81	0,582	42,43	0,609	42,22	38,82
0,010	0,719	38,02	0,524	48,17	0,520	50,66	45,62
0,012	0,646	44,31	0,422	58,26	0,392	62,81	55,13
0,014	0,614	47,07	0,423	58,16	0,350	66,79	57,34
0,016	0,571	50,78	0,291	71,22	0,271	74,29	65,43
0,018	0,530	54,31	0,214	78,86	0,178	83,11	72,09
0,02	0,478	58,79	0,159	84,27	0,133	87,38	76,81
0,022	0,378	67,41	0,105	89,61	0,098	90,70	82,58
0,024	0,306	73,62	0,095	90,60	0,080	92,38	85,53
IC ₅₀ (mg/ml)	0,015		0,011		0,010		0,012

Tabulka 2 – Antioxidační aktivita celých nažek

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (0,9968g)		2. navážka (0,9984g)		3. navážka (1,0011g)		průměr
	A _{sl} =1,235		A _{sl} =1,441		A _{sl} =1,255		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
0,8	1,063	13,93	1,156	19,78	0,975	22,31	18,67
1,2	0,859	30,45	1,004	30,33	0,890	29,08	29,95
1,6	0,802	35,06	0,900	37,54	0,786	37,37	36,66
2,0	0,712	42,35	0,909	36,92	0,699	44,30	41,19
2,4	0,643	47,94	0,866	39,9	0,616	50,92	46,25
2,6	0,650	47,37	0,772	46,43	0,539	57,05	50,28
2,8	0,562	54,49	0,757	47,47	0,539	57,05	53,00
3,2	0,464	62,43	0,692	51,98	0,496	60,48	58,30
3,6	0,391	68,34	0,622	56,84	0,458	63,51	62,90
4,0	0,325	73,68	0,554	61,55	0,399	68,21	67,81
4,4	0,291	76,44	0,291	79,81	0,355	71,71	75,99
4,8	0,267	78,38	0,229	84,11	0,261	79,2	80,56
5,2	0,332	73,12	0,167	88,41	0,253	79,84	80,46
5,6	0,287	76,76	0,313	78,28	0,230	81,67	78,90
IC ₅₀ (mg/ml)	2,71		2,85		2,56		2,71

Tabulka 3 – Antioxidační aktivita loupaných nažek

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (0,9995g)		2. navážka (1,0001g)		3. navážka (0,9999g)		průměr
	A _{sl} =1,128		A _{sl} =1,450		A _{sl} =1,450		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
1,2	0,858	23,94	1,205	16,90	1,138	21,52	20,79
1,6	0,741	34,31	1,112	23,31	1,037	28,48	28,70
2,0	0,629	44,24	0,932	35,72	0,984	32,14	37,37
2,4	0,573	49,20	0,890	38,62	0,845	41,72	43,18
2,8	0,486	56,91	0,716	50,62	0,813	43,93	50,49
3,2	0,457	59,49	0,695	52,07	0,720	50,34	53,97
3,6	0,416	63,12	0,599	58,69	0,676	53,38	58,40
4,0	0,377	66,58	0,581	59,93	0,605	58,28	61,60
4,4	0,274	75,71	0,494	65,93	0,563	61,17	67,60
4,8	0,223	80,23	0,461	68,21	0,476	67,17	71,87
5,6	0,153	86,44	0,358	75,31	0,432	70,21	77,32
6,0	0,135	88,03	0,274	81,10	0,383	73,59	80,91
IC ₅₀ (mg/ml)	2,64		3,30		3,45		3,11

Tabulka 4 – Antioxidační aktivita osemení nažek

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (3,0002g)		2. navážka (2,9995g)		3. navážka (2,9995g)		průměr
	A _{sl} =1,105		A _{sl} =1,078		A _{sl} =1,234		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
2,4	0,864	21,81	0,932	13,54	1,022	17,18	17,51
3,6	0,739	33,12	0,815	24,40	0,950	23,01	26,84
4,8	0,659	40,36	0,767	28,85	0,761	38,31	35,84
6,0	0,576	47,87	0,612	43,19	0,680	44,90	45,32
6,6	0,523	52,67	0,485	55,01	0,611	50,49	52,72
7,2	0,473	57,19	0,444	58,81	0,507	58,91	58,30
7,8	0,425	61,54	0,427	60,39	0,474	61,59	61,17
8,4	0,386	65,07	0,388	64,01	0,441	64,26	64,45
9,6	0,326	70,50	0,304	71,80	0,310	74,88	72,39
10,8	0,284	74,30	0,243	77,46	0,267	78,36	76,71
12,0	0,229	79,28	0,179	83,40	0,219	82,25	81,64
14,4	0,187	83,08	0,128	88,13	0,144	88,33	86,51
IC ₅₀ (mg/ml)	6,43		6,93		6,72		6,71

Tabulka 5 – Antioxidační aktivita pohankových lupinků

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (5,0013g)		2. navážka (7,9969g)		3. navážka (7,9958g)		průměr
	A _{sl} =1,098		A _{sl} =1,172		A _{sl} =1,202		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
6,4	0,928	15,48	0,945	19,37	0,926	22,96	19,27
9,6	0,800	27,14	0,940	19,80	0,858	28,62	25,19
12,8	0,727	33,79	0,883	24,66	0,777	35,36	31,27
16	0,630	42,62	0,767	34,56	0,679	43,51	40,23
19,2	0,585	46,72	0,717	38,82	0,583	51,50	45,68
22,4	0,470	57,19	0,627	46,53	0,497	58,65	54,12
25,6	0,423	61,51	0,578	50,68	0,457	61,98	58,06
28,8	0,381	65,28	0,509	56,57	0,343	71,46	64,44
32	0,303	72,40	0,444	62,12	0,339	71,80	68,77
38,4	0,201	81,69	0,342	70,82	0,240	80,03	77,51
44,8	0,127	88,42	0,250	78,67	0,147	87,77	84,95
51,2	0,055	94,98	0,144	87,71	0,120	90,02	90,90
IC ₅₀ (mg/ml)	21,45		26,11		20,12		22,55

Tabulka 6 – Antioxidační aktivita instantních pohankových vloček

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (5,0007g)		2. navážka (5,0007g)		3. navážka (5,0010g)		průměr
	A _{sl} =1,041		A _{sl} =1,125		A _{sl} =1,144		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
4	0,908	12,78	0,936	16,80	0,884	22,73	17,44
8	0,745	28,43	0,764	32,09	0,749	34,53	31,68
12	0,615	40,92	0,643	42,84	0,685	40,12	41,29
14	0,599	42,46	0,574	48,98	0,623	45,54	45,66
16	0,510	51,01	0,535	52,44	0,539	52,88	52,11
18	0,488	53,12	0,448	60,18	0,466	59,27	57,52
20	0,433	58,41	0,440	60,89	0,429	62,50	60,60
22	0,369	64,55	0,363	67,73	0,374	67,31	66,53
24	0,333	68,01	0,346	69,24	0,314	72,55	69,93
28	0,234	77,52	0,232	79,38	0,248	78,32	78,41
32	0,207	80,12	0,226	79,91	0,169	85,23	81,75
IC ₅₀ (mg/ml)	16,98		15,60		15,19		15,94

Tabulka 7 – Antioxidační aktivita pohankové mouky

koncentrace extraktu vzorku (mg/ml)	1. navážka (2,0049g)		2. navážka (2,0049g)		3. navážka (2,0038g)		průměr
	A _{sl} =1,068		A _{sl} =1,142		A _{sl} =1,170		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
0,8	0,920	13,86	0,933	18,30	0,946	19,15	17,10
1,6	0,778	27,15	0,811	28,98	0,803	31,37	29,17
2,4	0,701	34,36	0,721	36,87	0,692	40,85	37,36
3,2	0,613	42,60	0,626	45,18	0,644	44,96	44,25
4,0	0,519	51,40	0,549	51,93	0,571	51,20	51,51
4,8	0,453	57,58	0,481	57,88	0,477	59,23	58,23
5,6	0,376	64,79	0,411	64,01	0,415	64,53	64,44
6,4	0,330	69,10	0,349	69,44	0,339	71,03	69,86
7,2	0,271	74,63	0,299	73,82	0,273	76,67	75,04
8,0	0,257	75,94	0,245	78,55	0,233	80,09	78,19
9,6	0,157	85,30	0,158	86,16	0,176	84,96	85,47
IC ₅₀ (mg/ml)	4,34		4,15		3,98		4,16

Tabulka 8 – Antioxidační aktivita standardů – hyperosid a rutin

koncentrace roztoku (mg/ml)	hyperosid		rutin	
	$A_{s1}=1,115$		$A_{s1}=1,143$	
	A	% inhibice DPPH	A	% inhibice DPPH
0,002	0,864	22,51	0,958	16,19
0,003	0,751	32,65	0,814	28,78
0,004	0,578	48,16	0,677	40,77
0,005	0,408	63,41	0,532	53,46
0,006	0,309	72,29	0,438	61,68
0,007	0,190	82,96	0,273	76,12
0,008	0,110	90,13	0,199	82,59
0,009	0,062	94,44	0,114	90,03
0,01	0,048	95,70	0,081	92,91
IC_{50} (mg/ml)	0,0041		0,0047	

Tabulka 9 - Porovnání hodnot IC_{50} vzorků a standardů

Pohanka	hyperosid	rutin	nař	celé nažky	loupané nažky	mouka	osemení nažek	instantní vločky	lupinky
průměrná hodnota IC_{50} (mg/ml)	0,0041	0,0047	0,012	2,71	3,11	4,16	6,71	15,94	22,55

Poznámka:

Hodnoty koncentrací methanolových extraktů vyjadřují množství vzorku v mg, ze kterého vznikne používané množství extraktu. Hodnota vyjadřuje konečnou koncentraci v reakční směsi (v 5,0 ml odměrné baňce) při měření absorbance roztoku.

4.5.1.2 HPLC stanovení obsahu rutinu

Tabulka 10 – Obsah rutinu v nati a nažkách pohanky

vzorek	navážka (g)	obsah rutinu (%)
nat'	0,5006	4,93
	0,5002	4,78
celé nažky	0,5001	0,01
	0,5000	0,01
loupané nažky	0,5005	0,01
	0,5004	0,01
osemení nažek	0,5001	0,01
	0,5002	0,01

Tabulka 11 – Obsah rutinu ve výrobcích z nažek pohanky

vzorek	navážka (g)	obsah rutinu (%)
lupínky	0,5003	0,02
	0,5002	0,01
vločky	0,5002	0
	0,5003	0
mouka	0,4996	0,01
	0,5002	0,01

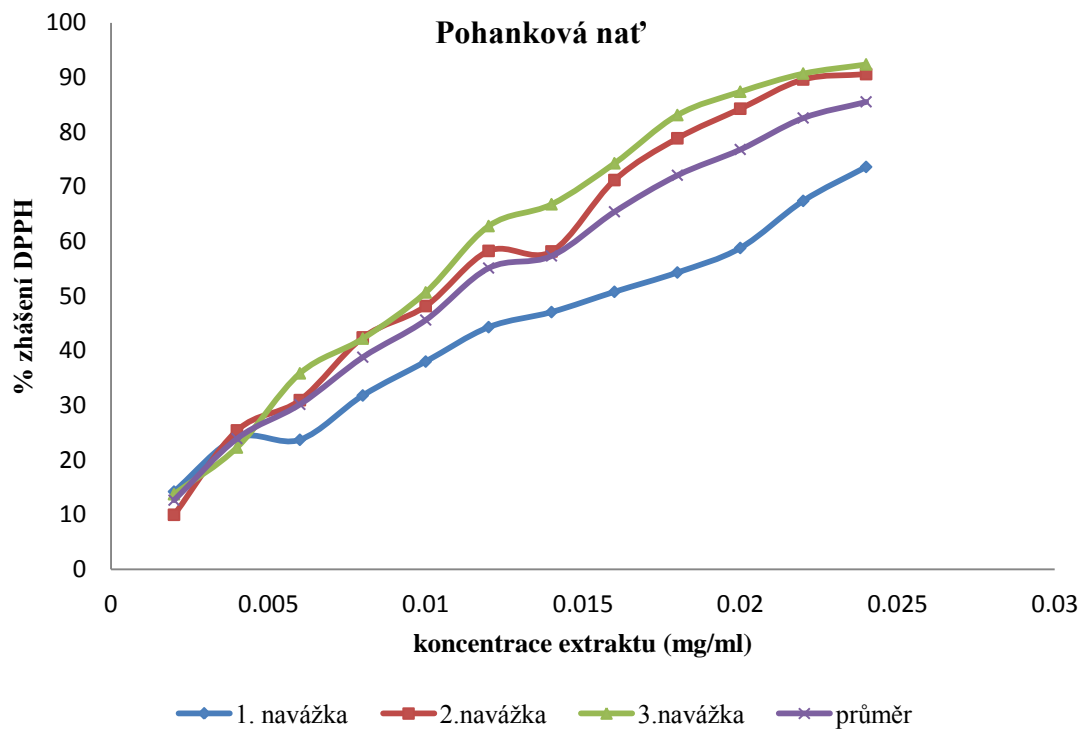
4.5.2 Grafy

4.5.2.1 Stanovení antioxidační aktivity

Hodnoty grafů vychází z příslušných tabulek. Grafy zobrazují hodnoty zhášení DPPH pro tři měření a hodnoty průměrné.

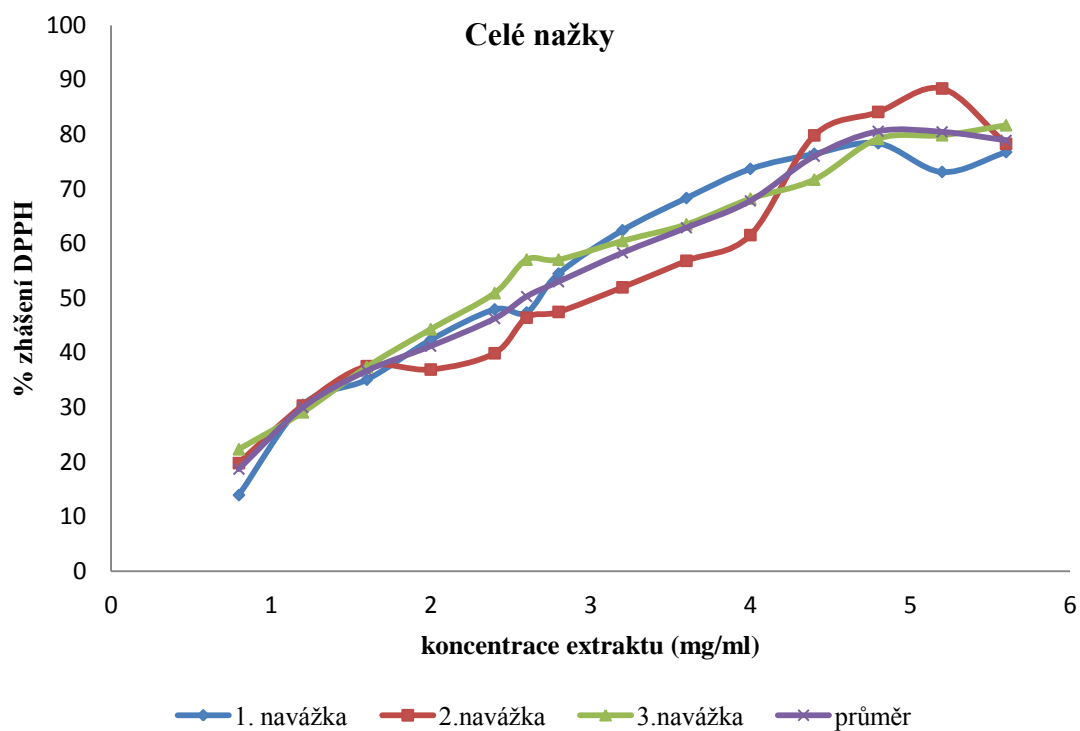
Graf 1 – Nať *Fagopyrum esculentum*

Hodnoty vychází z tabulky 1.



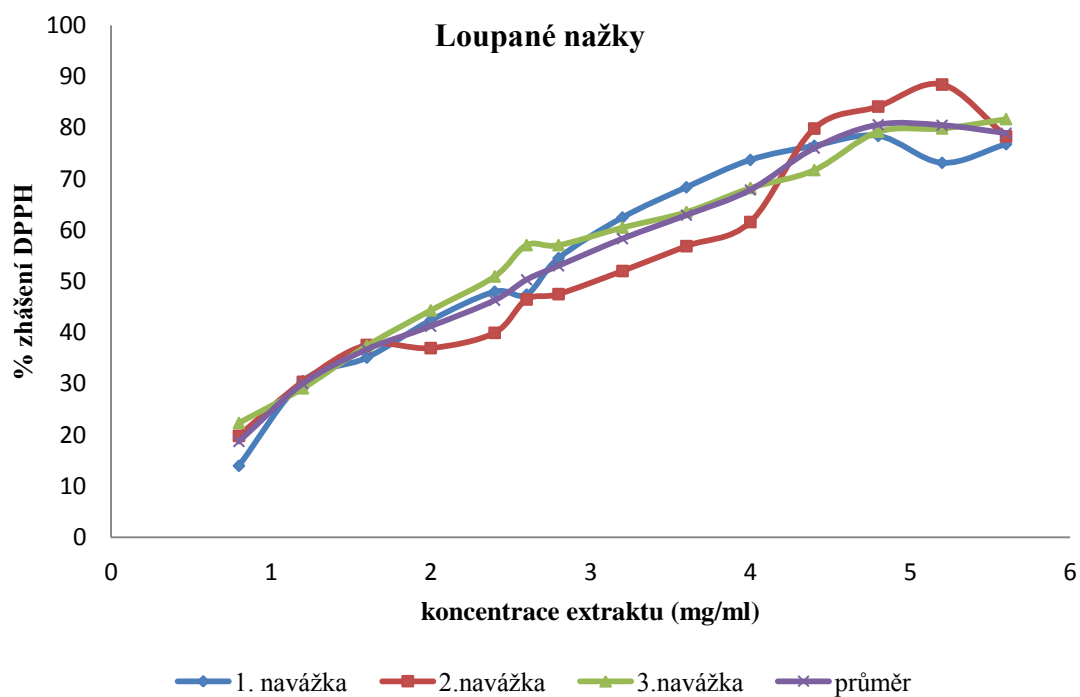
Graf 2 – Celé nažky *Fagopyrum esculentum*

Hodnoty vychází z tabulky 2.



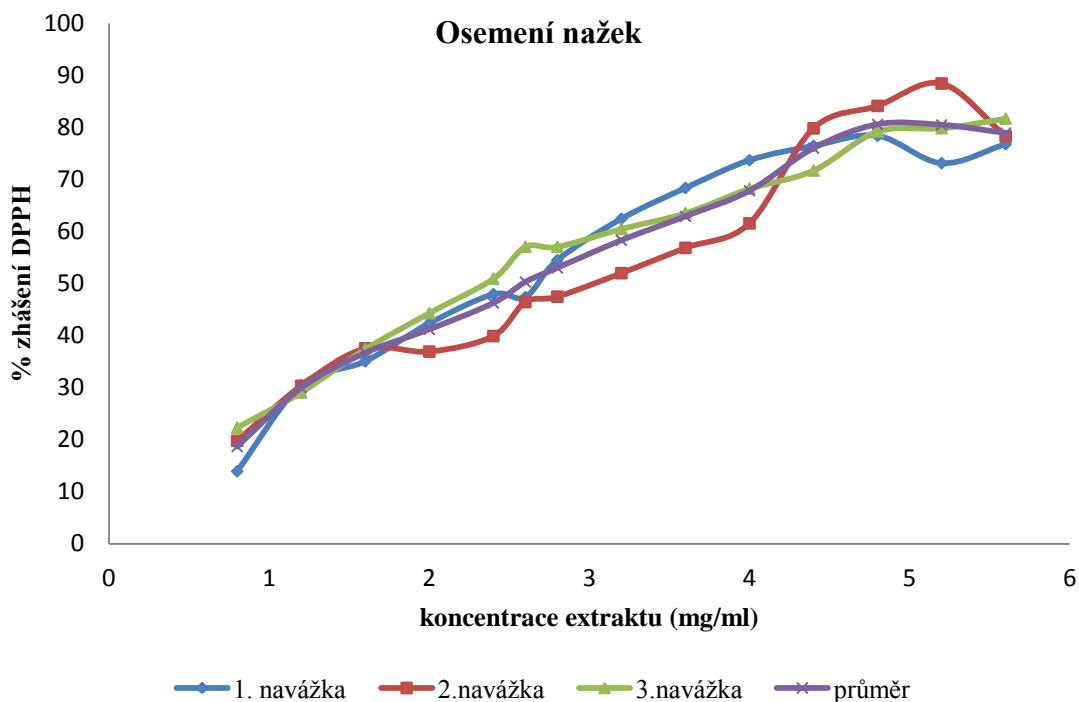
Graf 3 – Loupané nažky

Hodnoty vychází z tabulky 3.



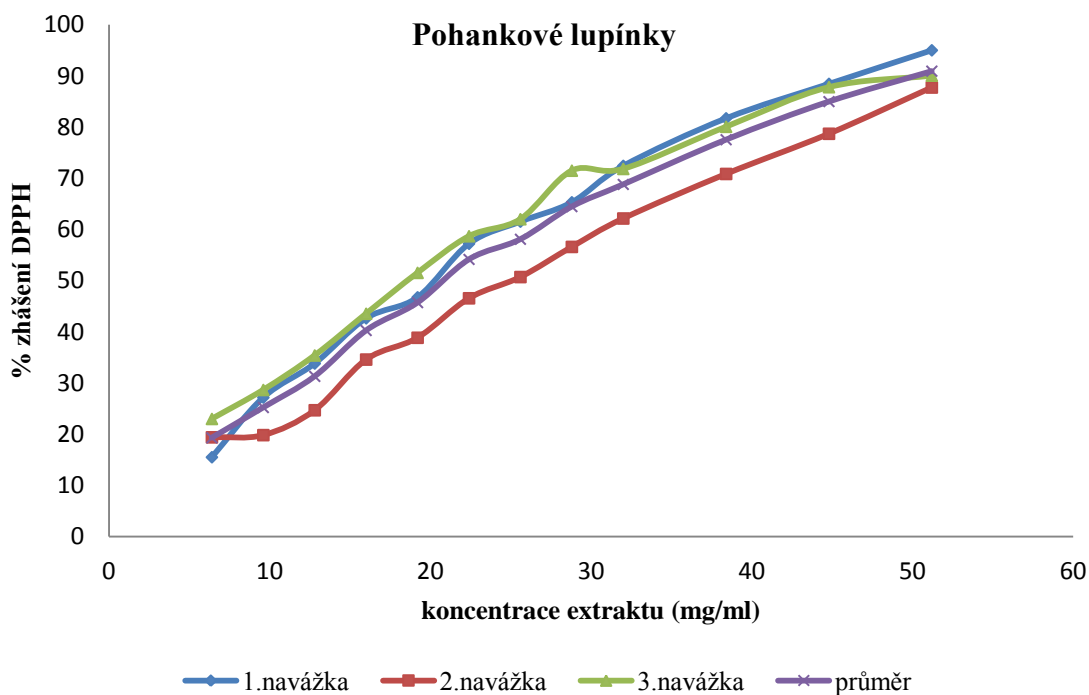
Graf 4 – Osemení nažek

Hodnoty vychází z tabulky 4.



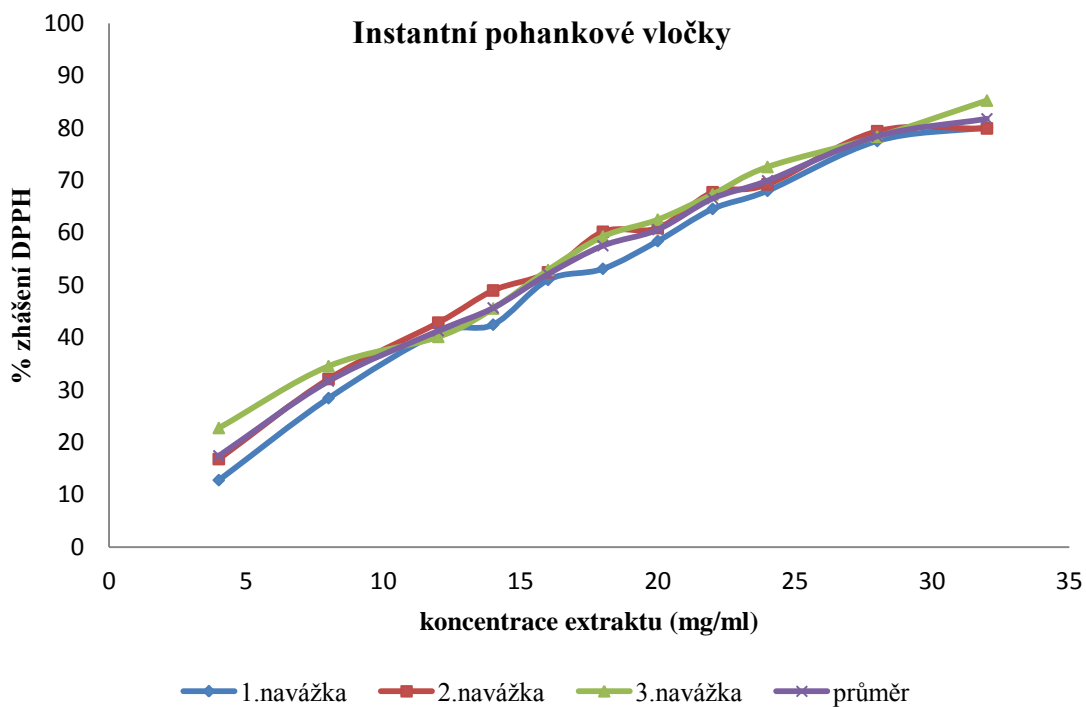
Graf 5 – Pohankové lupínky

Hodnoty vychází z tabulky 5.



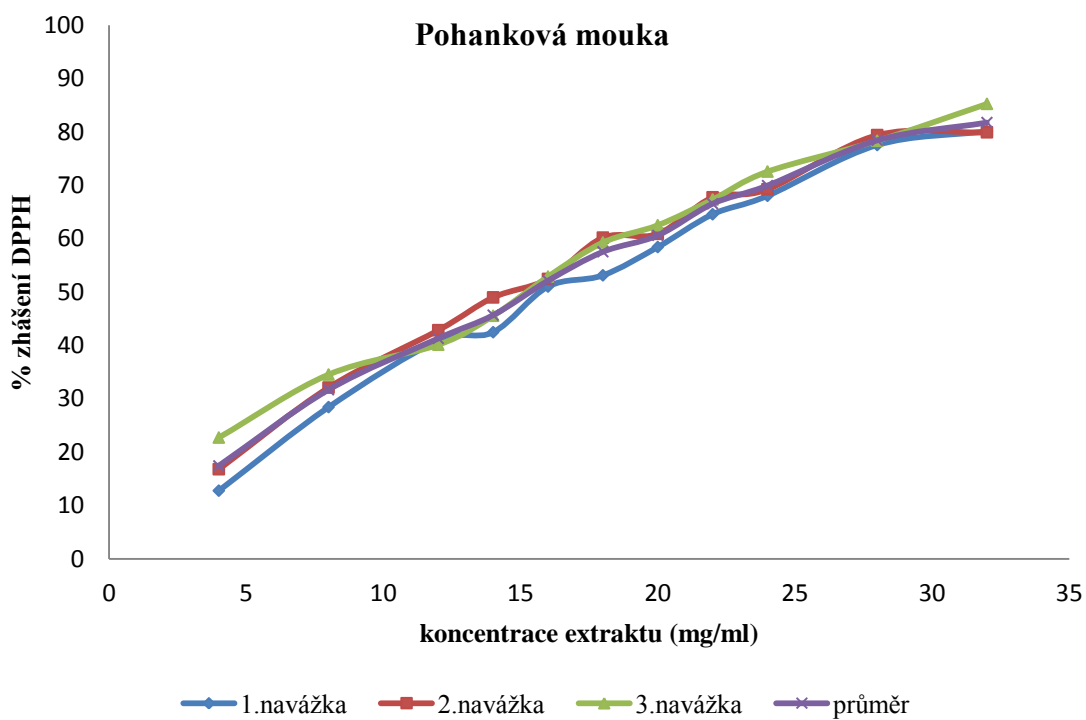
Graf 6 – Instantní pohankové vločky

Hodnoty vychází z tabulky 6.



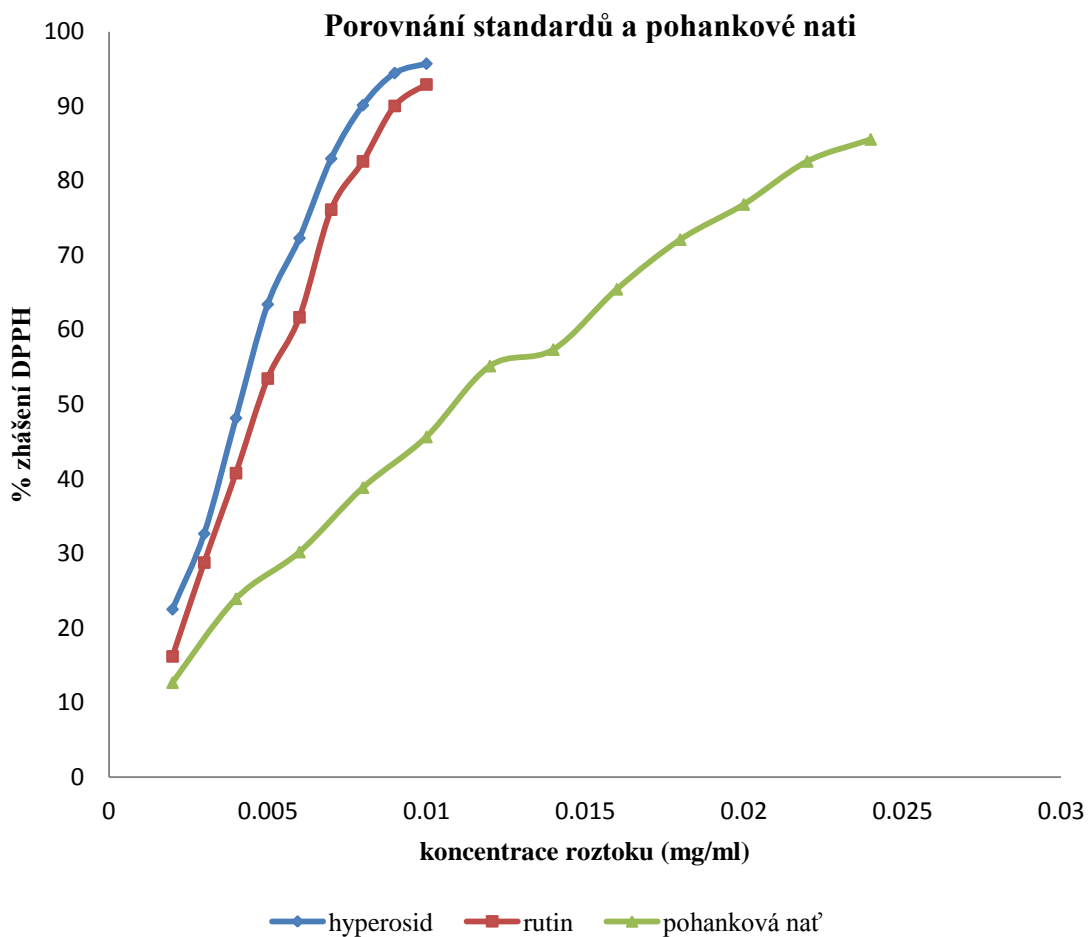
Graf 7 – Pohanková mouka

Hodnoty vychází z tabulky 7.



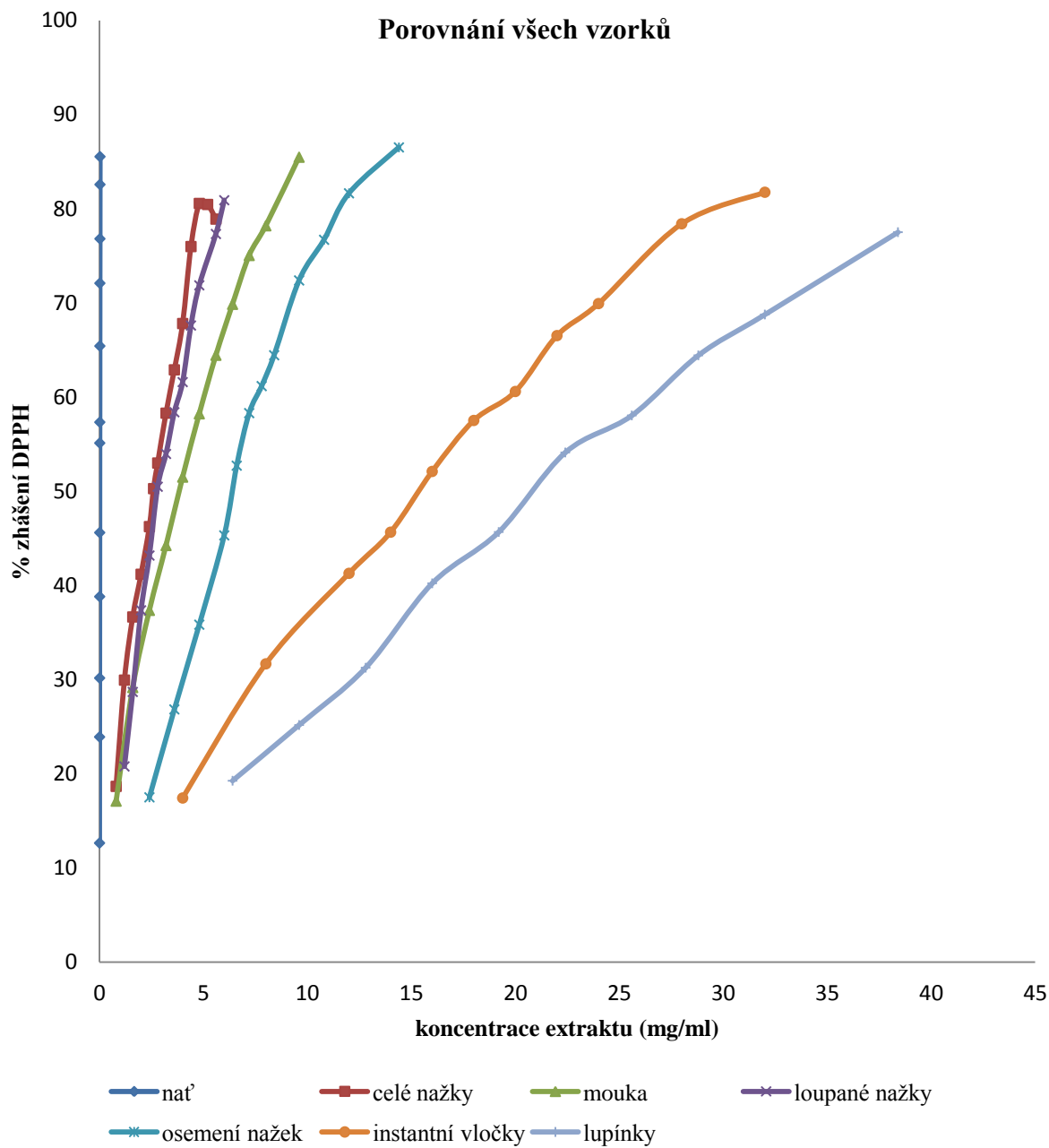
Graf 8 – Porovnání antioxidační aktivity standardů a pohankové nati

Hodnoty grafu vychází z tabulek 1 a 8. Graf zobrazuje průměrné hodnoty zhášení DPPH.



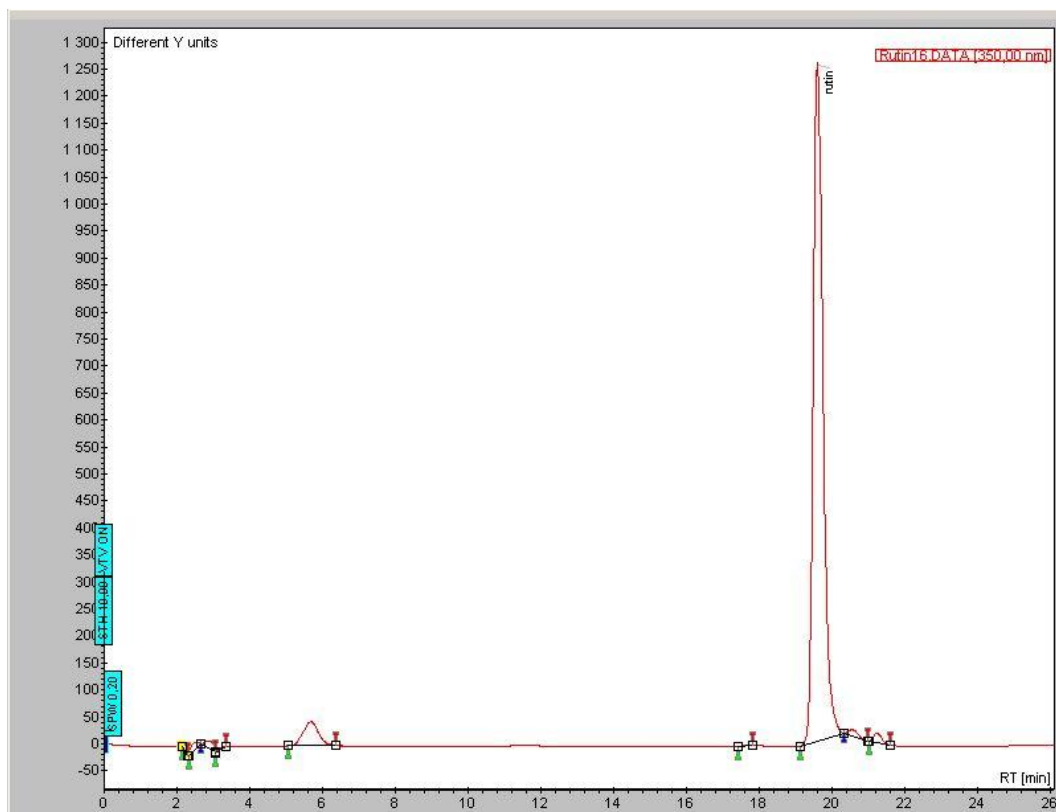
Graf 9 – Porovnání aktivit jednotlivých vzorků

Hodnoty grafu vychází z tabulek 1-7. Graf zobrazuje průměrné hodnoty zhašení DPPH pro jednotlivé vzorky.



4.5.2.2 HPLC stanovení obsahu rutinu

Chromatogram stanovení rutinu v pohankové nati



5 Výsledky a diskuze

Rod *Fagopyrum* obsahuje celou řadu významných látek. Mezi ně patří i flavonoidy, z nichž je nejčastěji zastoupen rutin. Nejvíce je ho v nati, a to jak ve *F. esculentum* tak i ve *F. tataricum*. [118] Množství rutinu ve vzorcích pohanky bylo stanoveno pomocí HPLC metody podle ČL 2009. Lékopis požaduje v droze Fagopyri herba obsah rutinu nejméně 4,0%, zkoumaná pohanková nať ho obsahovala poměrně vysoké množství (4,93 respektive 4,78%). Pohankové nažky i výrobky z nich už obsahovaly rutinu mnohem méně, jen 0,01%, v pohankových vločkách nebyl sledovaný flavonoid nalezen vůbec. Výrobce pohankových lupínků uvádí obsah rutinu 14,2 mg ve 100 g výrobku, což řádově souhlasí s naměřenými hodnotami (10 mg/100 g).

Výsledky měření se mohou lišit podle použité analytické metody a podmínek extrakce. Například při stanovení obsahu rutinu metodou HPLC-MS v některých částech rostliny *Fagopyrum esculentum* byly porovnány ethanolové a ethylacetátové extrakty. Použití ethanolu bylo výhodnější, neboť byl stanoven vyšší obsah rutinu. Nejvíce ho bylo obsaženo v celých nadzemních částech rostliny i s květy (188,5 mg/g extraktu), dále následovaly stonky (50,4 mg/g extraktu) a plody (21,0 mg/g extraktu). [118]

Obsah rutinu se mění v průběhu ontogeneze pohanky. Od začátku vývoje nové rostlinky hladina sledovaného flavonoidu stoupala. Čtyřdenní rostlina *Fagopyrum esculentum* obsahovala rutinou přibližně 1 mg/g suchého vzorku a po 30 dnech od vyklíčení vzrostlo toho množství na 7 mg/g. Nejvyšší obsah byl stanoven v květech (přibližně 10,5 mg/g). V plodech už bylo rutinu méně (0,5-1 mg/g). *Fagopyrum tataricum* obsahovala rutinou více, rozdíl byl výrazný hlavně u zralých plodů, ve kterých ho bylo nalezeno až 11 mg/g. [119]

Obsah rutinu se liší také podle klimatických podmínek a obsahu živin v půdě. Při porovnání obsahu flavonoidů v pohankových kroupách pocházejících z pohanky z běžného způsobu pěstování s ekologickým způsobem pěstování, obsahovaly pohankové kroupy průměrně 0,06 resp. 0,07 mg/g suchého vzorku. [120]

Množství obsahových látek se mění také při zpracování pohanky. Například zatímco syrové kroupy obsahovaly rutinou 0,20 mg/g suchého vzorku, po upražení klesl jeho obsah na 0,03 mg/g. [121] V další studii byl obsah rutinu v syrových kroupách 0,23 mg/g a v předvařených (100°C po 60 minut) 0,09 mg/g. Celé nažky obsahovaly

přibližně 0,18 mg/g suchého vzorku, tmavá pohanková mouka 0,22 mg/g rutinu, světlá mouka 0,11 mg/g, čerstvé nudle z pohankové a pšeničné mouky ho obsahovaly 0,08 mg/g. Čaj z loupáných pohankových krup obsahoval podle předpokladu podobné množství jako nažky, tedy 0,20 mg/g. Největší množství této látky bylo detekováno v listech (2,69 mg/g). Další produkty obsahují rutinu podstatně méně, pravděpodobně díky delšímu zpracování. Jde o pohankový med a ocet, které obsahují méně než 0,001 mg/g. [8]

Rutin je významný antioxidant a proto se dá předpokládat, že i pohanka, která ho obsahuje, bude vykazovat tyto účinky. Rutin má několik významných farmakologických účinků. Terapeuticky nejvíce využívaným je schopnost ovlivňovat lomivost a permeabilitu kapilár. Do mechanismu působení rutinu jsou zapojeny jeho antioxidantní vlastnosti. Antioxidantní aktivita vzorků byla hodnocena metodou zhášení radikálu DPPH. Metoda je založena na reakci antioxidantně působících látek s methanolem roztokem stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Redukce DPPH je doprovázena poklesem absorbance při charakteristické vlnové délce. Ve formě radikálu absorbuje DPPH při 517 nm, ale po redukci antioxidantem absorpce mizí. [122]

V této práci byla nejvíce aktivní pohanková nať, jejíž průměrná IC_{50} , koncentrace, která způsobí 50% redukci radikálu DPPH, byla na základě tří paralelních měření určena jako 0,12 mg/ml. Ostatní vzorky již byly aktivní výrazně méně. Jejich IC_{50} byly následující: celé pohankové nažky 2,71 mg/ml, loupané nažky 3,11 mg/ml, pohanková mouka 4,16 mg/ml, osemení nažek 6,71 mg/ml, pohankové vločky 15,94 mg/ml a pohankové lupínky 22,55 mg/ml. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 1-7 a grafech 1-7 a 9. Aktivity vzorků vůči radikálu DPPH byly srovnány s aktivitami některých standardů antioxidantů. IC_{50} rutinu byla 0,0047 mg/ml a hyperosidu 0,0041 mg/ml. V porovnání se standardy klesala zjištěná antioxidantní aktivita v pořadí: hyperosid > rutin > pohanková nať > celé pohankové nažky > loupané nažky > pohanková mouka > osemení nažek > pohankové vločky > pohankové lupínky. Výsledky antioxidantní aktivity extraktů vzorků porovnané s aktivitami standardů jsou uvedeny v tabulce 9 a grafu 8.

Zhášení radikálu DPPH je často používaná metoda. Při porovnání antioxidantní aktivity extraktů z některých částí rostliny *Fagopyrum esculentum* se jejich aktivita lišila dle použitého rozpouštědla. Nejvíce aktivní byl ethanolový (EtOH) extrakt stonků, následován ethylacetátovým (EtOAc) extraktem celé nadzemní části i s květy. Dále

aktivita klesala v pořadí: plody (EtOAc) > plody (EtOAc) > stonky (EtOAc) > celá nadzemní část (EtOH). U ethanolových extraktů tedy klesala aktivita takto: stonky > plody > celé nadzemní části. [118]

V dalším experimentu byly porovnávány antioxidační aktivity různě upravené pohankové mouky. Mouka z celých nažek byla při zhášení DPPH více aktivní než mouka z nažek loupaných. [123] I v mé práci byla aktivita celých nažek vyšší než u nažek loupaných.

Antioxidační aktivita může být ovlivněna také tepelným zpracováním vzorků. To bylo zjištěno při zahřívání mladých výhonků pohanky, kdy stoupl obsah fenolických látek, což se projevilo vzestupem antioxidační aktivity. [124] Naopak u pohankové mouky, na kterou se působilo teplotou 200°C po dobu 10 minut (jako při pečení), byla antioxidační aktivita mírně snížena ve srovnání s moukou zahřátou při zpracování v extrudéru. [125]

Obsah flavonoidů i antioxidační aktivita různých pohankových výrobků se liší podle výchozí suroviny a podmínek pěstování a zpracování na výsledný produkt. Vedle látek s výživovou hodnotou, kterými jsou proteiny, lipidy, škrob nebo některé vitamíny, je důležité zajistit i zachování obsahu flavonoidu rutinu, z důvodu zajištění příznivého vlivu pohanky na lidský organismus.

6 Závěr

Fagopyrum esculentum Moench a *Fagopyrum tataricum* Gaerth jsou zástupci rodu *Fagopyrum* nejčastěji používaní jako potraviny. Obsahují celou řadu nutričně hodnotných látek, jako jsou proteiny, vláknina, vitamíny, minerály a především flavonoidy, z nichž je nejvíce zastoupen rutin. Ten se používá pro své pozitivní účinky na lomivost a permeabilitu kapilár. Dále vykazuje účinky protizánětlivé, antikancerogenní, příznivě ovlivňuje hladinu glukózy v krvi při diabetu, brání oxidaci lipidů, čímž chrání buněčné membrány a má řadu dalších účinků, které mohou pozitivně ovlivnit zdravotní stav.

Obsah rutinu byl stanoven ve vzorcích pohanky metodou HPLC dle ČL 2009. Nejvíce rutin obsahuje pohanková nať (4,93 respektive 4,78%). Pohankové nažky celé, loupané, slupky nažek, pohanková mouka a lupínky obsahovaly pouze 0,01% tohoto flavonoidu a v pohankových vločkách rutin nalezen nebyl vůbec.

Hlavní mechanismus účinků rutinu souvisí s jeho vysokou antioxidační aktivitou. Tyto účinky byly stanoveny u vzorků pohanky metodou zhášení radikálu DPPH. Nejvíce aktivní byla pohanková nať. V porovnání s některými antioxidačně působícími standardy klesala tato aktivita v pořadí hyperosid ($IC_{50} = 0,0041$ mg/ml) > rutin ($IC_{50} = 0,0047$ mg/ml) > pohanková nať ($IC_{50} = 0,12$ mg/ml) > celé nažky ($IC_{50} = 2,71$ mg/ml) > loupané nažky ($IC_{50} = 3,11$ mg/ml) > pohanková mouka ($IC_{50} = 4,16$ mg/ml) > osemení nažek ($IC_{50} = 6,71$ mg/ml) > pohankové vločky ($IC_{50} = 15,94$ mg/ml) > pohankové lupínky ($IC_{50} = 22,55$ mg/ml).

Na antioxidační aktivitě nažek a výrobků z nich se podílí nejen rutin, ale pravděpodobně celý komplex látek.

7 Literatura

1. Sun, T., et al.: *Antioxidant activities of buckwheat extracts*. Food Chemistry, 2005. **90**, 743-749.
2. Kalinova, J., et al.: *Distribution of Vitamin E, Squalene, Epicatechin, and Rutin in Common Buckwheat Plants (Fagopyrum esculentum Moench)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**, 5330-5335.
3. Higasa, S., et al.: *Distribution of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance (2"-hydroxynicotianamine) in the flour, plant parts, and processed products of buckwheat*. Food Chemistry, 2011. **125**, 607-613.
4. Morita, N., et al.: *Studies on distribution of protein and allergen in graded flours prepared from whole buckwheat grains*. Food Research International, 2006. **39**, 782-790.
5. Hatcher, D.W., et al.: *Evaluation of the performance of flours from cross- and self-pollinating Canadian common buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) cultivars in soba noodles*. Food Chemistry, 2008. **107**, 722-731.
6. Zielinska, D., et al.: *Comparison of Spectrophotometric and Electrochemical Methods for the Evaluation of the Antioxidant Capacity of Buckwheat Products after Hydrothermal Treatment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**, 6124-6131.
7. Fu, B.X.: *Asian noodles: History, classification, raw materials, and processing*. Food Research International, 2008. **41**, 888-902.
8. Kreft, I., et al.: *Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products*. Food Chemistry, 2006. **98**, 508-512.
9. Jiang, P., et al.: *Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species Fagopyrum esculentum, F. tataricum, and F. homotropicum and their protective effects against lipid peroxidation*. Food Research International, 2007. **40**, 356-364.
10. Bouriche, H., et al.: *Effect of leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2005. **72**, 195-201.
11. Santos, B.L., et al.: *Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells*. Food Chemistry, 2011. **127**, 404-411.
12. Marcarini, J.C., et al.: *Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2011. **63**, 459-465.
13. Fernandes, A.A.H., et al.: *Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2010. **64**, 214-219.
14. Koda, T., et al.: *Rutin Supplementation in the Diet has Protective Effects Against Toxicant-Induced Hippocampal Injury by Suppression of Microglial Activation and Pro-Inflammatory Cytokines*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2009. **29**, 523-531.
15. Katalinić, M., et al.: *Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **45**, 186-192.

16. Machado, D., et al.: *Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from Schinus molle L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems.* European Journal of Pharmacology, 2008. **587**, 163-168.
17. Dimpfel, W.: *Rat electropharmacograms of the flavonoids rutin and quercetin in comparison to those of moclobemide and clinically used reference drugs suggest antidepressive and/or neuroprotective action.* Phytomedicine, 2009. **16**, 287-294.
18. Orhan, D.D., et al.: *Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids.* Microbiological Research, 2010. **165**, 496-504.
19. Riverocruz, J., et al.: *Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (Vitis vinifera) against selected oral pathogens.* Phytochemistry Letters, 2008. **1**, 151-154.
20. Wang, H., et al.: *Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities.* Food Chemistry, 2008. **107**, 1399-1406.
21. Neumayer, C., et al.: *Combined Enzymatic and Antioxidative Treatment Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbit Skeletal Muscle.* Journal of Surgical Research, 2006. **133**, 150-158.
22. Racek, J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění.* Galén. Praha, 2003.
23. Wang, K.-J., et al.: *Antioxidant phenolic constituents from Fagopyrum dibotrys.* Journal of Ethnopharmacology, 2005. **99**, 259-264.
24. Bonafaccia, G., et al.: *Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat.* Food Chemistry, 2003. **80**, 9-15.
25. Podlech, D.: *Léčivé rostliny - Kapesní atlas.* Slovart. Praha. 2007.
26. Suzuki, T., et al.: *Time–Course Study and Effects of Drying Method on Concentrations of γ -Aminobutyric Acid, Flavonoids, Anthocyanin, and 2''-Hydroxynicotianamine in Leaves of Buckwheats.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **57**, 259-264.
27. Krkošková, B., et al.: *Prophylactic components of buckwheat.* Food Research International, 2005. **38**, 561-568.
28. Choi, I., et al.: *Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet.* Phytomedicine, 2007. **14**, 563-567.
29. *Vyhláška pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta; 333/1997 Sb. k zákonu o potravinách 110/1997 Sb.*
30. Takahama, U., et al.: *Proanthocyanidins in Buckwheat Flour Can Reduce Salivary Nitrite to Nitric Oxide in the Stomach.* Plant Foods for Human Nutrition, 2009. **65**, 1-7.
31. Alvarez-Jubete, L., et al.: *Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients.* Trends in Food Science & Technology, 2010. **21**, 106-113.
32. Wijngaard, H.H., et al.: *Buckwheat.* Cereal Chemistry Journal, 2006. **83**, 391-401.
33. Skrabanja, V., et al.: *Nutritional Properties of Starch in Buckwheat Products: Studies in Vitro and in Vivo.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **49**, 490-496.
34. Takahama, U., et al.: *Fatty Acids, Epicatechin-Dimethylgallate, and Rutin Interact with Buckwheat Starch Inhibiting Its Digestion by Amylase: Implications for the Decrease in Glycemic Index by Buckwheat Flour.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**, 12431-12439.

35. Kezuka, Y., et al.: *Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of a major buckwheat allergen*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2009. **65**, 1267-1270.
36. Nakamura, S., et al.: *Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides*. Food Chemistry, 2008. **109**, 538-545.
37. Hung, P., et al.: *Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities*. Food Chemistry, 2008. **109**, 325-331.
38. Gheldof, N., et al.: *Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**, 1500-1505.
39. Schramm, D.D., et al.: *Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**, 1732-1735.
40. Jasicka-Misiak, I., et al.: *Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys*. Food Chemistry, 2012. **131**, 1149-1156.
41. Cervantes-Laurean, D., et al.: *Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. **17**, 531-540.
42. Jaganath, I.B., et al.: *In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **47**, 1180-1189.
43. Murota, K., et al.: *α -Oligoglucosylation of a sugar moiety enhances the bioavailability of quercetin glucosides in humans*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **501**, 91-97.
44. Tamura, M., et al.: *Effect of Pectin Enhancement on Plasma Quercetin and Fecal Flora in Rutin-Supplemented Mice*. Journal of Food Science, 2007. **72**, S648-S651.
45. Jaganath, I.B., et al.: *The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man*. Free Radical Research, 2006. **40**, 1035-1046.
46. Chen, I.L., et al.: *Lymphatic Absorption of Quercetin and Rutin in Rat and Their Pharmacokinetics in Systemic Plasma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**, 546-551.
47. Cermak, R., et al.: *Comment on Lymphatic Absorption of Quercetin and Rutin in Rat and Their Pharmacokinetics in Systemic Plasma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**, 8467-8467.
48. *Mikro-verze AISLP-ČR 2010.4*.
49. Soberón, J.R., et al.: *Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from Tripodanthus acutifolius*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **130**, 329-333.
50. Raghav, S.K., et al.: *Anti-inflammatory effect of Ruta graveolens L. in murine macrophage cells*. Journal of Ethnopharmacology, 2006. **104**, 234-239.
51. Kazłowska, K., et al.: *Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from Porphyra dentata*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **128**, 123-130.

52. Kwon, K., et al.: *Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression*. *Biochemical Pharmacology*, 2005. **69**, 395-406.
53. Rabišková, M., et al.: *Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: In vitro characteristics and in vivo evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **422**, 151-159.
54. Kim, H., et al.: *Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. *Pharmaceutical Research*, 2005. **22**, 1499-1509.
55. Arjumand, W., et al.: *Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats*. *Food and Chemical Toxicology*, 2011. **49**, 2013-2021.
56. Miceli, N., et al.: *Anti-inflammatory activity of extract and fractions from Bentham*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. **97**, 261-266.
57. Yonathan, M., et al.: *In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of Cheilanthes farinosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006. **108**, 462-470.
58. Tamura, E.K., et al.: *Inhibitory effects of Solidago chilensis Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. **122**, 478-485.
59. Han, Y.: *Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, 2009. **9**, 207-211.
60. Ramos, A., et al.: *Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay*. *Toxicology Letters*, 2008. **177**, 66-73.
61. Endringer, D.C., et al.: *NF-κB inhibitory activity of cyclitols isolated from Hancornia speciosa*. *Phytomedicine*, 2009. **16**, 1064-1069.
62. Wu, C.-H., et al.: *Rutin Inhibits Oleic Acid Induced Lipid Accumulation via Reducing Lipogenesis and Oxidative Stress in Hepatocarcinoma Cells*. *Journal of Food Science*, 2011. **76**, T65-T72.
63. Chow, J.-M., et al.: *Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H2O2-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages*. *Biochemical Pharmacology*, 2005. **69**, 1839-1851.
64. Iffert, T., et al.: *Modulation of daunorubicin toxicity by liposomal encapsulation and use of specific inhibitors in vitro*. *Toxicology*, 2000. **144**, 189-195.
65. Lee, C.S., et al.: *Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells*. *Biochemical Pharmacology*, 2004. **68**, 1857-1867.
66. Matsui, J., et al.: *Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells*. *Leukemia Research*, 2005. **29**, 573-581.
67. Ruiz, E., et al.: *Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL*. *European Journal of Pharmacology*, 2006. **529**, 79-83.
68. Kim, W.K., et al.: *Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005. **16**, 155-162.
69. Romero, I., et al.: *Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells*. *BJU International*, 2002. **89**, 950-954.
70. Kim, G.-N., et al.: *Protective Mechanism of Quercetin and Rutin Using Glutathione Metabolism on H2O2-induced Oxidative Stress in HepG2 Cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1171**, 530-537.

71. Mozzicafreddo, M., et al.: *Antiplasmin activity of natural occurring polyphenols*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 2008. **1784**, 995-1001.
72. Chuang, C.-H., et al.: *Vitamin E and rutin synergistically inhibit expression of vascular endothelial growth factor through down-regulation of binding activity of activator protein-1 in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells*. *Chemico-Biological Interactions*, 2010. **183**, 434-441.
73. Freitas, S., et al.: *Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells*. *Phytotherapy Research*, 2011. **25**, 916-921.
74. Lin, J.-P., et al.: *Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo*. *Leukemia Research*, 2009. **33**, 823-828.
75. Li, Y.Q., et al.: *Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**, 11463-11468.
76. Fontana Pereira, D., et al.: *Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis*. *Nutrition*, 2011. **27**, 1161-1167.
77. Coskun, O., et al.: *Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas*. *Pharmacological Research*, 2005. **51**, 117-123.
78. Can, Ö.D., et al.: *Effects of treatment with St. John's Wort on blood glucose levels and pain perceptions of streptozotocin-diabetic rats*. *Fitoterapia*, 2011. **82**, 576-584.
79. Rauter, A.P., et al.: *Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats*. *Phytotherapy Research*, 2010. **24**, S133-S138.
80. Vessal, M., et al.: *Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003. **135**, 357-364.
81. Prince, P.S.M., et al.: *Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2006. **20**, 96-102.
82. Kamalakkannan, N., et al.: *Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006. **98**, 97-103.
83. Kato, A., et al.: *Structure–Activity Relationships of Flavonoids as Potential Inhibitors of Glycogen Phosphorylase*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**, 4469-4473.
84. Pashikanti, S., et al.: *Rutin metabolites: Novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. **48**, 656-663.
85. Kang, W.Y., et al.: *In vitro antioxidant properties and in vivo lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves*. *Medicinal Chemistry Research*, 2010. **19**, 617-628.
86. Ziaee, A., et al.: *Effects of Rutin on Lipid Profile in Hypercholesterolaemic Rats*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2009. **104**, 253-258.
87. Hsu, C.L., et al.: *Phenolic Compounds Rutin and o-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. **57**, 425-431.

88. Chu, C.-Y., et al.: *Protective effects of leaf extract of Zanthoxylum ailanthoides on oxidation of low-density lipoprotein and accumulation of lipid in differentiated THP-1 cells*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**, 1265-1271.
89. Lorrain, B.N.D., et al.: *Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**, 676-683.
90. Kanner, J.: *Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health*. Molecular Nutrition & Food Research, 2007. **51**, 1094-1101.
91. Dai, F., et al.: *Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells*. Life Sciences, 2006. **78**, 2488-2493.
92. Sadowska-Woda, I., et al.: *Bifenthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro and protective effect of selected flavonols*. Toxicology in Vitro, 2010. **24**, 460-464.
93. Sadowska-Woda, I., et al.: *Effect of selected antioxidants in β -cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro*. Toxicology in Vitro, 2010. **24**, 879-884.
94. Prince, P.S.M., et al.: *Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences*. European Journal of Pharmacology, 2010. **649**, 229-235.
95. Punithavathi, V.R., et al.: *Protective Effects of Rutin on Mitochondrial Damage in Isoproterenol-Induced Cardiotoxic Rats: An In Vivo and In Vitro Study*. Cardiovascular Toxicology, 2010. **10**, 181-189.
96. Mladenka, P., et al.: *Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity*. Toxicology, 2009. **255**, 25-32.
97. Tongjaroenbuangam, W., et al.: *Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (Abelmoschus esculentus Linn.) in dexamethasone-treated mice*. Neurochemistry International, 2011. **59**, 677-685.
98. Lapa, F.d.R., et al.: *Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from Polygala paniculata L. in Mice*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2009. **104**, 306-315.
99. Nakayama, M., et al.: *Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death*. Molecular Vision, 2011. **17**, 1784-1793.
100. Mosoni, L., et al.: *Antioxidant supplementation had positive effects in old rat muscle, but through better oxidative status in other organs*. Nutrition, 2010. **26**, 1157-1162.
101. Marzani, B., et al.: *Antioxidant Supplementation Restores Defective Leucine Stimulation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle from Old Rats*. Journal of Nutrition, 2008. **138**, 2205-2211.
102. Cimanga, R.K., et al.: *The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of Morinda morindoides (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **127**, 215-220.
103. Khan, M.M., et al.: *Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats*. Brain Research, 2009. **1292**, 123-135.
104. Korkmaz, A., et al.: *Protective Effect of Rutin on the Ischemia/Reperfusion Induced Damage in Rat Kidney*. Journal of Surgical Research, 2010. **164**, 309-315.

105. Wei, S.-M., et al.: *Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury*. Journal of Pediatric Surgery, 2011. **46**, 1419-1424.
106. Ali, M.S., et al.: *Cardioprotective effect of tetrahydrocurcumin and rutin on lipid peroxides and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in rats*. Pharmazie, 2009. **64**, 132-136.
107. Silveira, P., et al.: *Effect of rutin and chloroquine on White Leghorn chickens infected with Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. Tropical Animal Health and Production, 2009. **41**, 1319-1323.
108. Olaleye, M.T., et al.: *Comparative gastroprotective effect of post-treatment with low doses of rutin and cimetidine in rats*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2011.
109. Abdel-Raheem, I.T.: *Gastroprotective Effect of Rutin against Indomethacin-Induced Ulcers in Rats*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2010. **107**, 742-750.
110. Huang, J., et al.: *Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice*. Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**, 1943-1947.
111. Boeira, V.T., et al.: *Effects of the hydroalcoholic extract of Phyllanthus niruri and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2011. **384**, 265-275.
112. Ghodasara, J., et al.: *Inhibitory effect of rutin and curcumin on experimentally-induced calcium oxalate urolithiasis in rats*. Pharmacognosy Research, 2010. **2**, 388-392.
113. Tang, D.-Q., et al.: *Protective Effects of Rutin on Rat Glomerular Mesangial Cells Cultured in High Glucose Conditions*. Phytotherapy Research, 2011. **25**, 1640-1647.
114. Khan, R.A., et al.: *Evaluation of Launaea procumbens use in renal disorders: A rat model*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **128**, 452-461.
115. Shenbagam, M., et al.: *Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance – a histopathologic study*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2011. **25**, 493-502.
116. Yu, C.-P., et al.: *Quercetin and Rutin Reduced the Bioavailability of Cyclosporine from Neoral, an Immunosuppressant, through Activating P-Glycoprotein and CYP 3A4*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**, 4644-4648.
117. *Český lékopis 2009*. Grada Publishing, Praha.
118. Gulpinar, A.R., et al.: *Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) cultivated in Turkey*. Food Research International, 2012. **46**, 536-543.
119. Gupta, N., et al.: *Expression of flavonoid biosynthesis genes vis-à-vis rutin content variation in different growth stages of Fagopyrum species*. Journal of Plant Physiology, 2011. **168**, 2117-2123.
120. Kalinova, J., et al.: *The influence of organic and conventional crop management, variety and year on the yield and flavonoid level in common buckwheat groats*. Food Chemistry, 2011. **127**, 602-608.
121. Zielinski, H., et al.: *Changes in Protein Quality and Antioxidant Properties of Buckwheat Seeds and Groats Induced by Roasting*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**, 4771-4776.

122. Brand-Williams, W., et al.: *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology, 1995. **28**, 25-30.
123. Sedej, I., et al.: *Assessment of antioxidant activity and rheological properties of wheat and buckwheat milling fractions*. Journal of Cereal Science, 2011. **54**, 347-353.
124. Randhir, R., et al.: *Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. **9**, 355-364.
125. Şensoy, Í., et al.: *Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity*. Food Chemistry, 2006. **99**, 388-393.

8 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

Kandidát: Mgr. Petra Mikšátková

Konzultant: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Název rigorózní práce: Antiradikálová aktivita extraktů nati a plodů *Fagopyrum esculentum* Moench.

Zástupci rodu *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) obsahují řadu nutričně hodnotných látek, jako jsou proteiny, vláknina, vitamíny a flavonoidy, a proto se pohanka používá často jako potravina. Je hlavním potravním zdrojem rutinu, flavonoidu, který se používá k ovlivnění lomivosti a permeability kapilár. Jeho obsah byl stanoven v nati, plodech a některých výrobcích z *Fagopyrum esculentum*. Nejvíce rutinu bylo nalezeno v pohankové nati (4,93%). Výrazně nižší obsah byl detekován v celých i loupaných nažkách, ve slupkách nažek, pohankové mouce a pohankových lupíncích (0,01%). V pohankových vločkách rutin nalezen nebyl.

Významnou vlastností rutinu je jeho antioxidační aktivita, která je zřejmě zodpovědná za řadu biologických účinků tohoto flavonoidu. Tato aktivita byla hodnocena metodou zhášení radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Jako standardy byly použity rutin a hyperosid. Antioxidační aktivita vzorků klesala v pořadí: hyperosid ($IC_{50} = 0,0041$ mg/ml) > rutin ($IC_{50} = 0,0047$ mg/ml) > pohanková nať ($IC_{50} = 0,12$ mg/ml) > celé nažky ($IC_{50} = 2,71$ mg/ml) > loupané nažky ($IC_{50} = 3,11$ mg/ml) > pohanková mouka ($IC_{50} = 4,16$ mg/ml) > osemení nažek ($IC_{50} = 6,71$ mg/ml) > pohankové vločky ($IC_{50} = 15,94$ mg/ml) > pohankové lupínky ($IC_{50} = 22,55$ mg/ml).

9 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Mgr. Petra Mikšátková

Consultant: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Title of Thesis: Antiradical activity of extracts of *Fagopyrum esculentum* Moench leaves and seeds.

Representatives of the genus *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) contain many substances of high nutritive value, such as proteins, dietary fibre, vitamins and flavonoids and therefore buckwheat is often used as food. It is the major dietary source of rutin, flavonoid which is used for treatment of fragility and permeability of blood vessels. The content of rutin in samples of *Fagopyrum esculentum* was determined. The highest amount was detected in buckwheat leaves (4.93%). Significantly lower amount was found in whole and dehulled seeds, hulls, buckwheat flour and chips (0.01%). Buckwheat flakes didn't contain rutin.

Antioxidant activity is an important property of rutin. It is probably responsible for many biological effects of this flavonoid. This activity was evaluated by using free radical 2,2,-diphenyl-1-picryl-hydrasyl (DPPH method). Rutin and hyperoside were used as standards. Antioxidant activity decreased in this order: hyperoside ($IC_{50} = 0.0041$ mg/ml) > rutin ($IC_{50} = 0.0047$ mg/ml) > buckwheat leaves ($IC_{50} = 0.12$ mg/ml) > whole seeds ($IC_{50} = 2.71$ mg/ml) > dehulled seeds ($IC_{50} = 3.11$ mg/ml) > buckwheat flour ($IC_{50} = 4.16$ mg/ml) > hulls ($IC_{50} = 6.71$ mg/ml) > buckwheat flakes ($IC_{50} = 15.94$ mg/ml) > buckwheat chips ($IC_{50} = 22.55$ mg/ml).