

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**ELLAGOTANINY – VÝSKYT, METABOLISMUS
A ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANISMUS**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. JANA KARLÍČKOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Bc. KARIN RAABOVÁ

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé práce PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení a podporu při sepisování této práce, věnovaný čas, trpělivost a přátelský přístup při konzultacích.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

OBSAH

1. ABSTRAKT.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. ÚVOD.....	8
4. CÍL PRÁCE.....	9
5. ZAŘAZENÍ ROSTLIN DO SYSTÉMU.....	10
6. TŘÍSLOVINY.....	12
6.1 HYDROLYZOVATELNÉ TŘÍSLOVINY.....	12
6.1.1 Struktura hydrolyzovatelných tříslovin.....	13
6.2 KONDENZOVANÉ TŘÍSLOVINY.....	15
7. METABOLISMUS ELLAGOTANINŮ.....	16
8. MAGNOLIOPHYTA.....	18
8.1 MAGNOLIOPSISIDA – DVOUDĚLOŽNÉ ROSTLINY.....	18
8.1.1 <i>Frankenia thymifolia</i>	18
8.1.2 <i>Tamarix nilotica</i> , <i>Tamarix tetrandra</i>	20
8.1.3 <i>Cornus alba</i>	22
8.1.4 <i>Euphorbia antisyphilitica</i>	23
8.1.5 <i>Cistus</i> sp.....	24
8.1.6 <i>Lafoensia pacari</i>	26
8.1.7 <i>Lagerstroemia speciosa</i>	29
8.1.8 <i>Punica granatum</i>	30
8.1.9 <i>Eucalyptus citriodora</i>	34
8.1.10 <i>Myrciaria dubia</i>	36
8.1.11 <i>Syzygium guineense</i>	37
8.1.12 <i>Epilobium angustifolium</i>	39
8.1.13 <i>Oenothera</i> sp., <i>Geum urbanum</i> , <i>Lythrum salicaria</i> , <i>Agrimonia eupatoria</i>	40
8.1.14 <i>Comarum palustre</i>	43

8.1.15	<i>Fragaria vesca</i>	46
8.1.16	<i>Rubus occidentalis</i>	52
8.1.17	<i>Tellima grandiflora</i>	55
8.1.18	<i>Cunonia macrophylla</i>	56
9.	DISKUZE A ZÁVĚR.....	59
10.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	65
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
12.	POUŽITÉ ZDROJE	70

1. ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

**Název diplomové práce: ELLAGOTANINY – VÝSKYT, METABOLISMUS
A ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANISMUS**

Kandidát: Bc. Karin Raabová

Školitel: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Diplomová práce 2016/2017, s. 77

Ellagotaniny patří do třídy hydrolyzovatelných tříslovin, které v zažívacím traktu podléhají hydrolýze za vzniku kyseliny ellagové. Ellagotaniny se vyskytují v mnoha rostlinných čeledích, například u rostlin z čeledi růžovitých (Rosaceae), myrtovitých (Myrtaceae) nebo kyprejovitých (Lythraceae). Přirozeně se nacházejí v některých druzích ovoce (granátové jablko, jahody, ostružiny, maliny, hroznové víno), ale i v semenech vlašských ořechů a tvoří tak různorodou skupinu bioaktivních polyfenolů s protizánětlivou, protinádorovou, antioxidační a antimikrobiální aktivitou.

K následnému průkazu přítomnosti těchto látek v rostlinách a jejich identifikaci se nejčastěji používají speciální instrumentální metody (HPLC, DAD, MS).

Tato diplomová práce je literární rešerší, jejímž cílem bylo zpracování dostupných poznatků o výskytu ellagotaninů. Pozornost byla zaměřena především na jejich biologickou aktivitu prokázanou na zvířecím nebo lidském organismu.

Klíčová slova: ellagotaniny, výskyt, metabolismus, účinky, lidský organismus

2. ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

PHARMACEUTICAL FACULTY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

Title of the Diploma thesis: ELLAGITANNINS – OCCURENCE, METABOLISM AND EFFECTS ON HUMAN BODY

Candidate: Bc. Karin Raabová

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Diploma thesis 2016/2017, pp. 77

Ellagitannins belongs to a class of hydrolysable tannins, which are susceptible to hydrolysis to give ellagic acid in the digestive tract. Ellagitannins occur in many plant families, for example plants in the family Rosaceae, Myrtaceae or Lythraceae. There are naturally found in some fruits (pomegranate, strawberries, blackberries, raspberries, grapes), but also in the seeds of walnuts and thus form a diverse group of bioactive polyphenols with anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and antimicrobial activity.

Special instrumental methods (HPLC, DAD, MS) are most often used for subsequent evidence of occurrence of these compounds in plants and their identification.

This diploma thesis is a literature review, which aimed at processing the available knowledge about the ellagitannins. Attention was focused on the biological activity demonstrated in an animal or human organism.

Keywords: ellagitannins, occurrence, metabolism, effects, human body

3. ÚVOD

Tématem mé diplomové práce je poukázat na výskyt ellagotaninů v rostlinných zdrojích, jejich metabolizaci v živém organismu a biologické účinky, které na nich byly prokázány v různých *in vitro* a *in vivo* studiích.

Ellagotaniny (rostlinné polyfenoly) patří do třídy hydrolyzovatelných tříslovin, což jsou estery kyseliny hexahydroxydifenové a monosacharidu, nejčastěji glukosy [1].

Produktem hydrolýzy ellagotaninů je kyselina ellagová, která se dále metabolizuje na urolithiny [2].

Ellagotaniny se přirozeně vyskytují v některých druzích ovoce, bylinách a semenech. V některých plodech jsou hojně zastoupeny, jde zejména o maliny, ostružiny, rybíz, jahody, vlašské ořechy, pistácie, kešu, kaštiny a žaludy. Dále i granátová jablka a bobule hroznového vína, která jsou na ně mimořádně bohatá. Kromě toho mohou být ellagotaniny přítomny i v alkoholu, který byl dlouhodobě v dřevěných sudech [1].

Na základě mnoha pokusů s těmito látkami se potvrdilo, že ellagotaniny mají pozitivní účinky na lidské zdraví, které souvisí s jejich antioxidační, protizánětlivou a protinádorovou aktivitou. Proto konzumace zeleniny a ovoce s vysokým obsahem polyfenolů je považována za dobrou prevenci před různými typy nádorů.

V dnešní době je jedním z hlavních úkolů farmaceutického výzkumu nalézt nízkou toxicitu a účinné protinádorové sloučeniny z přírodních léčiv s žádnou nebo velmi nízkou toxicitou [3].

4. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracování dostupných poznatků o výskytu ellagotaninů publikované v odborné literatuře v posledním desetiletí. Pozornost byla zaměřena především na jejich biologickou aktivitu prokázanou na zvířecím, nebo lidském organismu. Nashromážděné údaje byly v textu rozděleny podle rostlin, v nichž se ellagotanimy vyskytují.

5. ZAŘAZENÍ ROSTLIN DO SYSTÉMU

MAGNOLIOPHYTA		
Magnoliopsida		
Caryophyllidae		
Caryophyllales		
	Frankeniaceae	<i>Frankenia thymifolia</i>
	Tamaricaceae	<i>Tamarix gallica, T. nilotica, T. tetrandra</i>
Cornidae		
Araliales		
	Cornaceae	<i>Cornus alba</i>
Dilleniidae		
Ericales		
	Theaceae	<i>Gordonia axillaris</i>
Euphorbiales		
	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia antisiphilitica</i>
Malvales		
	Cistaceae	<i>Cistus albidus, C. chusii, C. crispus, C. incanus, C. laurifolius, C. ladanifer, C. libanotis, C. monspeliensis, C. populifolius, C. salviifolius</i>
	Malvaceae	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
Rosidae		
Malpighiales		
	Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus urinaria,</i>

		<i>P. watsonii</i>
Myrtales		
	Lythraceae	<i>Lafoensia pacari</i> , <i>Lagerstroemia speciosa</i> , <i>Lythrum salicaria</i> , <i>Punica granatum</i>
	Combretaceae	<i>Terminalia arjuna</i> , <i>T. chebula</i> , <i>T. kaiserana</i> , <i>T. sambesiaca</i> , <i>T. sericea</i> , <i>T. spinosa</i> , <i>T. stenostachya</i>
	Myrtaceae	<i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Eugenia jambolana</i> , <i>Myrciaria dubia</i> , <i>Syzygium cumini</i> , <i>S. guineense</i>
	Onagraceae	<i>Epilobium angustifolium</i> , <i>Oenothera</i> sp.
Rosales		
	Rosaceae	<i>Agrimonia eupatoria</i> , <i>Comarum palustre</i> , <i>Fragaria vesca</i> , <i>Geum urbanum</i> , <i>Rubus occidentalis</i>
Santalales		
	Balanophoraceae	<i>Thonningia sanguinea</i>
Sapindales		
	Anacardiaceae	<i>Rhus chinensis</i>
Saxifragales		
	Saxifragaceae	<i>Tellima grandiflora</i>
	Paeoniaceae	<i>Paeonia suffruticosa</i>
Oxalidales		
	Cunoniaceae	<i>Cunonia macrophylla</i>

6. TŘÍSLOVINY

Třísloviny (taniny) patří mezi rostlinné polyfenoly s hořkou a svíravou chutí, jejichž název pochází ze slova „třísla“ – přípravku z rozdrcené kůry stromů, který se používá k vydělávání kůží. Třísloviny mají molekulovou hmotnost v rozmezí od 500 do více než 3000 daltonů. Jedná se o nažloutlé nebo světle hnědé částice v podobě prášku či vloček.

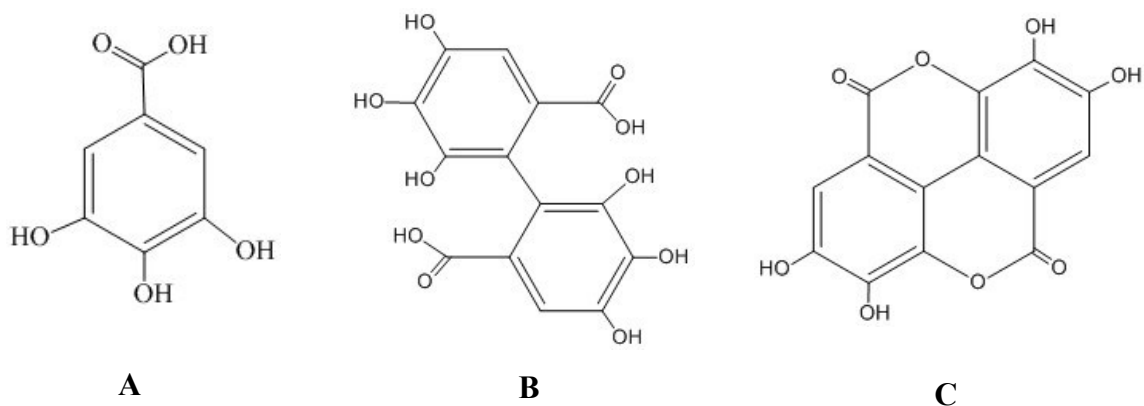
Jejich trpká chuť vzniká při interakci s bílkovinami ústní dutiny a ovlivňuje tak chuťové vlastnosti potravin, ať už pozitivně (např. chuť kávy, čaje) či negativně (např. pachut' nezralého ovoce) [4]. S bílkovinami vykazují charakteristickou reakci – tříslení [5]. Jejich hlavní fototerapeutické využití je jako adstringens, např. k léčbě ran, zánětů a hemoroidů, ale i při onemocnění gastrointestinálního traktu.

Nacházejí se v různých množstvích téměř ve všech rostlinách a ve všech klimatických podmínkách po celém světě [4].

U vyšších rostlin existují dvě skupiny tříslovin: hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny. Tyto skupiny se liší svou strukturou a jejich biogenetickým původem [6].

6.1 HYDROLYZOVATELNÉ TŘÍSLOVINY

Hydrolyzovatelné třísloviny jsou estery cukru (nebo polyolu) a různého počtu molekul fenolové kyseliny. Cukrem je většinou glukosa. Fenolovou kyselinou je buď kyselina gallová (obr. 1A), v případě gallotaninů, nebo kyselina hexahydroxydifenová (= HHDP, obr. 1B) a její oxidované deriváty (kyselina dehydrohexahydroxydifenová [= DHHDP]: kyselina chebulová), v případě tříslovin nazývaných jako ellagotaniny. HHDP se pak může přeměňovat na kyselinu ellagovou (obr. 1C). Od roku 1985 bylo izolováno několik zástupců nové kategorie tříslovin. Tyto složené třísloviny: flavanol, prokyanidin a flavonol jsou vlastně modifikované ellagotaniny vyplývající z přidání derivátu fenylchromanu na molekulu HHDP esteru glukosy. Gallotaniny, ellagotaniny a dehydroellagotaniny (jednoduché i složené molekuly tříslovin) jsou charakteristické pro dvouděložné krytosemenné rostliny (zejména třídy Rosidae, Dileniidae, Hamamelididae) s výjimkou třídy Asteridae v nichž se běžně nevyskytují [6].



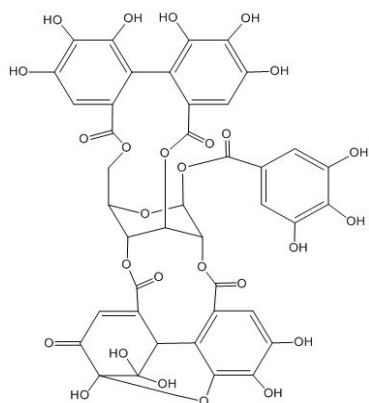
**Obr. 1. A - kyselina gallová, B - kyselina hexahydroxydifenová,
C - kyselina ellagová**

6.1.1 Struktura hydrolyzovatelných tříslovin

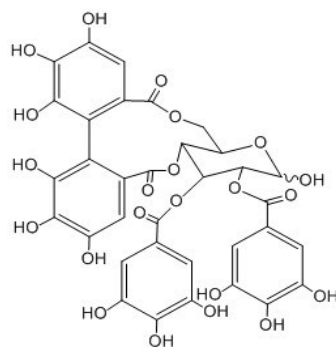
Obecně platí, že gallotaniny jsou estery kyseliny gallové a glukosy. Nicméně, mono a digalloylglukosy postrádají klasické vlastnosti tříslovin, protože jejich molekulová hmotnost je příliš nízká. Tyto vlastnosti, zejména schopnost srážet bílkoviny, platí pouze pro triestery a jejich vyšší homology.

Kyselina gallová (= kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová) vychází z metabolismu kyseliny šikimové. Obecně se vytváří přímou dehydrogenací kyseliny 3-dehydrošikimové, nebo v některých případech, oxidací kyseliny protokatechové (která je sama odvozena od kyseliny C₆-C₃, kyseliny kávové). Glykosylace zahrnuje uridindifosfát glukosu (UDP-glukosa). Všeobecně je na základě experimentů *in vitro* přijímáno, že výsledné monogalloylglukoso-β-glukogallinové jednotky mohou fungovat jako glukosové donory nebo akceptory, což následně vede k diesteru, 1,6-di-*O*-galloyl-β-D-glukose, a že se tyto kroky opakují po 1,2,6-tri-*O*- a 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl derivátech, až do vytvoření pentagalloylglukosy [6].

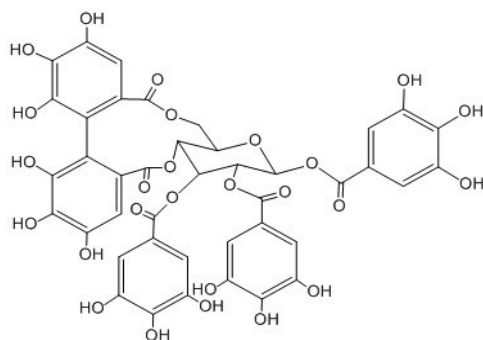
Ellagotaniny jsou estery HHDP a monosacharidu, obvykle β-D-glukosy. Mohou být buď monomerní (geraniin, tellimagrandin I a II, obr. 2), oligomerní (agrimoniin, obr. 3), nebo C-glykosidické (kastalagin, veskalagin, obr. 4). Ellagotaniny mají tendenci tvořit dimery a oligomery o vysoké molekulové hmotnosti.



A

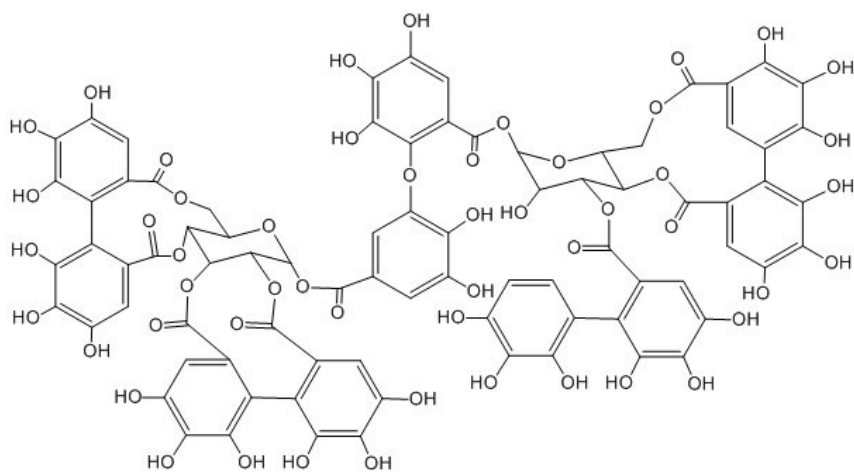


B

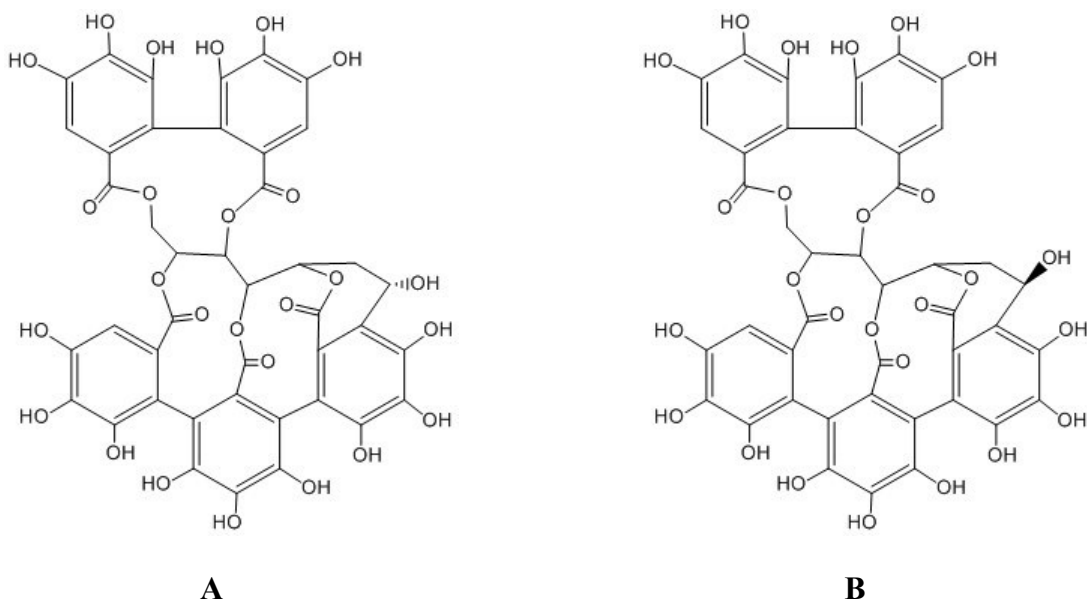


C

Obr. 2. Monomerní ellagotaniny: A - geraniin, B - tellimagrandin I, C - tellimagrandin II



Obr. 3. Oligomerní ellagotannin: agrimoniin

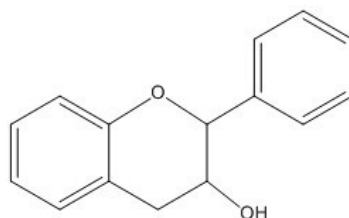


Obr. 4. C-glykosidické ellagotaniny: A - kastalagin, B – veskalagin

6.2 KONDENZOVANÉ TŘÍSLOVINY

Kondenzované třísloviny neboli proanthokyanidiny jsou polymerní flavany. Skládají se z flavan-3-ol jednotek spojených dohromady vazbou uhlík-uhlík, nejčastěji $4 \rightarrow 8$ nebo $4 \rightarrow 6$, které vyplývají ze spojení mezi elektrofilním C-4 flavanylové jednotky z flavan-4-olu nebo flavan-3,4-diolu a nukleofilní pozicí (C-8, méně často C-6) jiné jednotky, obvykle z flavan-3-olu (obr. 5).

Proanthokyanidiny byly izolovány nebo identifikovány ve všech rostlinných skupinách, včetně nahosemenných a pteridofitních typů rostlin [6].



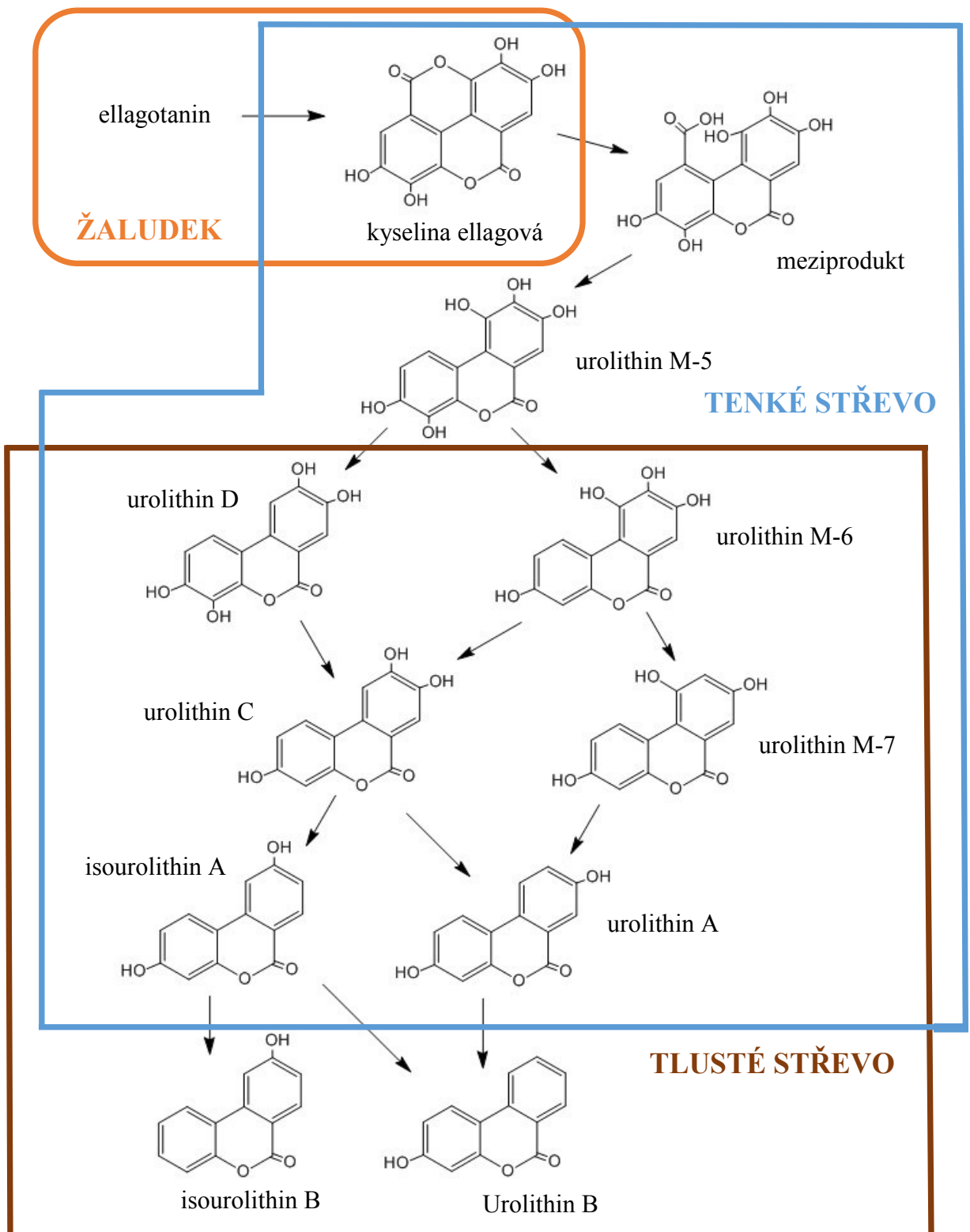
Obr. 5. Flavan-3-ol

7. METABOLISMUS ELLAGOTANINŮ

Ellagotaniny jsou metabolizovány v gastrointestinálním traktu střevní mikroflórou. V žaludku jsou ale stabilní, tudíž v něm nedochází k hydrolýze na volnou kyselinu ellagovou (EA) a ani k její degradaci. Na druhou stranu může být EA v žaludku absorbována. V zaživacím traktu se volná kyselina ellagová převede na dimethylovaný glukuronid kyseliny ellagové, který je pak metabolizován mikroflórou tlustého střeva na hydroxyderiváty dibenzopyran-6H-6-onu, které zahrnují následující sloučeniny: 3,8-dihydroxyglukuronid-6H-dibenzo- β -D-pyran-6-on, jeho aglykon urolithin A, glukuronid hydroxy-6H-dibenzo- β -D-pyran-6-on, jeho aglykon urolithin B a glukuronid 3,8,10-trihydroxy-6H-dibenzo- β -D-pyran-6-on.

Obr. 6 ukazuje změny v ellagotaninech a kyselině ellagové vyvolané gastrointestinální mikrobiotou.

Nejvýznamnějšími produkty ellagotaninů jsou urolithiny. Ty jsou tvořeny střevními bakteriemi během metabolismu neabsorbovaných živin obsahujících ellagotaniny a následně jsou pak začleněny do enterohepatální cirkulace. Urolithiny jsou bioaktivní sloučeniny, které mohou hrát roli hormonálních analogů [7].



Obr. 6. Metabolismus ellagotaniů a kyseliny ellagové vyvolaný gastrointestinální mikrobiotou

8. MAGNOLIOPHYTA

8.1 MAGNOLIOPSISIDA – DVOUDĚLOŽNÉ ROSTLINY

8.1.1 *Frankenia thymifolia*

Název rostliny: *Frankenia thymifolia* Desf. – frankenie

Čeleď: Frankeniaceae - frankeniovité

Popis: slanomilný keř

Původ: Austrálie, J Evropa

Posouzení antioxidační aktivity a neuroprotektivní kapacity *Frankenia thymifolia* na PC12 buněčné linie a související identifikace fenolů pomocí LC-MS/MS

Cílem této studie bylo prozkoumat nadzemní a kořenové části tuniské rostliny *Frankenia thymifolia* bohaté na fenolové sloučeniny a vyhodnotit antioxidační a neuroprotektivní vlastnosti tohoto léčivého druhu. Po frakcionaci používající různá rozpouštědla polaritě se získalo 5 frakcí. Tyto ethylacetátové (EtOAc) frakce výhonků a kořenů mají značný obsah fenolů, vztahující se k jejich významným antioxidačním účinkům. Antioxidační aktivita byla měřena pomocí testů s 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou kyselinou) (ABTS) a testu, který měří absorpční kapacitu kyslíkových radikálů (ORAC). Hlavní sloučeniny byly identifikovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole spojené s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-ESI-MS), a také byly měřeny neuroprotektivní účinky nejméně aktivní EtOAc frakce. Celkově bylo identifikováno 14 sloučenin, které byly v rostlině *Frankenia thymifolia* nalezeny poprvé. Mezi hlavní identifikované sloučeniny patří pinoresinol a kempferol glykosid z nadzemních částí a **kyselina gallová** a neznámý ellagotanin z kořenové části. Neuroprotektivní kapacita proti β -amyloidu ($A\beta$) indukovala toxicitu v buňkách PC12. EtOAc frakce vykazovaly významný ochranný účinek při nižších koncentracích (25 a 50 μ M). Byly prokázány

antioxidační a neuroprotektivní aktivity ethylacetátové frakce z *Frankenia thymifolia* [8].

Posouzení antioxidační aktivity a neuroprotektivní kapacity *Frankenia thymifolia* pomocí různých testů

Metoda stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteu činidla

Celkový obsah polyfenolů z nadzemních částí a kořenových extraktů byl stanoven kolorimetrickou metodou. Byla použita 96 jamková destička. K 20 μ l extraktu (1 mg/ml) bylo přidáno 100 μ l Folin-Ciocalteu činidla. Po 2-3 minutách se přidalo 80 μ l uhličitanu sodného (75 g/l) a po 1 h byla měřena absorbance při 765 nm. Celkový obsah polyfenolů byl vyjádřen jako mg ekvivalentu kyseliny gallové na g extraktu a byl proveden alespoň třikrát. Celkový obsah polyfenolů byl vyšší v kořenu než v nadzemních částech. Nejvyšší výtěžek celkového obsahu polyfenolů byl pozorován v ethylacetátové frakci, kde dosahoval až 221 a 308 mg ekvivalentu kyseliny gallové na g v nadzemní části a kořenu.

Chelatační aktivita kovů

Chelatační aktivita železnatých iontů extraktů byla měřena pomocí metod od Dinise a kol. 80 μ l deionizované vody a 40 μ l síranu železnatého (0,2 mM) bylo přidáno k 40 μ l extraktu (1mg/ml). Směs byla promíchána v 96-jamkové destičce. Reakce byla zahájena přidáním 40 μ l ferrozinu (2 mM). Absorbance komplexu Fe^{2+} - ferrozín byla měřena při 562 nm po 10 minutách. Jako standard byla použita ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) a výsledky byly vyjádřeny jako mg EDTA na g extraktu. Všechny vzorky byly analyzovány třikrát a chelatační aktivita testovaných vzorků byla prokázána. Chelatační aktivita železa byla vyšší ve frakcích z nadzemních částí než z kořenu. Ethylacetátové frakce vykazovaly vyšší aktivitu (39 a 22 mg EDTA/g pro nadzemní částí a kořeny). Vysoké hladiny železa mohou působit katalyticky při produkci reaktivních forem kyslíku (Fentonova reakce), což má negativní vliv na strukturu a funkci buněk.

Buněčná kultura PC12 a test s 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidem (MTT) u kořenových ethylacetátových frakcí

Buňky PC12 odvozené z feochromocytomu byly udržovány v roztoku s 15% koňským sérem, 2,5% fetálním bovinním sérem a 1% penicilin/streptomycinovým antibiotikem při 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂/50 % vzduchu. Buňky byly rozmístěny v 96-jamkové destičce s hustotou 30 000 buněk na jamku a byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 h. Poté byly buňky ošetřeny 5 μM amyloidu β s extraktem nebo bez extraktu. Po 24 h inkubace byla stanovena životaschopnost buněk konvenční redukčním MTT testem. Buňky byly ošetřeny roztokem MTT (0,5 mg/ml) po dobu 3 h při 37 °C. Tmavě modré formazanové krystaly vytvořené v životaschopných buňkách byly půlhodiny rozpouštěny dimethylsulfoxidem (DMSO). Absorbance byla měřena při 595 nm pomocí čtečky mikrotitračních destiček. Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální podíl snížení MTT ve vztahu k absorbanci kontrolních buněk ve 100 %. Ethylacetátové frakce nadzemních částí a kořenů nebyly cytotoxické v koncentracích 25 a 50 μg/ml. Frakce *Frankenia thymifolia* kompletně zvrátily toxický účinek β-amyloidu (při 25 a 50 μg/ml pro nadzemní části a kořeny). V rámci shrnutí obsáhlého článku lze konstatovat, že ethylacetátové frakce *Frankenia thymifolia* jsou bohatým zdrojem polyfenolů, což může vysvětlit jejich antioxidační a neuroprotektivní účinky [8].

8.1.2 *Tamarix nilotica*, *Tamarix tetrandra*

Název rostliny: *Tamarix nilotica* (Ehrenb.) Bunde – tamaryšek nilský

Čeleď: Tamaricaceae - tamaryškovité

Popis: keř, nízký strom

Původ: S Afrika

Název rostliny: *Tamarix tetrandra* Pall. Ex M. Bieb. – tamaryšek čtyřmužný

Čeleď: Tamaricaceae - tamaryškovité

Popis: keř, nízký strom

Původ: JV Evropa, JZ Asie

Hydrolyzovatelné třísloviny z rostlin čeledi *Tamaricaceae*, struktury a cytotoxické vlastnosti oligomerních ellagotaninů z listů *Tamarix nilotica* a z kultivovaných tkání *Tamarix tetrandra*

Tamarix nilotica je rostlina původem z Egypta s dlouhou historií. Její listy a větvičky se používají k léčbě edému sleziny či infekce dělohy, zatímco vodný odvar z kůry smíchaný s octem se používá jako pleťové mléko [9]. Sekundární metabolity včetně těkavých olejů, sterolů, triterpenů, flavonoidů a fenolů jsou často nalézány v listech, kořenech a květech *Tamarix nilotica*. Např. *Tamarix gallica* měl chemopreventivní účinek a potlačil thioacetamidem zprostředkovaný jaterní oxidační stres, toxicitu a tumorovou odpověď u potkanů.

Částečně neacylované nové oligomerní hydrolyzovatelné taniny, **nilotinin T2** (1, trimer) a **nilotinin Q1** (2, tetramer) byly spolu se čtyřmi známými trimery: **nilotinin T1** (3) a **hirtelliny T1-T3** (4-6) a jedním dimerem: **tamarixinin B** izolovány z acetonového extraktu s podílem vody z listů *Tamarix nilotica*. Naopak z kultivovaných výhonků *Tamarix tetrandra* byly izolovány kromě nového trimery 1 a známých trimerů 4 a 6, také nový trimer **nilotinin T3** (8), známé dimery **nilotinin D3** (9) a **tamarixinin C** (10) a monomer **tellimagrandin I** (11). Struktury nových hydrolyzovatelných taninů byly stanoveny pomocí chromatografických a spektroskopických analýz jako jsou nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem s vysokým rozlišením a analyzátozem doby letu (HRESI-TOFMS) a detektor elektronového záhytu (ECD). Konkrétní neacylovaná pozice jádra glukosy je přičítána k možné biosyntetické cestě mezi novými oligomerními tříslovinami. Izolace stejných oligomerních tříslovin z kultivovaných výhonků *Tamarix tetrandra* poukazuje na jedinečnou biogenetickou schopnost získaných kultur produkovat strukturně a biologicky charakteristické třísloviny z čeledi *Tamaricaceae* běžně produkované intaktní rostlinou *Tamarix*. Třísloviny z listů *Tamarix nilotica* získané v této studii spolu s **geminem D** (12) a **1,3-di-O-galloyl-4,6-**

O-(aS)-hexahydroxydifenoyl-β-D-glukosou (13) vykazovaly proměnlivé nádorově specifické cytotoxické účinky. Naopak ellagotaninové trimery 4, 6 a 8 a dimer 9 vykazovaly převládající nádorově selektivní cytotoxické účinky s vysokou specificitou vůči lidským buňkám promyelocytární leukémie.

Metodika: Lidské buňky dutiny ústní byly získány z první extrakce zubu z dolní čelisti 12-leté dívky. Kultivovány byly při 37 °C v roztoku s 10% teplem inaktivovaným fetálním bovinním sérem, 100 jednotkami/ml penicilinu G a 100 µg/ml streptomycin sulfátu ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂.

Práškové listy z *Tamarix nilotica* (1 kg) byly homogenizovány v roztoku H₂O-aceton (3: 7, 22 l) při pokojové teplotě. Homogenát byl přefiltrován a zakoncentrován na 1,5 l při teplotě nižší jak 40 °C za sníženého tlaku. Následně byl extrakt podroben HPLC analýze [10].

8.1.3 *Cornus alba*

Název rostliny: *Cornus alba* L. – svída bílá

Čeleď: Cornaceae - dřínovité

Popis: opadavý keř

Původ: Asie

Antiproliferační účinky nových dimerních ellagotaninů z *Cornus alba* na nádorové buňky prostaty a na apoptózu související se zástavou S-fáze

Dřevina *Cornus alba* je v Koreji tradičně používána jako protizánětlivý extrakt, hemostatikum a diuretikum [11, 12].

Isolace frakcí a látek z 80% acetonového extraktu z dřeviny *Cornus alba* doprovázená stanovením jejich biologické aktivity, poukázala na 12 známých sloučenin,

a i jednu novou sloučeninu, předběžně určenou jako **kornusiin H** (13). Mezi tyto známé sloučeniny získané z *Cornus alba* patří čtyři flavonoidy: katechin (1), quercetin-3-*O*- β -D-glukuronid (2), quercetin-3-*O*-D- β -glukopyranosid (3), kempferol-3-*O*- β -D-glukopyranosid (4) a osm hydrolyzovatelných taninů: **kyselina gallová** (5), **2,6-di-*O*-galloyl-hamamelfuranosid** (6), **kyselina 2-galloyl-4-kafeoyl-L-threonová** (7), **kyselina 2,3-di-*O*-galloyl-4-kafeoyl-L-threonová** (8), **1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosid** (9), **kornusiin B** (10), **kornusiin A** (11) a **kamptothin B** (12). Všechny sloučeniny vykazovaly silnou 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) aktivitu k vychytávání volných radikálů. Zejména sloučeniny 6 a 9-13 mají vyšší schopnost vychytávat volné radikály než vitamín C. Sloučeniny 9, 11, 12 a 13 inhibují produkci oxidu dusnatého (NO) v lipopolysacharidem stimulovaných RAW-2647 buňkách (makrofágová linie) ve stejné míře jako N^G-monomethyl-L-arginin. Když byly antiproliferační účinky izolovaných sloučenin hodnoceny v nádorových buňkách prostaty, tak dimerní ellagotaniny (11-13) selektivně inhibovaly LNCaP nádorové buňky prostaty závislé na hormonu. Analýza průtokovou cytometrií ukázala, že dimerní ellagotaniny vyvolaly apoptózu a zástavu S-fáze. Výsledky naznačují, že tyto dimerní ellagotaniny z *Cornus alba* mohou být vyvinuty jako fytofarmaka pro nádory prostaty (pro benigní hyperplazii prostaty a pro rané stádium rakoviny prostaty).

K extrakci látek z *Cornus alba* (5,7 kg) bylo použito několik extrakčních kroků s použitím 80% acetonu při pokojové teplotě s následným odstraněním acetonu ve vakuu, čímž se získalo 463 g extraktu. Extrakt byl rozpuštěn ve vodě a zfiltrován. Potom se získalo 356 g ve vodě rozpustné frakce spolu s 89 g zbytku ve vodě nerozpustného; 243 g frakce rozpustné ve vodě bylo aplikováno na kolonu. Kolona byla eluována gradientovým systémem vody a methanolu a byla promyta v 60% acetonu, což přineslo 14 frakcí, které byly následně podrobeny HPLC a tenkovrstvé chromatografii (TLC). Strukturální identifikace byla provedena pomocí NMR a MS [13].

8.1.4 *Euphorbia antisyphilitica*

Název rostliny: *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. – pryšec

Čeleď: Euphorbiaceae – pryšcovité

Popis: bylina, keř, strom

Původ: Afrika, J Amerika

Antifungální ellagotanin izolovaný z rostliny *Euphorbia antisyphilitica* Zucc.

Studium antifungální aktivity nového ellagotanu izolovaného z rostlinných zbytků *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. získaných v procesu extrakce vosku.

Extrakt byl připraven z dehydratovaných a práškových zbytků rostlin a byl frakcionován kapalinovou chromatografií až do získání ethanolové frakce bohaté na ellagotanin, která byla ošetřena odpařením k obnovení ellagotanu jako jemného prášku. Vodný roztok byl připraven a zpracován pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie a gelové permeační chromatografie. Frakce bohatá na ellagotanin byla termogravimetricky hodnocena pro testování termostability kyseliny ellagové (monomerní jednotky). Pak byl ellagotaninový prášek analyzován pomocí infračervené (IČ) spektroskopie k určení funkční skupiny, a také byla použita hmotnostní spektroskopie k určení molekulárního iontu.

Byly stanoveny hlavní funkční skupiny ellagotanu, molekulová hmotnost byla 860,7 g/mol a také byla prokázána účinná antifungální aktivita proti fytopatogenním houbám. Je možno učinit závěr, že nový ellagotanin (860,7 g/mol), izolovaný z *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. působí antimykoticky na *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporoides* a *Rhizoctonia solani* [14].

8.1.5 *Cistus* sp.

Název rostliny: *Cistus* L. sp.- cist

Čeleď: Cistaceae - cistovité

Popis: keř

Původ: Středomoří, Kanárské ostrovy

Systematická studie polyfenolového složení vodných výluhů odvozených z několika druhů rodu *Cistus*

Tradiční lidová medicína používá *Cistus* sp. pro jeho protizánětlivé, antiulcerogenní, antimikrobiální, cytotoxické, vasodilatační účinky a také pro hojení ran. Nedávné studie ukazují, že účinky jsou přičítány především extraktům z *Cistus* [15, 16].

Cistus populifolius má mimo výše zmíněných účincích také antispastické vlastnosti. Předchozí studie na *Cistus laurifolius* prokázaly, že tato rostlina má protizánětlivé a antinociceptivní aktivity v ethanolových extraktech. Další druhy jako *Cistus libanotis* a *Cistus clusii* jsou tradičně používány pro své protizánětlivé účinky a jako léky na podporu růstu vlasů.

Cistaceae jsou velkou čeledí keřů, široce rozšířených ve středomořské oblasti. Patří sem rod *Helianthemum*, *Halimium* a *Cistus*. Rod *Cistus* obsahuje asi 20 druhů, rozšířených ve třech podrodech. Silice z *Cistus* sp. byla důkladně studována, ale polyfenolové složení nadzemních částí různých *Cistus* sp. vyžaduje další charakterizaci.

S cílem nalézt vztah mezi chemotypem a podrodem se provedla porovnávací analýza kvalitativního a kvantitativního složení polyfenolů nadzemních částí nejčastěji distribuovaných španělských *Cistus* sp.

Třináct vodných extraktů získaných z 10 různých *Cistus* sp. bylo analyzováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole spojené s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Jejich hlavní látky byly identifikovány a ellagotaniny byly kvantifikovány. Analýza hlavních komponent byla provedena u většiny významných sloučenin za účelem zjistit statistickou souvislost mezi chemotypem a odrůdou.

Byly nalezeny tři hlavní skupiny sloučenin, tj ellagotaniny, flavonoidy a jejich deriváty. Fenolový profil byl specifický pro každý druh, i když se množství některých sloučenin také mění v závislosti na typu thesoilu. Zatímco *C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. populifolius* a *C. libanotis* byly speciálně bohaté na ellagotaniny, tak *C. clusii*, *C. laurifolius* a *C. monspeliensis* obsahovaly značné množství flavonoidů a mnohem

méně ellagotaninů. Naproti tomu, *C. crispus*, *C. incanus* a *C. albidus* ukázaly polyfenolový profil většinou založený na flavonoidech. Analýza hlavních komponent ukázala silný vztah mezi podrody *Cistus* a jejími chemotypy vycházejícími z nejrelevantnějších ve vodě rozpustných polyfenolových sloučenin.

Mezi identifikované ellagotaniny patří **kyselina gallová, punikalín, punikalagín, punikalagín-gallát, kornusiin B, kyselina ellagová, pedunkulagín a glukogallín.**

Chemické složení vodných extraktů z listů rostlin, které patří do rodu *Cistus*, silně souvisí s jejich podrodem, jako s předchozí taxonomickou a fylogenetickou divizí. Naproti tomu, půdní a klimatické podmínky jsou méně ovlivňujícími faktory. Podrody *Leucocistus* a *Halimoides* vykazovaly vyšší obsah ellagotaninů. Nicméně, podrod *Cistus* má vyšší obsah flavonoidů.

K extrakci byly použity vybrané nadzemní části z *Cistus* sp., které byly promyty k dalšímu zpracování. Tento rostlinný materiál byl nejprve rozdrcen za použití mechanického mlýnu na maximální velikost 3-5 mm, a pak se extrahoval destilovanou vodou při teplotě nižší jak 65 °C za mírného míchání po dobu přibližně 2 h v poměru 1:5 (rostlina – rozpouštědlo). Poté byl materiál filtrován a centrifugován k odstranění pevných nerozpustných složek. Extrakty byly zahuštěny odpařením a udržovány při teplotě 4 °C až do doby použití. Poté byly extrakty z *Cistus* sp. analyzovány a kvantifikovány za použití HPLC vybaveným čerpadlem, autosamplerem a UV-VIS detektorem s diodovým polem. Také byla použita MS vybavena zdrojem ESI a analyzátozem iontovou pastí [17].

8.1.6 Lafoensia pacari

Název rostliny: *Lafoensia pacari* A. St. – Hill. - lafénzie

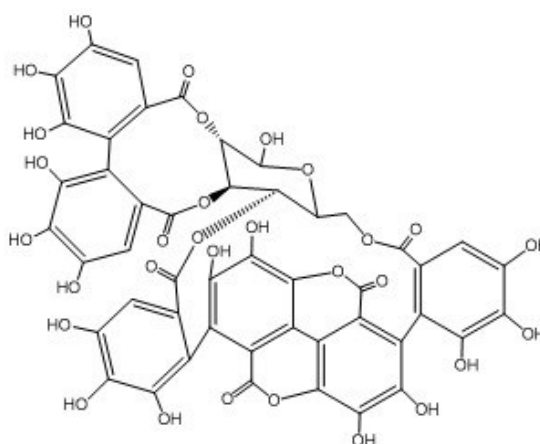
Čeleď: Lythraceae - kyprejovité

Popis: keř, strom

Původ: tropická Amerika

Chemopreventivní účinek a angiogenní aktivita punikalaginu izolovaného z listů *Lafoensia pacari*

Punikalagin (obr. 7) je hlavní ellagotanin z listů *Lafoensia pacari*, brazilské léčivé rostliny široce používané k léčbě žaludečního vředu a hojení ran [18]. Genotoxické, cytotoxické, antigenotoxické a anticytotoxické účinky punikalaginu byly u myši hodnoceny pomocí mikronukleus testu (MN) a kometového testu (= jednobuněčná gelová elektroforéza). Díky rozsáhlému používání *Lafoensia pacari* při hojení ran, mohli autoři tohoto článku hodnotit také angiogenní aktivitu punikalaginu pomocí chorioalantoidní membrány embrya (CAM). Nejvyšší dávka punikalaginu (50 mg/kg) vykazovala výrazný cytotoxický účinek hodnocený pomocí MN testu a při současném podávání cyklofosfamidů (CPA) byla tato cytotoxicita zvýšena. Společná léčba, předběžné ošetření a po ošetření punikalaginem s CPA vedlo k významnému snížení počtu zlomů DNA a četnosti mikrojadér indukovaných CPA, což naznačuje antigenotoxický účinek. Pomocí modelu CAM, punikalagin vykazoval angiogenní aktivitu ve všech dávkách, ale hlavně při nejnižší koncentraci (12,5 µg/µl). Proto tyto výsledky ukazují, efektivní chemopreventivní roli punikalaginu a jeho vysokou schopnost indukovat opravu DNA. Také angiogenní aktivita punikalaginu by mohla přispět k procesům tkáňových oprav a hojení ran.



Obr. 7. Punikalagin

Sušené a mleté listy *Lafoensia pacari* (250 g) byly podrobeny ultrazvukové extrakci s 50% acetonem při pokojové teplotě. Aceton byl odpařen za sníženého tlaku při 35 °C ve tmě a suspendovaný vodný extrakt byl přefiltrován, aby se odstranily tuky a chlorofyly. Ethylacetát byl použit v extrakci kapalina-kapalina a kombinovaná organická fáze byla odpařena, čímž se získal ethylacetátový extrakt (19,2 g). Vodná vrstva byla lyofilizována, čímž se získalo 74,7 g extraktu a část (45,1 g) byla rozpuštěna v methanolu (400 ml) pro oddělení rozpustných (44,2 g) a nerozpustných (0,9 g) methanolových extraktů. Část rozpustného methanolového extraktu (20 g) byla podrobena sloupcové chromatografii s gradientovým systémem H₂O/MeOH se snižující se polaritou. Dvanáct hlavních frakcí bylo podrobeno HPLC/UV ale i TLC. Vizualizace skvrn na TLC byla provedena nastříknutím 1% ethanolového roztoku chloridu železitého v kyselině chlorovodíkové (HCl, 0,1 %) a pod UV světlem. Objasnění struktury punikalaginu bylo stanoveno spektroskopickými metodami (ESI-TOF MS, 1D a 2D NMR) a porovnáno s poznatky z literatury.

K tomuto výzkumu byly použity zdraví mladí dospělí samci myši 8-12 týdnů staří o hmotnosti 25-30 g. Byly umístěny v klecích při teplotě 24 ± 2 °C, vlhkosti 55 ± 10 % a s přístupem k potravě a vodě.

Zvířata byla rozdělena do deseti skupin po pěti, a ještě před chemickým podáním byla zvážena. Všechna ošetření zahrnují intraperitoneální (i.p.) podání punikalaginu. Zvířata ve skupině 1 dostávala stejný objem vody (0,3 ml) i.p. a sloužila jako negativní kontrola, zatímco zvířata ve skupině 2 obdržela 50 mg/kg CPA i.p. a sloužila jako pozitivní kontrola. Skupině 3 bylo podáno 50 mg/kg punikalaginu. Zvířata ve skupinách 4, 5 a 6 byla intraperitoneálně ošetřena s 12,5; 25 a 50 mg/kg punikalaginu se současným podáním CPA. Zvířata ve skupině 7 přijímala po dobu 5 dnů punikalagin v dávce 25 mg/kg. Předběžně ošetřená zvířata ve skupinách 8 a 9 dostávala 12,5 a 25 mg/kg punikalaginu i.p., v tomto pořadí, po dobu pěti dnů a následně 2 h po konečném nakrmení dostala CPA. Po ošetření byla zvířata ve skupině 10 léčena CPA a po 6 a 12 h dostala punikalagin v dávce 12,5 mg/kg, v součtu byla konečná dávka 25 mg/kg.

Autoři tohoto článku již dříve podávali dávky 50 mg/kg v předběžném ošetření, nicméně třetí den léčby byla tato dávka pro 40 % zvířat smrtelná.

Všechna zvířata léčená CPA byla usmrcena (eutanizována) cervikální dislokací 24 h po podání. Zvířata, která dostávala pouze punikalagin byla usmrcena po 24 h od posledního podání. Buňky kostní dřeně z obou stehenních kostí byly propláchnuty pomocí fetálního telecího séra a po centrifugaci (300 g, 5 min) byly použity pro MN test (ke sledování vlivu genotoxických faktorů na genetický materiál člověka, stanovení počtu mikrojader v cytoplazmě dvoujaderných buněk) a kometový test (k detekci poškození DNA, jednobuněčná gelová elektroforéza) [19].

8.1.7 *Lagerstroemia speciosa*

Název rostliny: *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. – pukol lysý

Čeleď: Lythraceae - kyprejovité

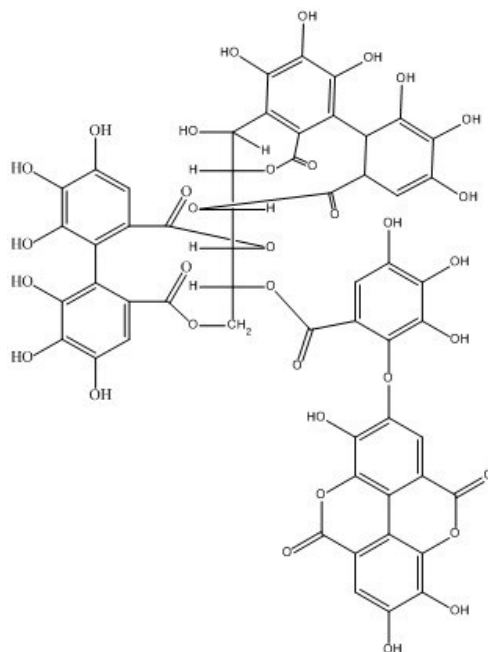
Popis: keř, strom

Původ: tropy, subtropy Asie

Ellagotaniny z *Lagerstroemia speciosa* jako aktivátory transportu glukosy v tukových buňkách

V dřevině *Lagerstroemia speciosa*, na Filipínách nazývané jako „banaba“, byly nalezeny enhancery (zesilovače) transportu glukosy. Čaj z jejich listů se používá jako nápoj, ale i jako lék pro léčbu a prevenci cukrovky (diabetes mellitus, DM). Hypoglykemický účinek extraktu z listů byl pozorován u pokusných zvířat, ale byly provedeny i klinické testy.

Fracionací vodného acetonového extraktu listů se získali tři aktivní ellagotaniny: **lagerstroemin** (obr. 8), **flosin B** a **reginin A**, které byly identifikovány pomocí optické rotace a NMR. Tyto sloučeniny zvyšují vychytávání glukosy v potkaních adipocytech, a tak mohou být zodpovědné za snížení hladiny glukosy v krvi.



Obr. 8. Lagerstroemin

Pro získání ellagotaniinů byla provedena extrakce dle uvedeného postupu: 1 kg sušených listů *Lagerstroemia speciosa* byl třikrát extrahován 70% acetonem při pokojové teplotě. Extrakt byl koncentrován za sníženého tlaku při teplotě menší jak 40 °C. Zbytek (224 g) byl suspendován ve vodě a byl rozdělen na ethylacetát a butanol, čímž se získaly příslušné frakce. U každé frakce se testovala aktivita enhanceru na transport glukosy. Aktivita byla omezena na vodnou frakci, která byla podrobena sloupcové chromatografii s vysoce porézním kopolymerem styrenu a divinylbenzenu s postupnou gradientovou elucí [20].

8.1.8 *Punica granatum*

Název rostliny: *Punica granatum* L. – marhaník granátový

Čeleď: Lythraceae - kyprejovité

Popis: menší strom

Původ: Středomoří

Dva ellagotaniny z jádrového dřeva *Punica granatum*

V průběhu studií metabolismu polyfenolů z jádrového dřeva *Punica granatum* byly izolovány dva nové ellagotaniny: **kyselina diellagová rhamnosyl (1 ⇒ 4) glukopyranosid** a **5-O-galloylpunikakortein D** a následně byly charakterizovány spolu se čtyřmi známými metabolity, jakou jsou **tanin, punikakortein D, punikalín, punikalagín** a **2-O-galloylpunikalín**. Struktury izolovaných sloučenin byly stanoveny pomocí chromatografie, chemické degradace, UV a 1D/2D ¹H/ ¹³C NMR spektroskopie.

K extrakci byl použit suchý prášek z jádrového dřeva *Punica granatum* (2 kg). Prášek byl nejdříve pomocí chloroformu (CHCl₃) odtučněn, a poté byl extrahován 80% ethanolem, čímž se získal po odstranění rozpouštědla suchý extrakt (110 g). Vodný extrakt byl nanesen na chromatograf za účelem získání několika hrubých frakcí. Hlavní získaná frakce tříslovin z extraktu byla podrobena mikrokrystalické celulóze (EtOH-H₂O, 7:1) používané jako eluent. Poté byly frakce získané z kolony s celulosou aplikovány na gel, čímž se získaly sloučeniny v čisté formě. Po ochlazení byla reakční směs extrahována ethanolacetátem. Vodný hydrolyzát byl neutralizován, odpařen a následně analyzován pomocí chromatografie k průkazu přítomnosti kyseliny ellagové, glukosy a rhamnosy [21].

Ellagotaniny z *Punica granatum* jako možné efekторы v procesu steroidogeneze v králičích ovariích

Tato studie zjistila možný vliv ellagotanimů, obsahových látek z *Punica granatum*, na proces steroidogeneze v ovariích. Cílem studie bylo zjistit možný vliv **punikalagínu** (hlavní ellagotanim z *Punica granatum*) na sekreci steroidních hormonů jako jsou progesteron, androstendion, testosteron a 17β-estradiol u králičích ovariálních fragmentů *in vitro*. V této studii byly použity ovariální fragmenty z pohlavně zralých samic novozélandských bílých králíků (n = 20). Tito králíci byli staří 150 dní a jejich

hmotnost byla $4,00 \pm 0,5$ kg. Uchovávání byli v drátěných klecích při konstantních podmínkách: 12 h denního světla, teplota 20-24 °C a vlhkost 55 ± 10 %. Jejich ovariální fragmenty byly inkubovány bez (kontrolní skupina) nebo s punikalaginem v různých dávkách 1, 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h. Hormony byly hodnoceny pomocí enzymové imunoanalýzy na pevné fázi (ELISA). Data ukázala, že hormony progesteron a 17 β -estradiol uvolněné králíčími ovariálními fragmenty byly punikalaginem při různých dávkách významně ovlivněny. Punikalagin v množství 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ významně zvýšil sekreci progesteronu, naopak punikalagin v množství 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ významně snížil uvolnění 17 β -estradiolu. Hodnoty androstendionu a testosteronu byly velmi nízké, a tak i jejich koncentrace byly pod měřitelnými limity. Tyto výsledky naznačují, že by punikalagin mohl mít v závislosti na dávce vliv na sekreci steroidních hormonů progesteronu a 17 β -estradiolu v králíčích ovariálních fragmentech, a že může být efektem v procesu steroidogeneze ovarií. Použití lyofilizované čerstvé šťávy z *Punica granatum* také uvádí, že fenoly z této rostliny inhibují 55 % estrogenní aktivity u normálních epitelových buněk lidského prsu [22].

Biologická dostupnost kyseliny ellagové v lidské plasmě po konzumaci ellagotaninů ze šťávy z *Punica granatum*

Kyselina ellagová (EA) a hydrolyzovatelné ellagotany (ET) jsou dietní polyfenoly nalezené v ovoci a ořechách. Tyto látky mají silné antioxidantní, protinádorové a antiaterosklerotické biologické vlastnosti [23]. Bohužel nejsou k dispozici žádné zprávy o biologické dostupnosti EA nebo ET v lidském těle [24]. Autoři tohoto článku provedli *in vivo* studie, při kterých jeden mužský subjekt (jeden z autorů, 35 let, 68 kg tělesné hmotnosti) po nočním půstu zkonsumoval 180 ml šťávy z *Punica granatum* (používá se v koncentrované formě pro snadnou konzumaci) s obsahem EA (25 mg) a ET (318 mg, **punikalagin** jako hlavní ellagotanin z ovoce). Krevní vzorky byly odebírány před a během 0,5; 1; 2; 3; 4 a 6 h po požití koncentrované šťávy z *Punica granatum*.

Nejdříve byla použita rychlá extrakce plazmy za použití kyselého srážení bílkovin, a poté následovala analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v ultrafialové oblasti (HPLC-UV).

Kyselina ellagová byla detekována v lidské plazmě při maximální koncentraci (31,9 ng/ml) 1 h po požití, ale po 4 h byla rychle eliminována. Kalibrační křivka pro kvantifikaci EA byla lineární ($r^2 = 0,9975$) v koncentračním rozmezí od 1000 do 15,6 ng/ml.

Vzhledem k tomu, že EA má údajně silnou afinitu k proteinům a nízkou absorpci u malých zvířat, je potřeba dalších studií s cílem prozkoumat, zda přítomnost volné EA v lidské plasmě může být vzhledem k jejímu uvolňování při hydrolýze ET, která je usnadněna fyziologickým pH a/nebo účinkem střevní mikroflóry, zaručena.

Závěrem lze říci, že kombinací extrakčního postupu pro přípravu vzorku plazmy a systému HPLC-UV autoři úspěšně poprvé získali přímý důkaz absorpce EA ze zdrojů potravy u člověka. EA tak může být považována za biomarker pro budoucí studium lidské biologické dostupnosti zahrnující konzumaci ET ze zdrojů potravy.

Krevní vzorky odebrané do zkumavky s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA, protisrážlivé činidlo) byly centrifugovány při 3000 x g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Plazma byla rychle odstraněna a uložena při -80 °C až do doby HPLC analýzy. 500 µl plazmy bylo upraveno na pH 2,5 se 150 µl 1 mol/l dihydrogenfosforečnanu draselného a 15 µl 50% kyseliny fosforečné. Každý vzorek byl vortexován (míchán) s 2,5 ml acetonitrilu po dobu 1 minuty a centrifugován při 3500 x g po dobu 10 minut při 5-10 °C. Supernatant byl odpařen do sucha při 35 °C a zbytek se smíchal se 100 µl methanolu. Poté bylo na HPLC systém s detektorem diodového pole (PDA) nastříknuto 20 µl vzorku pro stanovení přítomnosti a koncentrací EA a ET. Měření bylo pro každý vzorek třikrát opakováno. Vlnová délka pro detekci a kvantifikaci EA a ET byla monitorována při 366 a 378 nm. Koncentrace byly stanoveny z plochy píku pomocí rovnice pro lineární regresi získané z kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla lineární ($r^2 = 0,9975$) v koncentračním rozmezí od 1000 do 15,625 ng/ml. Výtěžky EA z lidské plazmy byly 103 %, 120 %, 113 % a 117 % pro koncentrace 500, 250, 125 a 62,5 ng/ml [25].

8.1.9 *Eucalyptus citriodora*

Název rostliny: *Eucalyptus citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. Johnson – blahovičník citroníkový

Čeleď: Myrtaceae - myrtovité

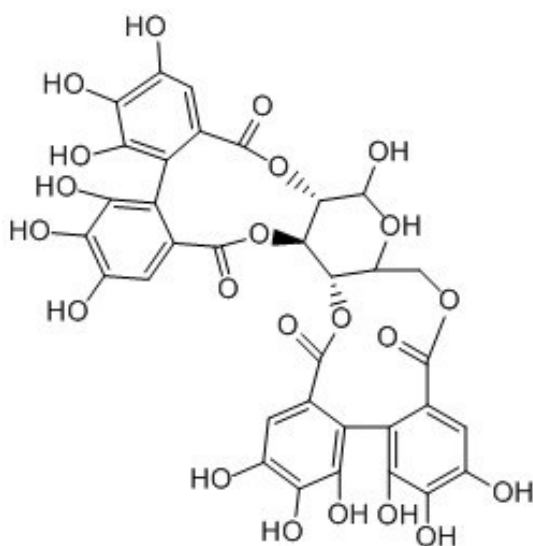
Popis: strom

Původ: SV Austrálie

Ochranná úloha ellagotaninů z *Eucalyptus citriodora* před žaludečním vředem vyvolaným ethanolem u potkanů: Vliv na oxidační stres, zánět a peptid příbuzný kalcitoninu

Frakce bohaté na ellagotaniny, které mají gastroprotektivní účinky, byly získány z listů *Eucalyptus citriodora* (ECF). Jejich aktivita byla zkoumána na ethanolem vyvolaných žaludečních vředech u potkanů. Potkani byli předlčeni s ECF (25, 50 a 100 mg/kg), 1 h před podáním absolutního ethanolu k vyvolání akutních žaludečních vředů. Žaludeční léze byly významně sníženy všemi dávkami ECF. Předběžné ošetření s ECF (100 mg/kg) vykazovalo 99,6 % gastroprotektivní aktivity, což je výrazně vyšší, než vykazoval omeprazol. Kromě toho, podávání ECF výrazně zvýšilo obsah mucinu v závislosti na dávce. Silný gastroprotektivní účinek by mohl být částečně zprostředkovan zeslabením ethanolem indukovaným oxidačním stresem. Předlčeni pomocí ECF výrazně zvýšilo sníženou hladinu glutathionu (GSH) a superoxiddismutasy (SOD) v závislosti na dávce. ECF výrazně snížil zvýšené tkáňové hladiny malondialdehydu (MDA) vyvolané podáním ethanolu. Výsledky ukázaly, že podávání ECF mělo silný protizánětlivý účinek, o čemž svědčí snížení prozánětlivých markerů: interleukinu 1 β (IL), tumor nekrotizujícího faktoru (TNF- α), lipoxygenasy 5 (LO) a cyklooxygenasy 2 (COX). Navíc tkáňové hladiny kaspasy-3 byly významně sníženy ve skupinách předlčených s ECF. Tyto výsledky naznačují, že by ECF mohl mít příznivý gastroprotektivní účinek prostřednictvím svých antioxidačních, protizánětlivých a antiapoptotických účinků. Předlčeni s ECF také významně zmírnilo ethanolem indukovaný pokles exprese peptidu příbuzného genu

kalcitoninu (CGRP), který má gastroprotektivní roli proti žaludečním vředům. Histopatologické vyšetření ukázalo intaktní slizniční vrstvy, nepřítomnost krvácení a nekrózy ve skupinách léčených pomocí ECF. Ellagotanniny byly identifikovány jako hlavní účinné látky zodpovědné za antioxidační a gastroprotektivní vlastnosti. K identifikaci ellagotaninů z listů *Eucalyptus citriodora* byla použita metoda HPLC-PDA-ESI/MS/MS. Mezi identifikované ellagotanniny patří **pedunkulagin** (obr. 9), **veskalagin**, **kastalagin**, **acutissimin A**, **pterokarinin A**, **stynophyllanin A**, **kasuarinin**, **guajavin A**, **tellimagrandin I** a **kyselina ellagová**.



Obr. 9. Pedunkulagin

Samci bílých potkanů (150-200 g) byly umístěny do klimatizovaných klecí, při teplotě 25 °C a se střídáním světla a tmy po 12 h. Zvířata se před experimentem aklimatizovala dva týdny a byla udržována standardní stravou a vodou. Standardní dieta obsahovala více než 20 % bílkovin, 3,5 % tuku, 6,5 % popela a směsi vitamínů. Všechny pokusy na zvířatech byly prováděny v souladu s příručkou pro péči a používání laboratorních zvířat a byly schváleny etickou komisí.

Zvířata byla rozdělena náhodně do šesti skupin (šest zvířat na skupinu). Skupina I sloužila pouze jako kontrola. Skupina II sloužila jako vředová kontrola a před orálním podáním absolutního ethanolu ji bylo podáno vehikulum. Skupiny III - V byly ošetřeny orálně s 25, 50 a 100 mg/kg ECF. Skupině VI byla perorálně podána standardní dávka

20 mg/kg omeprazolu. Po 1 h byl všem skupinám, kromě skupiny I, podán absolutní ethanol (5 ml/kg, podávaný orálně) pro vyvolání žaludečního vředu. Po 1 h od podání ethanolu byla zvířata anestezována, usmrcena a jejich žaludky byly vyjmuty. Žaludeční obsah byl odebrán a centrifugován při 5000 rpm po dobu 10 minut. Žaludeční šťávy byly použity k měření titrační kyselosti a obsahu mucinu. Každý žaludek byl otevřen podél většího zakřivení a promyt ledově chladným fyziologickým roztokem. Žaludeční tkáně z každé skupiny byly homogenizovány v roztoku chloridu sodného a následně byl homogenát použit pro hodnocení markerů oxidačního stresu, mezi které patří: redukovaný glutathion (GSH), lipidové peroxidy a superoxidodismutasa (SOD), zánětlivé markery (IL-1, TNF- α , COX-2 a 5-LO), apoptotický marker (kaspasa 3) a CGRP. Kromě toho byly reprezentativní vzorky žaludku z ošetřených skupin odebrány pro histopatologické vyšetření [26].

8.1.10 *Myrciaria dubia*

Název rostliny: *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh

Čeleď: Myrtaceae - myrtovité

Popis: keř

Původ: tropy

Antioxidační aktivita C-glykosidických ellagotaninů ze semen a kůry *Myrciaria dubia* (Camu-Camu)

C-glykosidické ellagotaniny, **grandinin**, **veskalagin**, **kastalagin**, **methylveskalagin**, **stachyurin** a **kasuarinin**, byly izolovány 50% acetonem z extraktu semen a plodů dřeviny Camu-Camu (čeleď Myrtaceae). Tyto třísloviny vykazovaly antioxidační aktivity měřené pomocí testů s 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou kyselinou) (ABTS) a testu, který měří absorpční kapacitu kyslíkových radikálů (ORAC). V DPPH a ABTS testech

vykazoval nejsilnější antioxidační aktivitu stachyurin a silnější aktivity byly u tříslovin, které obsahují dvě hexahydroxydifenové (HHDP) skupiny a galloylovou skupinu, než u tříslovin, které obsahují nonahydroxyterpenovou skupinu a HHDP skupinu. Aktivita veskalaginu byla silnější než kastalaginu a podobný vztah byl pozorován i u stachyurinu a kasuarininu. To znamená, že antioxidační aktivity těchto tříslovin mohou záviset na konformaci hydroxylové skupiny na C-1 otevřeného řetězce D-glukosy. Nicméně, v ORAC testu vykazoval nejsilnější aktivitu kasuarinin. Bylo zjištěno, že semena a kůra Camu-Camu, což jsou odpadní produkty při výrobě šťávy, obsahují C-glykosidické ellagotaniny se silnými antioxidačními účinky, a proto by mohly být užitečným zdrojem funkčních potravin a aditiv.

Vysušená semena vzorku (400 g) byla zbavena tuku pomocí n-hexanu, a poté byla třikrát extrahována 50% vodným acetonem při pokojové teplotě po dobu 24 h. Sloučené extrakty byly na suchu za sníženého tlaku při teplotě 40 °C zahuštěny, čímž se získal čerstvý extrakt (43,9 g). Čerstvý extrakt (5,0 g) se rozpustil v 50% methanolu (500 ml) a byl aplikován na kolonu. Kolona byla eluována systémem H₂O, MeOH a acetonem, čímž se získalo 8 frakcí. 60–90 % methanolvé frakce bylo rozpuštěno v 8–15% acetonitrilu a rozpustný podíl se podrobil preparativní HPLC. Z 1,0 g čerstvého extraktu byly získány dané sloučeniny. Čistota izolovaných sloučenin byla potvrzena pomocí HPLC, ¹H a ¹³C NMR [27].

8.1.11 Syzygium guineense

Název rostliny: *Syzygium guineense* (Willd.) DC. – hřebíčkovec

Čeleď: Myrtaceae - myrtovité

Popis: strom

Původ: JV Asie

Flavonoidy, gallotaniny a ellagotaniny ze *Syzygium guineense* a jejich tradiční použití mezi léčiteli z Mali

Rostlina *Syzygium guineense* je tradičně používána na Mali (západní Afrika) k léčbě různých onemocnění, jako jsou žaludeční problémy, rány, záněty a různé ženské choroby [28].

Cílem této studie bylo udělat průzkum o tradičním využití *Syzygium guineense* mezi léčiteli z Mali a následně izolovat a identifikovat obsahové látky z listů *Syzygium guineense* a prostudovat jejich schopnost vychytávat radikály a enzymové inhibiční účinky.

Ve čtyřech různých čtvrtích na Mali, bylo 44 léčitelů (11 žen a 33 mužů) podrobena dotazníku ohledně léčebného použití *Syzygium guineense*. Při stanovování složek, byl nejdříve připraven methanolvý extrakt z listů této rostliny, který byl dále za použití různých chromatografických metod frakcionován. Izolované sloučeniny byly identifikovány pomocí 1D a 2D NMR spektroskopie. U extraktů a izolovaných sloučenin se zkoumala jejich schopnost vychytávat radikály a jejich schopnost inhibovat xantinoxidasu a 15-lipoxygenasu. Methanolvý extrakt byl testován na toxicitu vůči *Artemia salina* nauplii.

Na vzduchu usušené a práškové listy ze *Syzygium guineense* (400 g) byly extrahovány dichlormethanem (12,5 l) při teplotě 40 °C a následně methanolem (15 l) při 60 °C, čímž se získalo 17,2 g (výtěžek 4,3 %) dichlormethanového a 119,6 g (výtěžek 29,9 %) methanolvého extraktu. Methanolvý extrakt (95 g) byl nanesen na kolonu, a poté byl chromatografován gradientem methanol/H₂O, čímž se celkem získalo 10 frakcí. Chromatografie probíhala na reverzní fázi C-18.

Výsledky ukázaly, že léčitelé z Mali používají *Syzygium guineense* hlavně při dermatozách, bolestech, malárii/horečce a při hojení ran. Z methanolvého extraktu listů byly izolovány flavonoidy: gallokatechin, myricetin, myricetin-3-*O*-glukosid, myricetin-3-*O*-rhamnosid, myricetin-3-*O*-glukuronid a myricetin-3-*O*-β-D (6"-galloyl) galaktosid, dále gallotaniny: 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glukosa, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukosa (8) a ellagotaniny: **kasuariktin** a **kasuarinin**. Tyto polyfenoly jsou pro daný druh nové. Čerstvý methanolvý extrakt byl aktivní jako vychytávač radikálů a jako inhibitor xantinoxidasy a 15-lipoxygenasy (15-LO). Z izolovaných sloučenin se penta-galloylglukosa ukázala jako nejlepší inhibitor enzymu (IC₅₀ = 25 ± 4 μM pro 15-LO, 8 ± 1 μM pro xantinoxidasu), zatímco kasuariktin (IC₅₀ = 3,9 ± 0,1 μM),

kasuarinin ($IC_{50} = 4,5 \pm 0,3 \mu M$) a pentagalloylglukosa ($IC_{50} = 5 \pm 1 \mu M$) vykazovaly nejvyšší schopnost vychytávání radikálů. Pro *Artemia salina* nauplii byl methanolový extrakt netoxický.

Závěrem lze říci, že listy ze *Syzygium guineense* jsou běžně používané léčitelé na Mali, avšak tradiční praxe se mezi jednotlivými regiony značně liší. Listy jsou bohaté na polyfenoly jako jsou flavonoidy, gallotaniny nebo ellagotaniny. Vysoký obsah biologicky aktivních polyfenolů tak může být důležitý pro léčivé účinky této rostliny, a může poskytnout důvody vedoucí k širokému používání *Syzygium guineense* na Mali [29].

8.1.12 *Epilobium angustifolium*

Název rostliny: *Epilobium angustifolium* L. – vrbovka úzkolistá

Čeleď: Onagraceae - pupalkovité

Popis: vytrvalá bylina

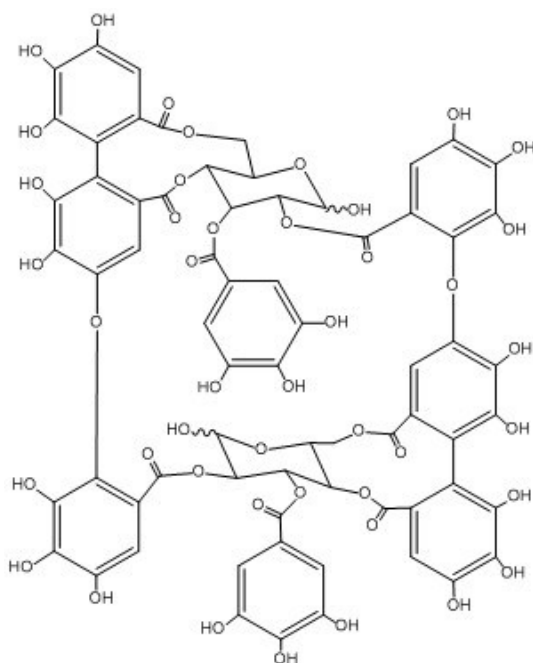
Původ: Evropa, severní polokoule

Studium vztahu mezi strukturou a aktivitou oligomerních ellagotaninů z *Epilobium angustifolium* při bachorové fermentaci *in vitro*

Cílem této studie bylo zjistit, jak stupeň oligomerizace ellagotaninů ovlivňuje jejich schopnost měnit fermentaci v bachoru. Mezi ET izolované z *Epilobium angustifolium* patří monomer: **tellimagrandin I**, dimer: **oenothain B** (obr. 10) a trimer: **oenothain A**. Ellagotaniny byly testovány *in vitro* ve směsi travní siláže a pufrované bachorové tekutiny. Celková produkce plynu byla měřena v reálném čase pomocí automatického vyhodnocování systémového tlaku. Produkce methanu byla sledována v pravidelných intervalech pomocí plynové chromatografie po dobu 72 h. Účinek ET byl hodnocen ve 2 zdrojích bachorové tekutiny. Amoniakální dusík, koncentrace těkavé mastné kyseliny a pH byly měřeny na konci experimentu. Výsledky ukázaly,

že oligomerní ET snížili produkci plynu a celkovou koncentraci těkavých mastných kyselin úměrně k jejich stupni oligomerizace. Produkce methanu se také snížila u všech testovaných sloučenin a dimer byl méně účinný než větší ellagotaniny, které vykazovali podobné aktivity. Navíc, oligomerní ET z *Epilobium angustifolium* snížili amoniakální dusík a koncentraci rozvětvených těkavých mastných kyselin, což poukázalo na sníženou degradaci proteinů prostřednictvím bacherových bakterií.

Tato studie ukázala, že stupeň oligomerizace ET má vliv na parametry fermentace *in vitro*. Velké oligomery mají ve skutečnosti více škodlivých účinků na těkavé mastné kyseliny a produkci plynu než malé, jsou ale podobně účinné při inhibici produkce methanu [30].



Obr. 10. Oenothin B

8.1.13 *Oenothera* sp., *Geum urbanum*, *Lythrum salicaria*, *Agrimonia eupatoria*

Název rostliny: *Oenothera* sp. Nutt. - pupalka

Čeleď: Onagraceae - pupalkovité

Popis: bylina

Původ: S a J Amerika

Název rostliny: *Geum urbanum* L. – kuklík městský

Čeleď: Rosaceae - růžovité

Popis: vytrvalá bylina

Původ: Evropa, Afrika, Asie

Název rostliny: *Lythrum salicaria* L. – kyprej vrbice

Čeleď: Lythraceae - kyprejovité

Popis: vytrvalá bylina

Původ: Evropa, Asie

Název rostliny: *Agrimonia eupatoria* L. – řepík lékařský

Čeleď: Rosaceae - růžovité

Popis: vytrvalá bylina

Původ: Evropa, JV Asie, S Amerika

Ellagotaniny z *Oenothera* sp., *Geum urbanum*, *Lythrum salicaria* a *Agrimonia eupatoria* regulují zánětlivou odpověď lidských neutrofilů *ex vivo*

Rostlinné materiály bohaté na třísloviny se běžně používají v tradiční medicíně jako externí protizánětlivá, antioxidační a antimikrobiální činidla [31, 32]. Rostlinné extrakty, které obsahují značné množství tříslovin, jsou často používány k prevenci a léčbě onemocnění dutiny ústní, jako je zánět dásní a parodontóza [33]. Vliv čistých

ellagotaninů k pozorování protizánětlivé aktivity léků bohatých na třísloviny stále není vyřešen.

Sloučeniny použité v této studii byly izolovány z vybraných rostlinných materiálů. **Penta-O-galloyl-β-D-glukosa** byla izolována z odtučněných semen *Oenothera paradoxa*. **1-O-galloyl-4,6-(S)-HHDP-β-D-glukosa**, **pedunkulagin**, **stachyurin**, **kasuarinin**, **stenophyllanin A**, **gemin G** a **gemin A** byly izolovány z kořene *Geum urbanum*. **Veskalagin**, **kastalagin**, **salikarinin A** a **salikarinin B** byly očištěny z nadzemních částí *Lythrum salicaria*. **Oenthein B** byl izolován z nadzemních částí *Oenothera hoelsheri*. **Agrimoniin** byl získán z nadzemních částí *Agrimonia eupatoria*.

Před každým experimentem byly sloučeniny rozpuštěny v deionizované vodě nebo v 70% ethanolu, a potom se zředily k získání zásobních roztoků o 400 μM a byly zfiltrány přes sterilní filtr (0,22 μm) v injekční stříkačce. Sloučeniny byly uloženy ve tmě při 4 °C a použity maximálně do 72 h. Všechny látky byly v experimentálních podmínkách stabilní. Analýza těchto sloučenin byla provedena pomocí HPLC-DAD-MS.

Cílem této studie bylo zjistit, zda tyto ellagotaniny a jejich prekurzor penta-galloylglukosa mohou modulovat zánětlivé reakce *ex vivo* stimulovaných neutrofilů.

Lidské neutrofile byly izolovány z buffy coat (trombocyty a leukocyty) získaného od zdravých dobrovolníků. Neutrofile byly kultivovány s nebo bez testované sloučeniny. Vliv ellagotaninů a penta-galloylglukosy na produkci a uvolňování prozánětlivých faktorů, jako jsou elastasa, reaktivní formy kyslíku (ROS), IL-8, TNF-α a metaloproteinasa-9, byl hodnocen pomocí ELISA soupravy nebo chemickými metodami. Vliv na povrchovou expresi Toll-like receptoru 4 (TLR) a apoptózu byl kontrolován pomocí průtokové cytometrie.

Výsledky této studie ukázaly, že ellagotaniny modulují zánětlivou odpověď lidských neutrofilů tak, že inhibují produkci a uvolňují vybrané cytokiny a prozánětlivé enzymy. Indukcí TNF-α ellagotaniny zvyšují apoptózu neutrofilů, která je předmětem zájmu v případě chronického zánětu v ústní dutině. Ellagotaniny také snižují povrchovou expresi TLR-4 v aktivovaných neutrofilech.

Výsledky podporují tradiční používání produktů bohatých na třísloviny v prevenci a léčbě onemocnění dutiny ústní. Tato studie dokazuje podstatný přínos

ellagotaninů v protizánětlivé aktivitě léčivých rostlinných materiálů bohatých na třísloviny [34].

8.1.14 *Comarum palustre*

Název rostliny: *Comarum palustre* L. – mochna bahenní

Čeleď: Rosaceae - růžovité

Popis: vytrvalá bylina

Původ: Evropa

Agrimoniin, aktivní ellagotanin z byliny *Comarum palustre*, s anti- α -glukosidasovým a antidiabetickým potenciálem u streptozotocinem navozených diabetických potkanů

Přírozně existující inhibitory α -glukosidasy z tradičních rostlinných léčivých přípravků se vyznačují tím, že by mohly být užitečné při léčbě diabetes mellitus 2. typu (DM).

Cílem této studie bylo vyhodnotit aktivitu α -glukosidasy a hypoglykemické účinky z extraktů *Comarum palustre* a detekovat příslušné sloučeniny. 60% ethanolový extrakt z této rostliny odhalil nejvyšší inhibiční aktivitu vůči α -glukosidase ($IC_{50} = 52,0 \mu\text{g/ml}$). HPLC analýza hlavních sloučenin vedla k detekci 15 sloučenin, včetně ellagotaninů, flavonoidů, katechinů a dalších sloučenin. Pomocí HPLC byla prokázána dobrá inhibiční aktivita eluátu obsahujícího **agrimoniin** proti α -glukosidase. Odstranění ellagotaninů z extraktu *Comarum palustre* významně snížilo inhibici α -glukosidasy ($IC_{50} = 204,7 \mu\text{g/ml}$), vzhledem k vysoké inhibiční aktivitě dominantního agrimoniinu ($IC_{50} = 21,8 \mu\text{g/ml}$). Hypoglykemický účinek extraktů z *Comarum palustre* byl hodnocen před a po odstranění ellagotaninu, agrimoniinu a inzulinu na streptozotocinem navozeném experimentálním modelu. Diabetičtí potkani léčení agrimoniinem a extraktem z *Comarum palustre* před vysazením ellagotaninu ukázaly významné zvýšení hladiny glukosy v plasmě a glykovaného hemoglobinu, a naopak

významné snížení hladiny inzulínu v plazmě a hemoglobinu. Získané údaje potvrdily, že agrimoniin z *Comarum palustre* vykazuje antidiabetickou aktivitu a umožňuje tak používat tuto rostlinu jako možný dietní doplněk při léčbě DM a jako zdroj nových perorálních antidiabetik.

Z rostliny *Comarum palustre* byl do Erlenmeyerovy baňky navážen 1 g. Poté se přidalo 100 ml destilované vody a vzorek byl zahříván na topné desce. Směs se vařila po dobu 10 minut, a poté se nechala odstát při pokojové teplotě po dobu 15 minut, následně se zfiltrovala za sníženého tlaku.

Experimenty byly prováděny na dospělých samcích potkanů Wistar o hmotnosti 180-210 g a 8 až 10 týdnů starých. Zvířata byla udržována v kleci při teplotě 22 °C s volným přístupem k potravě a vodě. Experimenty začínaly vždy ve stejnou dobu (v 10 h ráno). Experimentální diabetes byl indukován po celonočním hladovění jedinou intraperitoneální injekcí se streptozotocinem (60 mg/kg) čerstvě rozpuštěným v destilované vodě. Vzhledem k tomu, že je streptozotocin schopen způsobit fatální hypoglykémii v důsledku masivního pankreatického uvolňování inzulínu, tak byli potkani po 6 h intraperitoneálně ošetřeni 20% roztokem glukosy. Poté byly dalších 24 h uchovávány v klecích s lahvemi s 5 % glukosy, aby se zabránilo hypoglykémii. Hyperglykémie byla potvrzena čtyři dny po injekci měřením hladiny glukosy v krvi z ocasní žíly. Potkani s hladinou glukosy v krvi vyšší jak 250 mg/dl byli považováni za diabetické a byli tak použiti pro tyto výzkumné práce. Kontrolní zvířata dostala 0,9 % sterilního fyziologického roztoku. Inzulínem léčení diabetičtí potkani sloužili jako pozitivní kontrola.

Hladiny glukosy v krvi nalačno všech potkanů byly stanoveny před začátkem experimentu. Potkani byli rozděleni do skupin (kontrolní skupina, skupina s podávaným extraktem *Comarum palustre*, agrimoniinem, inzulínem, streptozotocinem). Extrakty a agrimoniim byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a potkanům byly podávány denně pomocí žaludeční sondy. Inzulín byl aplikován subkutánně. Výzkum probíhal 21 dní a krevní glukosa nalačno byla u potkanů stanovena 1., 7., 14. a 21. den. Inzulín v plazmě byl stanoven pomocí metody ELISA. Celkový hemoglobin a glykovaný hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) byl oddělen pomocí chromatografické metody používající kationtoměničové pryskyřice a kvantifikovány byly pomocí spektrofotometrie při 415 nm [35].

Ellagotaniny a další fenolové sloučeniny z *Comarum palustre*

Přípravky z *Comarum palustre* se používají k léčbě nemocí pohybového aparátu, jako protizánětlivá a antibakteriální přípravky [36]. Používají se kořeny rostliny. Nadzemní část rostliny byla navržena jako alternativní zdroj léčiv v průběhu studia. Informace o chemickém složení *Comarum palustre* uvádí, že podzemní orgány obsahují prokyanidiny zatímco nadzemní část obsahuje **2-pyron-4,6-dikarboxylové kyseliny, gossypetrin, (-)-epigallokatechin-3-O-gallát**, esenciální olej a **kyselinu chebulinovou**. Přítomnost poslední sloučeniny v *Comarum palustre* je pochybné, protože deriváty kyseliny chebulinové byly dosud nalezeny pouze u zástupců čeledi Combretaceae (*Terminalia* L.), Phyllanthaceae (*Phyllanthus emblica* Gaerth.) a Geraniaceae (*Geranium sylvaticum*, *G. wilfordii*). Cílem této práce bylo porovnat složení fenolových sloučenin z nadzemních a podzemních orgánů *Comarum palustre*.

K extrakci a frakcionaci byla použita odvážená část sušené nadzemní části *Comarum palustre* (1 kg), která byla následně extrahována 60% ethanolem v lázni při teplotě 45 °C po dobu 60 minut (2-krát). Výsledný extrakt byl filtrován a odpařen ve vakuu při 40 °C. Mezi sloučeniny izolované pomocí HPLC patří: prokyanidin B1, prokyanidin B3, (+)-katechin, (-)-epikatechin, (-)-epigallokatechin, (-)-epigallokatechin-3-O-gallát, kyselina gallová, pedunculagin, potentillin, agrimoniin, 2-pyron-4,6-dikarboxylová kyselina, isoquercitrin, miquelianin, rutin, astragalin, kempferol-3-O-rhamnosid, nikotiflorin, tilirosid a kyselina ellagová.

Všechny izolované sloučeniny kromě (-)-epigallokatechin-3-O-gallátu a 2-pyron-4,6-dikarboxylové kyseliny byly nalezeny v *Comarum palustre* poprvé. Přítomnost kyseliny chebulinové v této studii nebyla potvrzena.

Podle HPLC bylo složení nadzemních a podzemních orgánů *Comarum palustre* podobné.

Dominantní sloučeninou v listech a květech byl agrimoniin s obsahem 121,57 a 151,54 mg/g, ve stoncích a kořenech převládal prokyanidin B3 a (+)-katechin s obsahem 24,93/20,66 a 18,00/11,92 mg/g. Srovnání koncentrací fenolových sloučenin v orgánech *Comarum palustre* ukázalo, že kořeny měly nejnižší obsah všech stanovovaných složek. To vedlo k závěru, že nadzemní část této rostliny by měla být používána jako náhrada za kořeny *Comarum palustre* [37].

8.1.15 *Fragaria vesca*

Název rostliny: *Fragaria vesca* L. – jahodník obecný

Čeleď: Rosaceae - růžovité

Popis: vytrvalá bylina

Původ: mírný pás severní polokoule

Fyziologické vlastnosti dietních přípravků bohatých na ellagotaniny, které byly získány z výlisků plodů *Fragaria* sp. za použití různých extrakčních metod

Cílem této studie bylo zjistit složení extraktů z *Fragaria* sp. bohatých na ellagotaniny získaných vodnou nebo acetonovou extrakcí (EF a EP příprava). Biologický účinek těchto extraktů byl hodnocen ve 4. týdnu nutričního pokusu na potkanech Wistar. Přípravky byly přidávány do diet obsahujících cholesterol, a které měly stejný obsah ellagotaninů (0,03 %). Pro měření odezvy zvířat byly hodnoceny parametry popisující cekální kvašení (koncentrace amoniaku a mastných kyselin s krátkým řetězcem, aktivita bakteriálních enzymů), lipoproteinový profil krevního séra a obsah látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) ve vybraných tkáních (srdce, játra, ledviny). Na rozdíl od polyfenolů obsahovala EF příprava včetně ellagotaninů (7,8 a 7,1 %) také vysoké množství rozpustné dietní vlákniny a jiných sacharidů (33,3 a 38,9 %), zatímco EP příprava se vyznačovala obsahem 58,9 % ellagotaninů, bez vlákniny a vysokým obsahem proanthokyanidinů (16,9 %). Ve srovnání s EF skupinou měla dietní léčba s EP silnější účinek na prostředí céka, což se projevilo snížením tráveniny v objemu, β -glukuronidasové aktivity a celkové koncentrace mastné kyseliny s krátkým řetězcem ($P < 0,05$ vs. skupina C bez ošetření). Obě přípravy snížily lipémii a glykémii. Mohlo by dojít k závěru, že acetonová extrakce z výlisků plodů *Fragaria* sp., která je účinnější, zvýšila obsah jak ellagotaninů tak proanthokyanidinů v přípravě polyfenolů, které pak způsobily silnější inhibiční účinek na cekální fermentační procesy a současně snížily krevní triacylglyceroly a hladinu glukosy. Vzhledem ke stejnému obsahu ellagotaninů v obou

suplementovaných dietách by se mohlo spekulovat také o tom, že výše uvedené účinky byly v důsledku přítomnosti proanthokyanidinové frakce.

Cílem této studie bylo zjistit účinnost dvou extrakčních metod polyfenolů z plodů *Fragaria* sp.: enzymově asistovaná vodná extrakce (EF příprava) a extrakce vodným roztokem acetonu (EP příprava), a následně vyhodnotit fyziologické účinky výsledných přípravků na gastrointestinální trakt a metabolismus potkanů.

Příprava ellagotaninových extraktů z plodů *Fragaria* sp.

Enzymově asistovaná vodná extrakce (EF příprava)

Hmota z *Fragaria* sp. (750 kg) byla připravena z koncentrované šťávy sušené ve vakuu při teplotě 70 ± 2 °C. Po vysušení byly výlisky (400 kg) odděleny na frakci semen (průměr 0,5 - 1,0 milimetr) a frakci bez pecek (průměr 1-3 mm). 1 - 3 frakce byly podrobeny enzymově asistované extrakci a to tak, že 225 kg z 1-3 frakcí výlisků bylo přidáno do 1500 litrů vody a 0,025 litrů enzymu celulasy - pektinasy, Tato enzymová extrakce probíhala při teplotě 65 ± 1 °C po dobu 90 min. Extrakt byl následně centrifugován. Další dvě extrakce byly provedeny jako předchozí, ale za použití 750 litrů vody. Získané vodné extrakty byly následně spojeny, filtrovány a koncentrovány do rozpustného pevného podílu. Poté se část vody lyofilizovala, což umožnilo získání čerstvého extraktu s obsahem ellagotaninové vlákniny.

Extrakce vodným roztokem acetonu a selektivní koncentrace na adsorbent (EP příprava)

Koncentrát vody a acetátů z ellagotaninů *Fragaria* sp. byl vyroben v laboratorním měřítku za použití 1,5 kg sušených výlisků *Fragaria* sp. bez pecek, které nebyly vystaveny enzymově asistované extrakci vodou a za použití 60% vodného roztoku acetonu (5 l na 1 kg výlisků). Extrakce byla provedena ve dvou stupních, při 25 °C po dobu 18 h. Dále, po částečném odstranění rozpouštědla destilací byly výsledné 5% roztoky podrobeny adsorpci za použití 500 g adsorbentu v koloně s průměrem 40 mm a výšce 1000 mm. Po vodné eluci sacharidových nečistot byly polyfenoly desorbovány s 10, 40 a 60% ethanolovými roztoky aplikovanými postupně v objemech 0,5, 1,0 a 2,0 litrů na 1 kg adsorbentu. Roztoky obsahující desorbované

polyfenoly z acetonové extrakce byly shromážděny ve frakcích, z nichž pouze eluáty bohaté na ellagotaniny byly zakoncentrovány na 15 % sušiny a lyofilizovány.

Chemická analýza polyfenolových extraktů

Stanovení obsahu polyfenolů, včetně ellagotaninů a volné kyseliny ellagové

Obsah volné kyseliny ellagové, součet ellagotaninů a dalších polyfenolů byl stanoven pomocí HPLC metody v roztocích ellagotaninových extraktů o koncentraci 1 až 5 mg/ml rozpouštědla. Extrakty byly podrobeny určitým technikám zpracování.

Chromatografická analýza byla provedena na chromatografu vybaveným odplyňovačem, dvěma čerpadly, mixérem, autosamplerem, termostatem a detektorem PDA. Separace byla provedena na koloně C18 a následně byly polyfenoly identifikovány pomocí standardů.

Analýza proanthokyanidinů a volných katechinů

Byla použita metoda degradace proanthokyanidinů v kyselém prostředí s předávkováním floroglucinolem.

Produkty z kyselé degradace proanthokyanidinů byly odděleny na chromatografu vybaveného UV-Vis detektorem a fluorescenčním detektorem (FD). Separace byla provedena na koloně C18. Identifikace sloučenin byla provedena na základě porovnávání retenčních časů a UV-Vis spekter standardů.

***In vivo* pokusy**

Pokus byl proveden u 24 samců potkanů Wistar starých 35 dní a váhou 99,2 g, jak bylo schváleno místní etickou komisí pro pokusy se zvířaty. Zvířata byla udržována při standardních podmínkách: teplota 21-22 °C a relativní vlhkost vzduchu 50-70 %, intenzivní větrání místností a 12-h osvětlení. Byly zaznamenávány individuální tělesné

hmotnosti a potravinový příjem. Pokus byl proveden ve 3 experimentálních skupinách po 8 potkaních samcích a každý pokus trval 4 týdny.

Při pokusech se podávaly diety s obsahem cholesterolu. Extrakty ellagotaninové vlákniny byly podávány ke stravě místo příslušného množství kukuřičného škrobu. Analyzované přípravky byly použity v potravě ve stejné dávce, dosažení 0,03 % součtu volné kyseliny ellagové a ellagotaninů byl vyjádřen na galoyl-di-HHDP-glukosu. Fruktooligosacharidy (FOS) byly aplikovány ve všech dietách jako vláknina s cílem zmírnit potenciál negativních účinků polyfenolů na fermentační funkce gastrointestinálního traktu. Obsah oligo-, di- a mono-sacharidů v přípravku byl potvrzen HPLC systémem vybaveným systémem dat, detektorem a kolonou naplněnou aminopropyl polymerem za použití mobilní fáze směsi acetonitrilu a vody (67-33 %), s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min při 20 °C. Analyzované složení FOS přípravku bylo následující: fruktosa 0,3 %, glukosa 0,4 %, sacharosa 2,3 %, kestosa 36 %, nystosa 49 % a fruktosylnystosa 12 %.

Experimentální postupy

Byly stanoveny individuální spotřeby krmiva a tělesné hmotnosti. Potkani byli drženi v klecích, které umožnily pravidelný sběr moči a posuzování diuretického účinku analyzovaných preparátů. Po 4 týdnech experimentu se potkani nechali přes noc vyhladovět, zvážit a anestetizovat pentobarbitalem sodným. Vzorky krve byly odebrány z ocasní žíly. Sérum se připravilo centrifugací při 1500 x g po dobu 15 min při 4 °C a bylo skladováno při -40 °C až do provedení analýzy. Koncentrace triacylglycerolu (TG), celkového cholesterolu (TC), HDL frakce cholesterolu (HDL-C) a glukosy v séru byly stanoveny pomocí komerčních diagnostických kitů. HDL-cholesterol byl měřen po selektivním vysrážení nízkou a velmi nízkou hustotou sérových lipoproteinů s polypropylenglykolem a následným odstraněním centrifugací (1500 x g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C). Aterogenní index (AI) stravy byl vypočten pro každé zvíře podle vzorce $AI = \log (TG/HDL)$. Potkani se pak usmrtili cervikální dislokací. Po laparotomii byly z každého potkana odebrány vybrané tkáně (játra, ledviny, srdce), jakož i segmenty gastrointestinálního traktu (tenké střevo, slepé střevo a tlusté střevo, včetně tráveniny). Tak jako co možná nejdříve po eutanázii (cca 10 min) byla u tenkého střeva, slepého střeva a tlustého střeva měřena hladina pH přímo za použití

mikroelektrod a pH/ION metru. Tenké střevo se zvážilo i s obsahem. Vzorky céka a kolonu byly okamžitě přeneseny do mikrozkušavek, které byly skladovány při -70 °C. Vybrané části gastrointestinálního traktu (slepé střevo a tlusté střevo) se propláchly čistým ledově-chladným fyziologickým roztokem, pak se přenesly na filtrační papír a nakonec se zvážily. Sušina z tenkého střeva a trávenina céka byla stanovena při 105 °C po dobu 4 h. V čerstvých vzorcích tráveniny céka, byl extrahován čpavek a zadržen v roztoku kyseliny borité. Aktivita bakteriálních enzymů (α - a β -glukosidasy, α - a β -galaktosidasy a β -glukuronidasy) uvolněná do prostředí céka byla měřena mírou uvolnění p- nebo o-nitrofenolu z jejich nitrofenylglukosidů. Enzymatická aktivita byla vyjádřena jako μmol produktu vytvořeného za h na g tráveniny. Vzorky tráveniny céka byly podrobeny plynové chromatografii (GC). Vzorky (0,2 g) byly smíchány s 0,2 ml kyseliny mravenčí, zředěny deionizovanou vodou a centrifugovány při 7211 x g po dobu 10 min. Supernatant byl pomocí injektoru nanesen na kapilární kolonu (30 m x 0,53 mm). Počáteční teplota byla 85 °C a byla zvýšena na 180 °C po 8 °C/min a udržována po dobu 3 min. Teploty plamenového ionizačního detektoru a injektoru byly 180 a 85 °C. Objem vzorku pro GC analýza byl 1 μl .

Produkty peroxidace lipidů v tkáni vnitřních orgánů (srdce, ledviny, játra) byly hodnoceny pomocí reakce s kyselinou thiobarbiturovou jako TBARS. TBARS byly stanoveny spektrofotometricky pomocí malondialdehydem stanovenou standardní křivkou. Výsledky byly vyjádřeny v nmol z TBARS na g tkáně nebo ml séra [38].

Chemická charakterizace a cytotoxický potenciál frakce bohaté na ellagotaniny z listů *Fragaria vesca*

Hepatocelulární karcinom, primární zhoubný nádor jater, má velmi špatnou prognózu a nižší míru přežití [39]. Kromě toho neúčinnost konvenčních terapií zdůrazňuje význam v objevování nových biologicky aktivních sloučenin. Několik studií jasně uvádí, že polyfenoly rostlinného původu, tedy ellagotaniny, mají několik zdravotních výhod. Listy z *Fragaria vesca* obsahují vysoké množství polyfenolů, obzvláště ellagotaninů. Cílem této studie bylo charakterizovat frakci obohacenou ellagotaniny (EEF) z listů *Fragaria vesca* a odhalit protinádorový potenciál této frakce

na buňky lidského hepatocelulárního karcinomu. Analýza EEF pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole spojené s ionizací elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-PDA-ESI/MS^N) umožnila etekovat 12 ellagotaninů. Životaschopnost buněk jak z EEF, tak z čerstvého extraktu byla stanovena po 24 h léčby buněk, také byla hodnocena polovina maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀). IC₅₀ EEF (113 μg/mL) byla asi 6-krát nižší než IC₅₀ čerstvého extraktu (690 μg/mL). Frakce obohacená ellagotaniny vyvolala zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a snížila proliferaci buněk v závislosti na dávce. Tato frakce také indukovala akumulaci proteinu LC3-II prostřednictvím blokace toku autofágů a inhibovala chymotrypsinu podobnou aktivitu 26S proteosomu. Tyto výsledky ukázaly, že frakce obohacená ellagotaniny z listů *Fragaria vesca* inhibovala jak autofágovou dráhu, tak i systém drah ubikvitin-proteosom, což jsou dva hlavní intracelulární systémy degradace proteinu, které jsou cílem pro protinádorové terapie. Navíc proteomická analýza umožnila identifikaci 914 proteinů, z nichž 133 po ošetření buněk s EEF bylo modulováno, většina z nich souvisí s metabolickými cestami. Mezi hlavní identifikované ellagotaniny patří **sanguiin H-10 isomer, isomery kastalagin/veskalagin, isomer sanguiin H-2, isomery kasuariktin/potentillin, isomer sanguiin H-6, agrimoniin a lambertianin**. Tato studie ukázala, že frakce obohacená ellagotaniny z listů *Fragaria vesca* snížila proliferaci buněk, inhibovala proteolytické mechanismy a modulovala metabolické dráhy buňky. Navíc tato studie poukazuje na to, že *Fragaria vesca* jako zdroj cenných molekul s protinádorovým potenciálem, naznačuje, že ellagotaniny, polyfenoly identifikované v této frakci, by mohly být užitečné při vývoji nových léčebných strategií proti karcinogenezi.

Vodný alkoholový extrakt z listů *Fragaria vesca* byl připraven ze suchých práškovaných listů, které byly vytřepány do dichlormethanu (2-krát). Extrakce byla provedena ethanolem (2-krát) a 50% vodným ethanolem (3-krát) při pokojové teplotě za použití homogenizátoru po dobu 5 min při 8000-9500 rpm. Ethanol a vodný alkoholový extrakt byly spojeny a odpařeny na rotační odparce na malý objem, a poté byly lyofilizovány. Tento extrakt byl uchováván při -20 °C do doby testování. Lyofilizovaný extrakt (3 g) byl získán 50% vodným methanolem a frakcionován pomocí gelové chromatografie s postupnou elucí 50% (2 l) a 75% vodného roztoku methanolu (2,5 l) a 70% vodného acetonu (1 l). Celý proces

frakcionace byl sledován pomocí HPLC. Strukturální identifikace polyfenolů z EEF byla provedena pomocí HPLC-PDA-ESI/MSⁿ.

Lidská buněčná linie karcinomu jater byla kultivována v modifikovaném médiu obsahujícím 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/mL streptomycinu. Buňky byly udržovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ ve vlhkém inkubátoru.

Účinek EEF na životaschopnost buněk/metabolické aktivity byl hodnocen podle Resazurin testu. Buňky (8×10^4 buněk) byly nanášeny na 96-jamkové destičky, v duplikátech, po dobu 12 h a následně byly inkubovány se sériovými koncentracemi EEF po dobu 24 h. Resazurin (50 µM) byl přidán k buňkám 1 h před záznamem fluorescence. Absorbance byla zaznamenána při 570 nm, s referenční vlnovou délkou 620 nm, za použití standardního spektrofotometru. V tomto testu metabolicky aktivní buňky změnilly resazurin (modré barvivo) na resorufin (růžová barva), proto jejich počet koreluje s velikostí redukce barviva. Životaschopnost buněk byla hodnocena na základě srovnání s neošetřenými buňkami. Poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) představuje koncentraci EEF nutnou pro inhibici 50 % životaschopnosti buněk a byla stanovena pomocí nelineární regrese [40].

8.1.16 *Rubus occidentalis*

Název rostliny: *Rubus occidentalis* L. – ostružiník ojíněný

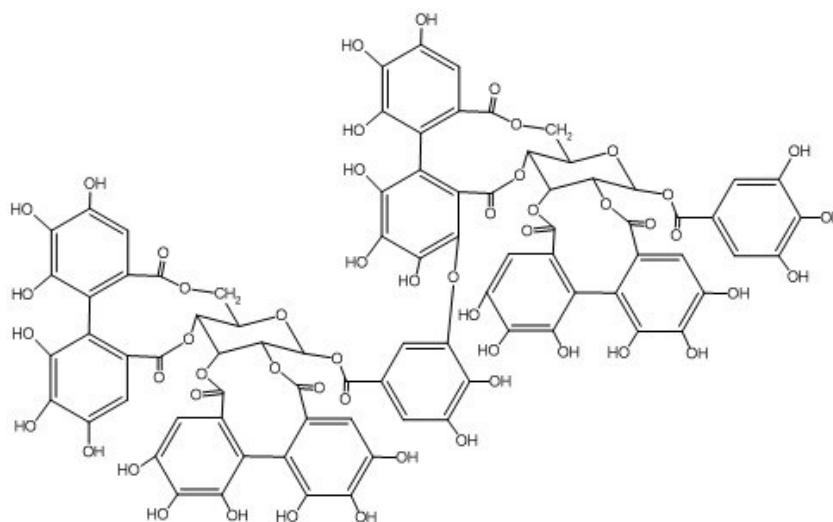
Čeleď: Rosaceae - růžovité

Popis: bylina

Původ: S Amerika

Chemopreventivní aktivita ellagotaninů a jejich derivátů ze semen plodů *Rubus occidentalis* na linii buněk HT-29 odvozených od karcinomu tlustého střeva

Semena plodů z *Rubus occidentalis* jsou hlavním odpadním produktem při zpracování ovoce. Tato semena jsou bohatá na ellagotaniny, které jsou v gastrointestinálním traktu hydrolyzovány na kyselinu ellagovou, která je dále metabolizována bakteriemi tlustého střeva na urolithin A (3,8-dihydroxy-6*H*-dibenzo [*b,d*] pyran-6-on: UA) a urolithin B (3-hydroxy- 6*H*-dibenzo [*b,d*] pyran-6-on: UB), které jsou biologicky dostupné v tlustém střevě a prostatě. V této studii se hodnotily protinádorové aktivity těchto sloučenin na HT-29 linii buněk odvozených od karcinomu tlustého střeva. ET, EA, UA a UB inhibovali proliferaci HT-29 buněk. EA způsobila mírné, ale významné zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a urolithiny zastavily buněčný cyklus ve fázi G2/M a zvýšily expresi proteinu p21. Apoptotické buňky byly detekovány pomocí Annexin V-FITC/PI testu, když byly ošetřeny sloučeninami. Narušení mitochondriálního membránového potenciálu a aktivace kaspas 8 a 9 ukázaly, že mohou být zapojeny jak vnější, tak i vnitřní apoptotické dráhy. Aktivace kaspasy 3 a štěpení poly (ADP-ribosa) polymerasy (PARP) potvrdily indukci apoptózy. ET, EA, UA a UB vykazovali protinádorovou aktivitu na HT-29 linii buněk odvozených od karcinomu tlustého střeva zastavením buněčného cyklu a indukcí apoptózy. Semena plodů z *Rubus occidentalis* měla antioxidantní, protizánětlivé a protinádorové účinky v *in vitro* a *in vivo* studiích. Ellagotaniny nalezené v semenech plodů *Rubus occidentalis* byly identifikovány jako **pedunculagin**, **sanguiin H6 (obr. 11)**, **isomery sanguiinu H10** a **isomer galloyl-bis-HHDP glukosy**. Tato studie naznačuje, že semena plodů z *Rubus occidentalis* by mohla být potenciálním zdrojem protinádorových ellagotaninů.



Obr. 11. Sanguin H-6

Semena plodů z *Rubus occidentalis* byla získána z výlisků po produkci vína. Následně se promývala vodou až dokud nezmizela viditelná barva. Semena se nechala vyschnout při pokojové teplotě, a poté se uložila do chladu při $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby extrakce.

Při extrakci a purifikaci ellagotaniinů ze semen plodů *Rubus occidentalis* dochází k tomu, že se semena rozdrtí na prášek a třikrát se extrahují 60% methanolem. Spojený extrakt se zfiltruje, odpaří a lyofilizuje. Lyofilizované extrakty se vloží do pryskyřice a promyjí se destilovanou vodou, aby se odstranily cukry a organické kyseliny. Poté se přidá methanol a získá se frakce bohatá na polyfenoly. Methanolvá frakce se vnese do kolony a eluuje se acetonem k získání frakce ellagotaniinů. Tato frakce se lyofilizuje a uloží při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do použití v dalších experimentech.

Pro kvantifikaci množství EA v semenech se vezme 5 g prášku semen, který se extrahuje 60% methanolem, vysuší se lyofilizací. K hydrolyzaci ellagotaniinů v extraktu se použije 0,5 ml roztoku, který se smísí s 7,5 ml kyseliny chlorovodíkové a zahřívá se po dobu 45 minut při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Množství EA přítomné v extraktu se změní za použití HPLC a celý proces se třikrát opakuje.

Čistota a struktura UA a UB byla potvrzena pomocí HPLC a ^1H a ^{13}C NMR.

Pro analýzu těchto sloučenin byla použita metoda HPLC s reverzní fází C18, kolonou (4 μm , 3,9 x 300 mm) a mobilní fází 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilem. Rychlost průtoku byla stanovena na 1 ml min^{-1} .

Lidské HT-29 linie buněk odvozené od karcinomu tlustého střeva byly získány z korejské buněčné linie.

Pro měření cytotoxicity ET, EA, UA a UB byl proveden MTT test. Absorbance byla měřena při 620 nm a 570 nm za použití čtečky mikrodestiček ELISA. Buňky byly vloženy do 6-jamkové destičky (3 x 10 buněk na jamku) a nechaly se vázat po dobu 24 h v 5 % CO_2 při 37 °C. Buňky byly ošetřeny testovanými sloučeninami po dobu 48 h a následně byly fixovány ledově chladným 70% ethanolem a skladovány při teplotě 4 °C až do analýzy. Před analýzou byly buňky dvakrát promyty ledově chladným fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem a inkubovány s RNázou A (10 mg ml^{-1}) a propidium jodidem (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Buněčné cykly byly analyzovány průtokovým cytometrem [41].

8.1.17 *Tellima grandiflora*

Název rostliny: *Tellima grandiflora* (Pursh) Dougl. ex Lindl. – mitrovka velkokvětá

Čeleď: Saxifragaceae - lomikamenovité

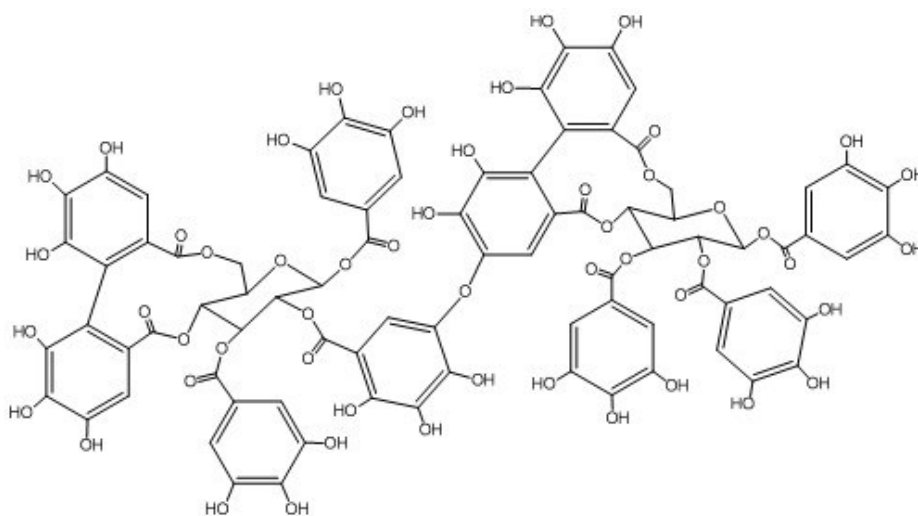
Popis: vytrvalá bylina

Původ: SZ Amerika, Evropa

Biosyntéza dimerního ellagotaninu, kornusiinu E, z *Tellima grandiflora*

První důkaz o *in vitro* syntéze dimerního ellagotaninu byl získán z buněčných extraktů plevele *Tellima grandiflora*. Částečně purifikované enzymové extrakty z listů této rostliny katalyzovaly oxidaci 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -D-glukosy na monomerní ellagotanin, tellimagrandin II, následovanou oxidačním spojením dvou jednotek tohoto meziprojektu za vzniku dimerního derivátu, **kornusiinu E** (obr. 12). K identifikaci

kornusiinu E z listů *Tellima grandiflora* byly použity chemická degradace, MALDI-TOF/ MS, ^1H a ^{13}C NMR a CD spektroskopie.



Obr. 12. Kornusiin E

Mladé listy (2-4 měsíců staré) z rostliny *Tellima grandiflora* vypěstované ve skleníku byly promyty destilovanou vodou a okamžitě byly použity jako zdroj enzymu, nebo byly zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ v evakuovaných plastových sáčcích, v kterých by mohly být uchovávány po dobu delší než 6 měsíců, aniž by došlo ke zjevné ztrátě aktivity enzymu.

Kornusiin E byl izolován z listů *Tellima grandiflora*, které byly sušeny přes noc při teplotě $30\text{ }^\circ\text{C}$, a poté byly na třepačce extrahovány 70% vodným acetonem při pokojové teplotě po dobu 3 dnů. Po odstranění acetonu rotační odparkou byla vodná fáze 5-krát promyta benzenem při $40\text{--}60\text{ }^\circ\text{C}$ a lyofilizována. 200 mg z pevného zbytku bylo rozpuštěno v 5 ml H_2O a podrobena semi-preparativní isokratické RP-HPLC analýze. Relevantní frakce byly zbaveny kyseliny a organického rozpouštědla rotačním odpařováním a lyofilizovány, čímž se získalo 50 mg o více jak 95% čistotě [42].

8.1.18 *Cunonia macrophylla*

Název rostliny: *Cunonia macrophylla* L. – kunonie

Čeleď: Cunoniaceae - kunoniovitě

Popis: keř, strom

Původ: Nová Kaledonie, J Afrika

Bioaktivní ellagotaniny z *Cunonia macrophylla*, endemická čeleď Cunoniaceae z Nové Kaledonie

Tato studie se zabývala bioaktivními účinky čerstvého methanolového extraktu z listů *Cunonia macrophylla*. Bioaktivní třísloviny byly v této čeledi detekovány poprvé. Ellagotaniny byly identifikovány jako **kyselina ellagová-4-O-β-D-xylopyranosid, mallorepanin, kyselina mallotusinová, korilagin, kyselina chebulová, kyselina ellagová a kyselina gallová**. Bylo prokázáno, že tyto ellagotaniny mají antimikrobiální aktivitu, a že inhibují xanthinoxidasu. Byly zkoumány antimikrobiální účinky na bakteriální lidské patogeny (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium accolans*), rostlinné patogeny (*Erwinia carotovora*), jakož i na lidské patogenní kvasinky (*Candida albicans*). Také byly hodnoceny a porovnány inhibiční účinky všech molekul na xanthinoxidasu. Kyselina ellagová-4-O-β-D-xylopyranosid vykazuje nejvyšší aktivitu a zdá se, že bude vzbuzovat zájem pro další studie.

K extrakci a izolaci bylo použito 300 g sušených listů z *Cunonia macrophylla*. Extrahovány byly za použití Soxhletova přístroje. Všechny získané extrakty byly zahuštěny ve vakuu při teplotě nižší jak 45 °C a byly testovány na antibiotický potenciál. Methanolový extrakt (50 g) byl suspendován ve vodě a rozdělen ethylacetátem a n-butanolem, čímž se postupně získalo 12,7 a 21,4 g v tomto pořadí a 15,5 g vodného roztoku. U všech izolovaných sloučenin se měřila UV spektra pomocí detektoru diodového pole (DAD) na přístroji HPLC a ¹H, ¹³C NMR spektra.

Antimikrobiální aktivity byly stanoveny pomocí diskového difúzního testu na kmenech lidských patogenních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium accolans*), rostlinných patogenů (*Erwinia carotovora*) a na lidských patogenních kvasinkách (*Candida albicans*). Petriho misky (průměr 9 cm) s agarem byly naočkovány s 24 h starými kulturami vybraných mikrobiálních kmenů. Extrakty

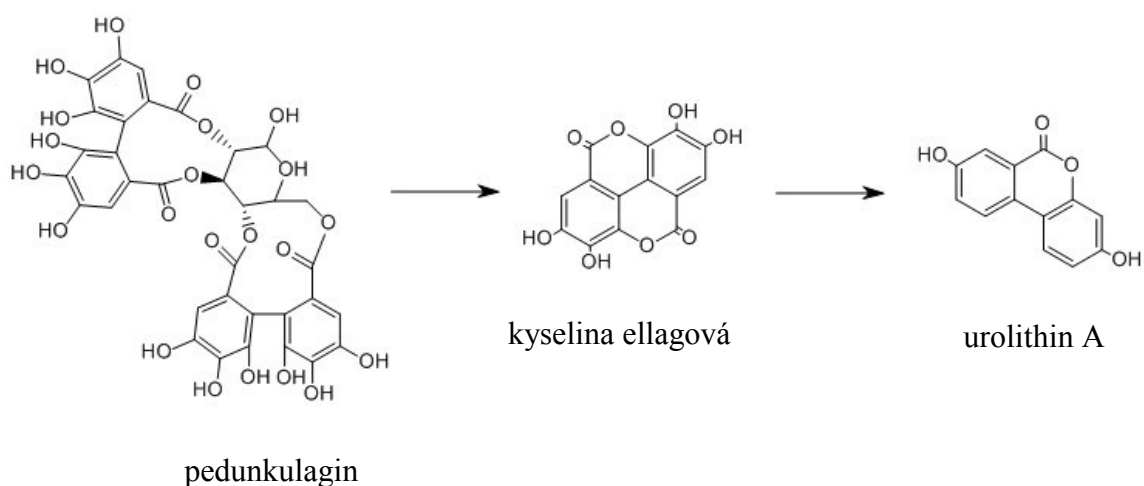
nebo čisté izolované sloučeniny byly naneseny na sterilní filtrační papír před jeho umístěním na povrch média. Jako negativní kontrola bylo použito rozpouštědlo. Standardní disky obsahující gentamycin sulfát (10 µg), antibiotikum se širokým spektrem, byly použity jako pozitivní kontrola na bakterie. V případě *Candida albicans* byl jako pozitivní kontrola použit nystatin (20 µg). Destičky byly inkubovány po dobu 24 h při teplotě 37 °C pro lidské patogeny a při teplotě 30 °C pro rostlinné patogeny. Posouzení antimikrobiální aktivity bylo založeno na průměru inhibičních zón vytvořených kolem disků. Byly provedeny čtyři nezávislé pokusy pro každý extrakt na čtyři různé desky pro každý kmen [43].

9. DISKUZE A ZÁVĚR

Hydrolyzovatelné třísloviny – gallotaniny se dělí do dvou skupin. Jsou to jednak polyestery kyseliny fenolkarboxylové (gallové nebo ellagové) a sacharidů. Patří sem gallotaniny a jejich kondenzační produkty – ellagotaniny. Druhou skupinou jsou nesacharidové estery fenolkarboxylových kyselin.

První skupina - estery s kyselinou gallovou, případně jejími deriváty, navážou na 1 molekulu sacharidu rozdílný počet molekul kyseliny gallové. Je to např. 1 molekula kyseliny v glukogalinu, 3 molekuly v β -hamamelitaninu, v tříslovině čínských duběnek je to 7 až 10 molekul kyseliny. Sacharidem bývá nejčastěji glukosa či hamamelitosa. Molekuly kyseliny gallové se na sebe vážou též navzájem, a to buď esterickou vazbou (kyselina m-digallová) nebo C-C vazbou (kyselina ellagová, hexahydroxydifenová) [44]. Jejich podrobnější rozdělení je uvedeno na začátku diplomové práce v kapitole Třísloviny (str. 12).

Jak už bylo zmíněno dříve, ellagotaniny v gastrointestinálním traktu podléhají hydrolyze za uvolnění kyseliny ellagové, která je poté mikrobiotou tlustého stěva metabolizována na urolithiny (obr. 13).



Obr. 13. Metabolismus ellagotaninu pedunkulaginu v gastrointestinálním traktu

Mým cílem bylo najít literární zdroje o výskytu ellagotaninů, jejich metabolismu a účincích na lidský organismus. Spektrum rostlin obsahujících tento typ látek je široké, jak je patrné z tabulky č. 1 ze str. 10. Nebylo v mých silách v rámci diplomé práce popsat všechny rostliny, které jsou zdrojem ellagotaninů, snažila jsem se proto vybrat rostliny na základě významných biologických aktivit. Jak je vidět, nejvíce zástupců mnou nalezených rostlin obsahujících ellagotaniny pochází z čeledi Lythraceae (kyprejovité), Myrtaceae (myrtovité) a Rosaceae (růžovité).

Většina odborných článků, z kterých jsem čerpala, popisuje, že příjem potravy bohaté na ellagotaniny (vlašské ořechy, granátová jablka) je zdraví prospěšné a slouží jako prevence chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění a některé typy rakoviny (např. rakovina úst, plic, prsu, jater, tlustého střeva).

Biologická aktivita ellagotaninů se odráží v jejich protizánětlivých, antiaterogenních, antitrombotických a antiangiogenních účincích.

Protinádorová aktivita ellagotaninů a jejich metabolitů je spojena s jejich schopností vylučovat volné radikály. Z tohoto důvodu, ellagotaniny snižují oxidační stres, který by jinak mohl vyvolat karcinogenezi a který je hlavní příčinou aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob. Mezi ellagotaniny s protinádorovými vlastnostmi patří např. geraniin, pedunculagin či agrimoniin [45].

U rakoviny prostaty byly prokázány antiproliferativní a proapoptotické účinky extraktů z *Punica granatum* působící na agresivní buňky PC3 karcinomu prostaty [46]. Snižená exprese cyklin-dependentních kinas 2, 4, 6 a cyklinů D1, D2 a E byly identifikovány jako mechanismy odpovědné za tyto účinky. Ale i např. extrakty z listů *Hibiscus sabdariffa*, které obsahují velké množství kyseliny ellagové, inhibují růst a vykazují expresi molekulových proteinů buněk LNCaP prostřednictvím aktivace mitochondriální dráhy [47]. Také bylo prokázáno, že methanolvý extrakt (70%) z plodů *Terminalia chebula* inhibuje proliferaci a indukuje buněčnou smrt v PC3 buňkách rakoviny prostaty. Při nízkých koncentracích tento extrakt podporoval iniciaci apoptotické buněčné smrti, zatímco u nekrozy s vyššími dávkami byl převládajícím typem zánik buněk. Kyselina chebulinová, kyselina tanninová a kyselina ellagová jsou nejsilnějšími cytotoxickými fenoly a pravděpodobně jsou odpovědné za protinádorovou aktivitu extraktů z *Terminalia chebula* [48].

Ellagotaniny punikalagin a kyselina ellagová z *Punica granatum* potlačují expresi cyklooxygenasy-2 (COX-2) v buňkách lidského karcinomu tlustého střeva (HT-29) a inhibují produkci prozánětlivých prostaglandinů [49]. Další studie uvádějí, že metabolity ellagotaninů tj. urolithiny A a C, inhibují proliferaci buněk HT-29 zastavením G0/G1 a G2/M fáze a následnou indukci apoptózy, takže se tyto látky jeví jako pozitivní při léčbě rakoviny tlustého střeva [50].

U rakoviny prsu ellagotaniny z *Punica granatum* blokují endogenní syntézu estrogenů inhibicí aktivity aromatasy. Mezi další rostliny bohaté na ellagotaniny, které vykazují antiproliferační účinky proti rakovinným buňkám prsu patří *Syzygium cumini* a *Eugenia jambolana* [51].

Dobrým zdrojem antioxidantů včetně vitamínů a ellagotaninů jsou zejména bobule (např. maliny, ostružiny, jahody). Mají totiž cytotoxické vlastnosti a vyvolávají apoptózu prooxidačním mechanismem v nádorových buňkách karcinomu dutiny ústní, jícnu a žaludku. Lyofilizovaná směs bobulí inhibuje iniciaci a progresi nádoru, regulují COX-2 a snižují hladinu prostaglandinu. Při této terapii nádorů se uplatňují především rostliny z čeledi Myrtaceae a Elaeagnaceae [52].

U hlavních složek z *Paeonia suffruticosa* a *Rhus chinensis* bylo prokázáno, že vykazují *in vitro* antiproliferační aktivity na lidském hepatocelulárním karcinomu. Růstový inhibiční účinek byl spojen se schopností vyvolat zástavu G0/G1 fáze [53]. Růst buněk hepatocelulárního karcinomu byl inhibován intraperitoneálním podáním korilaginu z *Phyllanthus urinaria*, proliferaci buněk inhiboval thonningianin A z *Thonningia sanguinea* [54].

Extrakt z *Phyllanthus watsonii* vyvolal apoptózu v transformovaných buňkách karcinomu děložního čípku. Malinové extrakty bohaté na ellagotaniny inhibují proliferaci buněk rakoviny děložního čípku (HeLa) v závislosti na dávce [55]. Kamelliin B izolovaný z rostliny *Gordonia axillaris* je dalším příkladem látky, který je užitečný při léčbě rakoviny děložního čípku. Kamelliin B totiž inhibuje růst HeLa buněk a indukuje kondenzaci chromatinu, což je charakteristický znak apoptózy. Extrakty z vlašských ořechů bohaté na tellimagrandin I a II mají cytotoxické účinky. Také bylo prokázáno, že kyselina ellagová indukuje zástavu G1 fáze [56].

U rakoviny plic bylo prokázáno, že extrakty z *Punica granatum*, *Syzygium cumini* a kasuarinin z kůry *Terminalia arjuna* vykazují antiproliferační a chemopreventivní účinky. Také punikalagin a kyselina ellagová vykazují

antimutagenní účinky, které tak zabraňují tvorbě DNA adduktů indukovaných benzo[a]pyrenem [57, 58].

Dlouhodobé vystavování pokožky UV záření je kauzálně spojeno s několika patologickými stavy. Extrakt z *Punica granatum*, který obsahuje velmi vysoké množství ellagotaninů, vykazuje významný ochranný účinek proti UV záření a patologickým důsledkům. Perorálně podávaný extrakt z *Punica granatum* obsahující 90 % kyseliny ellagové, díky své antioxidační aktivitě inhibuje pigmentaci kůže indukovanou vystavením UV záření. Tento extrakt snížil proliferaci melanocytů a syntézu melaninu prostřednictvím inhibice aktivity tyrosinasy [59, 60].

Závěrem k tomuto shrnutí o využití ellagotaninů při léčbě různých typů rakoviny lze konstatovat, že nejčastěji citovanou rostlinou je *Punica granatum*.

Na rozdíl od široce přijímaného názoru, že ellagotaniny, podobně jako ostatní obsahové látky rostlin mají chemopreventivní účinky existují i studie, které tvrdí opak. Taniny mohou být totiž toxické pro buňky a tkáně kvůli jejich schopnosti precipitovat bílkoviny, inhibovat enzymy a kvůli jejich vazebním vlastnostem s minerály. Dále bylo zjištěno, že vodno-ethanolový extrakt z *Punica granatum* vykazuje mutagenní a genotoxické účinky [61].

V jiné studii bylo uvedeno, že ellagotaniny působí jako inhibitory α -glukosidasy, a proto jsou navrženy jako adjuvantní činidla při léčbě DM typu 2. S tím souvisí, že konzumace jakéhokoliv inhibitoru α -glukosidasy může za normálních okolností způsobit gastrointestinální potíže, plynatost a průjemy [62, 63]. Nicméně podle mnoha dalších studií, neexistuje žádná zpráva o takovýchto vedlejších účincích, které jsou kauzálně spojeny s konzumací potravin bohatých na ellagotaniny [60].

Nelze opomenout skutečnost, že v některých případech je účinnější celkový extrakt než čistá látka. Jedno zdůvodnění lze nalézt např. v článku autora Schepetkina a dalších spoluautorů.

Oenothein B je hlavní složkou extraktů z *Epilobium* a může být přítomen v koncentracích vyšších jak 14 % (9 μ M na 100 μ g/ml extraktu), ačkoli tyto koncentrace se mezi druhy liší. Např. u *Epilobium angustifolium* je koncentrace oenotheinu B 4,5 %. Zatím ale nebylo stanoveno, zda se tyto koncentrace liší v různých oblastech světa nebo mezi různými šaržemi rostlin. Pomocí různých testů

(např. na myších buňkách, ale i lidských neutrofilech atd.) bylo zjištěno, že extrakty z *Epilobium angustifolium* indukují intracelulární tok vápenatých iontů, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), chemotaxi a produkci cytokinů v kvalitativně podobných vzorcích jako purifikovaný oenothin B, což podporuje závěr, že oenothin B je skutečně aktivní složkou těchto extraktů. Důvody diskutovaného rozdílu jsou nejasné, avšak toto pozorování je podpořeno studiemi od Kisse a kolektivu, kteří prokázali, že extrakt z *Epilobium angustifolium* je přibližně 10-násobně účinnější než čistý oenothin B při indukcii neutrální endopeptidasové aktivity v buňkách rakoviny prostaty. Jednou z možností je, že další složky v extraktu mohou přispět ke zvýšení biologické dostupnosti nebo stability oenothinu B. Například rozpustnost aktivní složky v čerstvém extraktu může být často snížena, když je složka purifikována. Je také možné, že některé reaktivní skupiny se během purifikace mění a tím ovlivňují aktivitu. Tyto otázky jsou však v současné době předmětem výzkumů [64].

Málo probádaná je doposud antimykobakteriální aktivita ellagotaninů. Na jeden zajímavý článek od autorů Fyhrquista a Laaksa jsem při řešerši narazila a doplnila bych tuto aktivitu jako další, která byla u těchto látek prokázána.

Z pěti druhů dřevin *Terminalia* nasbíraných v Tanzanii bylo hodnoceno deset čerstvých extraktů a jejich frakcí na antimykobakteriální účinky za použití *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468 jako modelového organismu. Hodnotili se antimykobakteriální účinky z extraktů kořene a kmenové kůry *Terminalia sambesiaca* a *Terminalia kaiserana*, z extraktů plodů *Terminalia stenostachya* a z extraktů listů *Terminalia spinosa*. *T. sambesiaca* dosáhla nejlepších účinků, co se týkalo methanolového extraktu, kde byl stanoven nejvyšší obsah ellagotaninů a glykosidů kyseliny ellagové. Extrakty z kořenů *T. sambesiaca* jsou bohaté na ellagotaniny a glykosidy kyseliny ellagové. Na rozdíl od polárnějších frakcí, chloroformový rozpustný podíl kořenů *T. sambesiaca* byl zbaven antimykobakteriální aktivity. Také čerstvé methanolové a vodné extrakty z kmenové kůry *T. sambesiaca* měly dobré antimykobakteriální účinky (MIC = 1250 µg/ml). Další účinné byly extrakty z kořenů *T. kaiserana*, *Terminalia sericea*, z plodů i listů *T. stenostachya*. Tyto výsledky poukazují na využití tekutých odvarů kořenů *T. kaiserana* pro léčbu kašle, což je jeden z příznaků tuberkulózy (TBC).

Standardizované extrakty z kořenů *T. sambesiaca*, *T. kaiserana* a *T. sericea* by mohly být použity jako snadno dostupná a levná léčiva pro léčbu TBC ve vzdálených oblastech východní a jižní Afriky [65].

Na závěr bych chtěla podotknout, že je třeba dalších studií, jelikož současný výzkum v oblasti protinádorové, antiradikálové a antimykotické aktivity ellagotaninů je nedostatečný. Sice vědecké zprávy ukazují na vzájemný vztah mezi konzumací potravin bohatých na ellagotaniny a inhibicí vzniku nádorového onemocnění, ale mechanismus tohoto procesu není dosud dostatečně objasněn.

V současné době ale existuje již celá řada komerčně dostupných extraktů z léčivých rostlin, které obsahují kyselinu ellagovou nebo ellagotaniny (např. extrakt z *Punica granatum*) a jsou tak k dispozici pro preventivní opatření.

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

„r“ = korelační koeficient

ABTS = 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina

A β = β -amyloid

AI = aterogenní index

CAM = chorioalantoidní membrána

CGRP = peptid příbuzný genu kalcitoninu

COX = cyklooxygenasa

CPA = cyklofosfamid

DAD, PDA = detektory s diodovým polem

DHHP = kyselina dehydrohexahydroxydifenová

DM = diabetes mellitus

DMSO = dimethylsulfoxid

DPPH = 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl

EA = kyselina ellagová

EC₅₀ = 50% účinná koncentrace

ECD = detektor elektronového záchytu

ECF = frakce z Eucalyptus citriodora

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

EEF = frakce obohacená ellagotaniny

EF = vodná extrakce

ELISA = enzymová imunoanalýza na pevné fázi

EP = acetonová extrakce

ESI = ionizace elektrosprejem

ET = ellagotaniny

EtOAc = ethylacetát

EtOH = ethanol

FD = fluorescenční detektor

FOS = fruktooligosacharidy

GC = plynová chromatografie

GSH = glutathion

H₂O = voda

HbA_{1c} = glykovaný hemoglobin

HCl = kyselina chlorovodíková

HDL = lipoprotein o vysoké hustotě

HHDP = kyselina hexahydroxydifenová

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-DAD-ESI-MS = vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole spojená s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií

HRESI = elektrosprej s vysokým rozlišením

HT-29 = linie buněk odvozených od karcinomu tlustého střeva

CHCl₃ = chloroform

i. p. = intraperitoneální

IC₅₀ = 50% inhibiční koncentrace

IČ = infračervená spektroskopie

IL = interleukin

LNCaP = na androgen senzitivní buňky adenokarcinomu prostaty

LO = lipoxygenasa

MALDI = desorpce laserem za účasti matrice

MDA = malondialdehyd

MeOH = methanol

MIC = minimální inhibiční koncentrace

MN = mikrojádra

MS/MS = tandemová hmotnostní spektrometrie

MTT = 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

NMR = nukleární magnetická rezonance

NO = oxid dusnatý

ORAC = absorpční kapacita kyslíkových radikálů

p21 = protein

PARP = poly (ADP-ribosa) polymerasy

PC12 = feochromocytární buňky krysí dřeně nadledvin

PC3 = buňky adenokarcinomu prostaty

ROS = reaktivní formy kyslíku

RP-HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

rpm = otáčky za minutu

SOD = superoxiddismutasa

TBARS = reaktivní látky s kyselinou thiobarbiturovou

TBC = tuberkulóza

TC = celkový cholesterol

TG = triacylglycerol

TLC = tenkovrstvá chromatografie

TLR = Toll-like receptoru

TNF- α = tumor nekrotizující faktor

TOF = analyzátor doby letu

UA = urolithin A

UDP = uridindifosfát

UV/VIS = ultrafialová/viditelná oblast

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. A - kyselina gallová, B - kyselina hexahydroxydifenová, C - kyselina ellagová	13
Obr. 2. Monomerní ellagotaniny: A - geraniin, B - tellimagrandin I, C - tellimagrandin II	14
Obr. 3. Oligomerní ellagotanin: agrimoniin.....	14
Obr. 4. C-glykosidické ellagotaniny: A - kastalagin, B – veskalagin	15
Obr. 5. Flavan-3-ol.....	15
Obr. 6. Metabolismus ellagotaninů a kyseliny ellagové vyvolaný gastrointestinální mikrobiotou	17
Obr. 7. Punikalagin	27
Obr. 8. Lagerstroemin	30
Obr. 9. Pedunkulagin	35
Obr. 10. Oenothein B	40
Obr. 11. Sanguiin H-6	54
Obr. 12. Kornusiin E	56
Obr. 13. Metabolismus ellagotaninu pedunkulaginu v gastrointestinálním traktu.....	59

12. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Lipińska L., Klewicka E., Sójka M., The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review, *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* 2014, 13 (3): 289-299
- [2] Mertens-Talcott S. U., Jilma-Stohlawetz P., Rios J., Hingorani L., Derendorf H., Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54 (23): 8956-8961
- [3] Qiu Z., Zhou B., Jin L., Yu H., Liu L., Liu Y., Qin C., Xie S., Zhu F., *In vitro* antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells, *Food and Chemical Toxicology* 2013, 59: 428-437
- [4] Ashok P. K., Upadhyaya K., Tannins are Astringent, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2012, 1(3): 45-50 ISSN 2278- 4136
- [5] Jahodář L., Farmakobotanika: semenné rostliny, *Karolinum* 2009, 2nd edition, 264 pp. ISBN 978-8024617916
- [6] Bruneton J., Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, *Intercept* 1999, 2nd edition, 1119 pp. ISBN-13: 978-1898298632
- [7] Landete J. M., Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health, *Food Research International* 2011, 44 (5): 1150-1160
- [8] Mansour R. B., Ksouri W. M., Cluzet S., Krisa S., Richard T., Ksouril R., Assessment of antioxidant activity and neuroprotective capacity on PC12 cell line of *Frankenia thymifolia* and related phenolic LC-MS/MS identification, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2016, 1 (2): 1-8
- [9] Orabi M. A. A., Taniguchi S., Hatano T., Monomeric and dimeric hydrolysable tannins of *Tamarix nilotica*, *Phytochemistry* 2009, 70 (10): 1286.1293

- [10] Orabi M. A. A., Taniguchi S., Sakagami H., Yoshimura M., Amakura Y., Hatano T., Hydrolyzable tannins of Tamaricaceous plants. 7. Structures and cytotoxic properties of oligomeric ellagitannins from leaves of *Tamarix nilotica* and cultured tissues of *Tamarix tetrandra*, *Journal of Natural Products* 2016, 79: 984-995
- [11] Bjorøy O., Fossen T., Andersen O. M., Anthocyanin 3-galactosides from *Cornus alba* “Sibirica” with glucosidation of the B-ring, *Phytochemistry* 2007, 68 (5): 640–645
- [12] Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P., Koul H. K., Role of oxidative stress in prostate cancer, *Cancer Letters* 2009, 282 (2): 125–136
- [13] Park K. H., Yin J., Yoon K. H., Hwang Y. J., Lee M. W., Antiproliferative effects of new dimeric ellagitannin from *Cornus alba* in prostate cancer cells including apoptosis-related S-phase arrest, *Molecules* 2016, 21 (2): 137
- [14] Ascacio-Valdés J., Burboa E., Aguilera-Carbo A. F., Aparicio M., Pérez-Schmidt R., Rodríguez R., Aguilar C. N., Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisyphilitica* Zucc, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013, 3 (1): 41-46
- [15] Küpeli E., Yesilada E., Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures, *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 112 (3): 524–530
- [16] Barrajon-Catalán E., Fernández-Arroyo S., Saura D., Guillén E., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A., Micol V., Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells, *Food and Chemical Toxicology* 2010, 48 (8-9): 2273–2282
- [17] Barrajon-Catalán E., Fernández-Arroyo S., Roldán C., Guillén E., Saura D., Segura-Carretero A., Micol V., A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship, *Phytochemical Analysis* 2011, 22 (4): 303-312
- [18] Solon S., Lopes L., de Sousa-Junior P. T., Schmeda-Hirschmann G., Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*, *Journal of Ethnopharmacology* 2000, 72 (1-2): 173–178

- [19] Carneiro C. C., da Costa Santos S., de Souza Lino R. Jr., Bara M. T. F., Chaibub B. A., de Melo Reis P. R., Chaves D. A., da Silva A. J. R., Silva L. S., de Melo e Silva D., Chen-Chen L., Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016, 310: 1-8
- [20] Hayashi T., Maruyama H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaki K., Tanaka T., Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells, *Planta Medica* 2002, 68 (2): 173-175
- [21] El-Toumy S. A. A., Rauwald H. W., Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood, *Phytochemistry* 2002, 61 (8): 971-974
- [22] Packova D., Carbonell-Barrachina A. A., Kolesarova A., Ellagitannins-compounds from pomegranate as possible effector in steroidogenesis of rabbit ovaries, *Journal of the Physiological Research* 2015, 64 (4): 583-585
- [23] Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits, *Journal of Chromatography* 2000, 896 (1-2): 87– 93.
- [24] Clifford M. N., Scalbert A., Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80 (7): 1118-1125.
- [25] Seeram N. P., Lee R., Heber D., Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice, *Clinica Chimica Acta* 2004, 348 (1-2): 63-68
- [26] Al-Sayed E., El-Naga R. N., Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide, *Phytomedicine* 2015, 22 (1): 5-15
- [27] Kaneshima T., Myoda T., Nakata M., Fujimori T., Toeda K., Nishizawa M., Antioxidant activity of C-glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*), *LWT – Food Science and Technology* 2016, 69: 76-81

- [28] Hamill F. A., Apio S., Mubiru N. K., Mosango M., Bukenya-Ziraba R., Maganyi O. W., Soejarto D. D., Traditional herbal drugs of southern Uganda, *Journal of Ethnopharmacology* 2000, 70: 281–300
- [29] Nguyen T. L., Rusten A., Bugge M. S., Malterud K. E., Diallo D., Paulsen B. S., Wangensteen H., Flavonoids, gallotannins and ellagitannins in *Syzygium guineense* and the traditional use among Malian healers, *Journal of Ethnopharmacology* 2016, 192: 450-458
- [30] Baert N., Pellikaan W. F., Karonen M., Salminen J. P., A study of the structure-activity relationship of oligomeric ellagitannins on ruminal fermentation *in vitro*, *Journal of Dairy Science* 2016, 99 (10): 8041-8052
- [31] Lipińska L., Klewicka E., Sójka M., The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 2014, 13 (3): 289–299
- [32] Piwowarski J. P., Granica S., Zwierzyńska M., Stefańska J., Schopohl P., Melzig M. F., Kiss A. K., Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials, *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 155 (1): 801–809
- [33] Rosas-Piñón Y., Mejía A., Díaz-Ruiz G., Aguilar M. I., Sánchez-Nieto S., Rivero-Cruz J. F., Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections, *Journal of Ethnopharmacology* 2012, 141 (3): 860–865
- [34] Granica S., Piwowarski J. P., Kiss A. K., Ellagitannins modulate the inflammatory response of human neutrophils *ex vivo*, *Phytomedicine* 2015, 22 (14): 1215-1222
- [35] Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Olennikov D. N., Agrimoniin, an active ellagitannin from *Comarum palustre* herb with anti- α -glucosidase and antidiabetic potential in streptozotocin-induced diabetic rats, *Molecules* 2017, 22: 73
- [36] Buzuk G. N., Lovkova M. Y., Ershik O. A., Sokolova S. M., A new source of Proanthocyanidins with antiarthritic activity: Purple marshlocks (*Comarum palustre* L.) rhizome and roots, *Doklady Biochemistry and Biophysics*.2008, 421 (1): 211-213

- [37] Olennikov D. N., Ellagitannins and other phenolic compounds from *Comarum palustre*, *Chemistry of Natural Compounds* 2016, 52 (4): 721-723
- [38] Juskiwicz J., Krol B., Kosmala M., Milala J., Zdunczyk Z., Zary-Sikorska E., Physiological properties of dietary ellagitannin-rich preparations obtained from strawberry pomace using different extraction methods, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2015, 65 (3): 199-209
- [39] Lin S., Hoffmann K., Schemmer P., Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review, *Liver Cancer* 2012, 1 (3-4): 144–158
- [40] Liberal J., Costa G., Carmo A., Vitorino R., Marques C., Domingues M. R., Domingues P., Gonçalves A. C., Alves R., Sarmiento-Ribeiro A. B., Girão H., Cruz M. T., Batista M. T., Chemical characterization and cytotoxic potential of an ellagitannin-enriched fraction from *Fragaria vesca* leaves, *Arabian Journal of Chemistry* 2015, in press
- [41] Cho H., Jung H., Lee H., Yi H. C., Kwak H. K., Hwang K. T., Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells, *Food & Function* 2015, 6 (5): 1675-1683
- [42] Niemetz R., Schilling G., Gross G. G., Biosynthesis of the dimeric ellagitannin, cornusiin E, in *Tellima grandiflora*, *Phytochemistry* 2003, 64 (1): 109-114
- [43] Fogliani B., Raharivelomanana P., Bianchini J. P., Bouraïma-Madjèbi S., Hnawia E., Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia, *Phytochemistry* 2005, 66 (2): 241-247
- [44] Niemetz R., Gross G. G., Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis, *Phytochemistry* 2005, 66 (17): 2001-2011
- [45] Larrosa M., García-Conesa M. T., Espín J. C., Tomás-Barberán F. A., Ellagitannins, ellagic acid and vascular health, *Molecular Aspects of Medicine* 2010, 31 (6): 513-539
- [46] Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N., Mukhtar H., Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005, 102 (41): 14813–14818

[47] Walia H., Arora S., Terminalia chebula - a pharmacognostic account, *Journal of Medicinal Plants Research* 2013, 7 (20): 1351-1361

[48] Saleem A., Husheem M., Harkonen P., Pihlaja K., Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit, *Journal of Ethnopharmacology* 2002, 81 (3): 327–336

[49] Adams L. S., Seeram N. P., Aggarwal B. B., Takada Y., Sand D., Heber D., Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54 (3): 980–985

[50] Sharma M., Li L., Celver J., Killian C., Kovoov A., Seeram N. P., Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58 (7): 3965–3969

[51] Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B., Lansky E., Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment* 2002, 71 (3): 203–217

[52] Bishayee A., Haskell Y., Do C., Siveen K. S., Mohandas N., Sethi G., Stoner G. D., Potential benefits of edible berries in the management of aerodigestive and gastrointestinal tract cancers: Preclinical and clinical evidence, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016, 56 (10): 1753-1775

[53] Yin S., Dong Y., Li J., Lü J., Hu H., Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces senescence-like terminal S-phase arrest in human hepatoma and breast cancer cells, *Molecular Carcinogenesis* 2011, 50 (8): 592–600

[54] Zhang T-T., Yang L., Jiang J.-G., Effects of thoningianin A in natural foods on apoptosis and cell cycle arrest of HepG-2 human hepatocellular carcinoma cells, *Food & Function* 2015, 6: 2588–2597

- [55] Ross H. A., McDougall G. J., Stewart D., Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts, *Phytochemistry* 2007, 68 (2): 218–228
- [56] Le V., Esposito D., Grace M. H., Ha D., Pham A., Bortolazzo A., Bevens Z., Kim J., Okuda R., Komarnytsky S., Lila M. A., White J. B., Cytotoxic effects of ellagitannins isolated from walnuts in human cancer cells, *Nutrition and Cancer* 2014, 66 (8): 1304-1314
- [57] Zahin M., Ahmad I., Gupta R. C., Aqil F., Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts, *Biomedical Research International* 2014, 2014: 465-467
- [58] Aqil F., Gupta A., Munagala R., Jeyabalan J., Kausar H., Sharma R. J., Singh I. P., Gupta R. C., Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry), *Nutrition and Cancer* 2012, 64 (3): 428–438
- [59] Yoshimura M., Watanabe Y., Kasai K., Yamakoshi J., Koga T., Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet induced pigmentation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2005, 69 (12): 2368–2373
- [60] Ismail T., Calcabrini C., Diaz A. R., Fimognari C., Turrini E., Catanzaro E., Akhtar S., Sestili P., Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy, *Toxins* 2016, 8 (5): 151
- [61] Mennen L. I., Walker R., Bennetau-Pelissero C., Scalbert A., Risks and safety of polyphenol consumption, *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005, 81 (1): 326-329
- [62] McDougall G. J., Shpiro F., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D., Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53: 2760–2766
- [63] Godbout A., Chiasson J. L., Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Current Diabetes Reports*.2007, 7 (5): 333–339

[64] Schepetkin I. A., Kirpotina L. N., Jakiw L., Khlebnikov A. I., Blaskovich C. L., Jutila M. A., Quinn M. T., Immunomodulatory activity of oenothien B isolated from *Epilobium angustifolium*, *Journal of Immunology* 2009, 183 (10): 6754-6766

[65] Fyhrquist P., Laakso I., Marco S. G., Julkunen-Tiitto R., Hiltunen R., Antimycobacterial activity of ellagitannin and ellagic acid derivate rich crude extracts and fractions of five selected species of *Terminalia* used for treatment of infectious diseases in African traditional medicine, *South African Journal of Botany* 2014, 1-16

Všechny vzorce jsem nakreslila v programu ChemDraw Professional 16.0.