

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**ANTIPROTOZOÁLNÍ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH LÁTEK**

**(Diplomová práce)**

**ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF NATURAL SUBSTANCES**

**(Diploma thesis)**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová Ph.D.**

**Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ 2016**

**Lenka Nechanická**

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za pomoc při zpracování této diplomové práce, za její čas, vedení a rady. Dále děkuji své rodině, která mě podporovala během celého studia.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 292.

**Prohlášení:**

"Prohlašuji, že tato diplomová 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 využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2016

.....

# OBSAH

---

1. ÚVOD .....	6
1.1. Prvoci .....	6
1.2. Tradiční čínské medicína (TČM) .....	8
1.3. Cíl práce .....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> (Nanney & McCoy) .....	11
2.1.1. Zařazení .....	12
2.1.2. Charakteristika .....	13
2.1.3. Růst a výživa .....	14
2.2. Rostliny .....	14
2.2.1. <i>Salvia officinalis</i> L. ....	14
2.2.2. <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> (Mill.) Gaud .....	18
2.2.3. <i>Evodia rutaecarpa</i> L. ....	22
2.2.4. <i>Coptis chinensis</i> L. (Franch.) .....	25
2.2.5. <i>Zanthoxylum nitidum</i> L. ....	28
2.2.6. <i>Zizyphus jujuba</i> L. ....	32
2.3. Metoda MTT .....	35
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
3.1. Použitý materiál .....	37
3.1.1. Testovaný organismus .....	37
3.1.2. Použité chemikálie .....	37
3.1.3. Vybavení .....	38
3.2. Pracovní postup .....	39
3.2.1. Příprava extraktů .....	39
3.2.2. Příprava suspenze s <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	40
3.2.3. Příprava média .....	40
3.2.4. Příprava vzorků .....	41
3.3. Vlastní provedení testů a vyhodnocení .....	41
4. VÝSLEDKY .....	45
4.1. Extrakt č. 1 získaný z rostl. části <i>Salvia officinalis</i> .....	46

4.2. Extrakt č. 2 získaný z rostl. části <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> .....	47
4.3. Extrakt č. 3 získaný z rostl. části <i>Evodia rutaecarpa</i> .....	48
4.4. Extrakt č. 4 získaný z rostl. části <i>Coptis chinensis</i> .....	49
4.5. Extrakt č. 5 získaný z rostl. části <i>Zanthoxylum nitidum</i> .....	50
4.6. Extrakt č. 6 získaný z rostl. části <i>Ziziphus jujuba</i> .....	51
5. DISKUSE.....	52
6. ZÁVĚR.....	59
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	61
Abstrakt .....	68
Abstract.....	69

# 1. ÚVOD

## 1.1. Prvoci

Termín protozoa neboli prvoci začal být používán už v roce 1845 Carlem Theodorem von Sieboldem, který definoval prvoky jako živočichy na úrovni buňky. Za objevitele jednobuněčných živočichů je pokládán Anthony van Leeuwenhoek, který v 17. století sestrojil první mikroskop a pomohl sledování těchto mikroskopických organismů. Označení protozoa zahrnuje převažující skupinu nálevníků, ale také žahavce, houby a mechovky (Hausmann, Hülsmann, 2003).

Mezi prvoky najdeme autotrofy, heterotrofy nebo mixotrofní organismy. Příjem nezbytných látek pro život může probíhat pinocytósou nebo fagocytósou. Pinocytósa neboli buněčné pití umožňuje příjem tekutých živin a fagocytósou jsou přijímány části potravy. Nálevníci využívají cilií k vytvoření vodního proudu pomocí něhož si potravu nasměrují k ústnímu otvoru. Potravní vakuoly vznikají vchlípením membrány, ve které je potrava ohraničena. Podmínkou tvorby vakuoly je nepřítomnost části kortexu, tak aby vakuola mohla vzniknout. Na tvorbě membrány potravní vakuoly se podílí stovky vezikul, které vznikají díky Golgiho aparátu a obsahují trávicí enzymy. Samotné trávení se uskutečňuje splýváním vezikul a potravními vakuoly (Hausmann, Hülsmann, 2003).

Většina prvoků mírného pásma je kosmopolitní. Vyskytují se na různých stanovištích a pro jejich život je nezbytné alespoň malé množství vody. Na zcela suchých místech nejsou přizpůsobeny žít. Mnozí prvoci jsou schopny tvorby cyst, v nichž jsou schopny přežít a mohou být odolné i vůči mrazu. Díky své velikosti si vystačí s malým množstvím kyslíku (Hausmann, Hülsmann, 2003).

Do skupiny nálevníků v dnešní době patří okolo 8000 druhů. Jejich hlavními společnými rysy jsou kortex, jaderný dualismus a konjugace. Kortex udržuje tvar těla nálevníků a je asi 1 - 4 $\mu$ m silný. Je složen z pelikuly a ciliárních kořenů. Buněčná membrána patří k pelikule a těsně pod ní se nachází membránové alveoly, které jsou většinou druhově specifické a mohou kortex více zpevnit. K pelikule se řadí bílkovinná

epiplazma a spolu s pásy mikrotubulů dává kortexu větší oporu. V kortex se nachází extrusomy, myonemy, mitochondrie, endoplazmatické retikulum. (Hausmann, Hülsmann, 2003).

Diploidní micronucleus je nositelem genetické informace zatímco větší macronucleus umožňuje chod buňky. DNA prvků se nachází v chromatinu společně s histony. U *Tetrahymena thermophila* bylo identifikováno 5 histonů stejně tak nalezených u živočichů. Histony nálevníků se však odlišují od histonů živočichů v pořadí aminokyselin. Somatické jádro je také nositelem mnohonásobných kopií genetických informací. Konkrétně v macronucleu *Tetrahymena thermophila* je až několikanásobně větší obsah DNA než v micronucleu (Hausmann, Hülsmann, 2003). Hlavním procesem rozmnožování je konjugace, při které po spojení dvou jedinců téhož druhu, dojde k vytvoření cytoplazmatického můstku (<http://www.ucmp.berkeley.edu>). Schopnost nálevníka konjugace může být ovlivněno světlem, teplotou nebo složením média. Buňky se nejprve spojí svými brvami a až za několik hodin splynou. Spojením buněk dojde k iniciaci jaderného dělení. Micronucleus se meioticky a mitoticky dělí za vzniku dvou haploidních jader tzv. původního a migrujícího. Migrující jádra přejdou přes můstek do druhé buňky, kde splynou s původním jádrem. Vzniká diploidní synkaryon a buňky se od sebe vzdálí. Synkaryon je označení pro jádro, které vzniklo splnutím dvou jader z různých buněk. V průběhu konjugace macronucleus zaniká a nový vzniká z diploidního jádra, které se dále mitoticky dělí a poskytuje jádra nová. Při buněčném dělení somatické jádro putuje do roviny dělení, tam se rozprostře stejnoměrně mezi dceřinými buňkami a oddělí se na poloviny před rozdělením dceřiných buněk (Hausmann, Hülsmann, 2003). Po konjugaci získá každý obrvený jedinec novou genetickou informaci a každé další generace přinesou další kombinace genů. Konjugace je vlastně nezbytná pro přežití těchto druhů, neboť způsob nepohlavního dělení není možný donekonečna (<http://www.ucmp.berkeley.edu>).

## 1.2. Tradiční čínské medicína (TČM)

Vzhledem k použitým rostlinám v této práci bych se ráda zmínila o tradiční čínské medicíně, která využívá metody celostní medicíny. Její význam v dnešní době neustále narůstá a většina použitých rostlin v této práci nachází uplatnění právě v čínské medicíně. Výhodou TČM oproti západní medicíně je celkový přístup v nahlížení na pacienta. V čínské medicíně je člověk chápán jako samostatný energetický systém jehož dráhy jsou navzájem propojeny a právě tento způsob nahlížení pomáhá léčit zejména dlouhodobé, přetrvávající nemoci a degenerační nemoci se kterými si často západní medicína neví rady (Gascoigne, 2000). Hlavním cílem celostní medicíny je odstranit příčinu onemocnění a nikoli potlačení příznaků jakými se nemoc může projevovat, neboť příčina potíží nemusí být stejná s projevy jakými se nemoc jeví navenek (<http://www.prirodnimedicina.cz>).

Čínská medicína vznikla již před 4000 let, rozšířila se postupně do celého světa a dnes zažívá nový rozmach. Počet lidí, kteří se o tradiční čínskou medicínu zajímají nebo ji využívají jako léčebnou metodu neustále roste. TČM využívá celkem osm metod jak se cítit lépe nebo se uzdravit. První je meditace, jejíž účinek je všestranný a působí na všechny roviny. Druhou a třetí metodou je výživa a pohyb. Čtvrtou metodou je masáž, která pomáhá odstranit blokády a posiluje tok *čchi* v těle. Pátou možností je akupunktura, která se zaměřuje na tok *čchi*, šestou jsou **léčivé byliny** a posledními je astrologie a tzv. *feng-šuej*, které napomáhá lidem žít v souladu s *čchi* a okolním prostředím (Gascoigne, 2000).

Za hlavní jádro čínské medicíny je považována energie *čchi*. Pokud tato energie proudí v těle člověka plynule a harmonicky, člověk je zdravý. Tato *čchi* protéká tzv. meridiány (12), které přísluší vždy k jednomu orgánu. Na meridiánech jsou dráždivé body, díky kterým se dostaneme k *čchi* a můžeme tak léčit konkrétní orgán. Energie *čchi* vzniká na základě vyváženého poměru *jin* a *jang*. Pokud jeden z poměrů převáží, harmonie je narušena a my se nemůžeme uzdravit (Gascoigne, 2000).

Staletím ověřené byliny přináší velmi dobré výsledky a pomáhají vrátit se do rovnováhy. Každá bylina má svou energii a je potřeba, aby se shodovala s energií

člověka, proto je velmi důležité stanovit správnou a přesnou diagnózu. Vnější části rostlin, které rostou nad zemí se často využívají k léčbě vnějších částí těla (jako například větve skořicovníku nachází uplatnění v léčbě chřipky, neboť podle TČM je to nemoc způsobená chladem a větrem). Kořeny a hlízy potom pomáhají uzdravit vnitřní orgány. Velmi se často se podávají různé směsi bylin než byliny jednotlivé, neboť je potvrzeno, že směsi se lépe dokáží sžít s energií člověka a jejich kombinace poskytuje mnohem lépe daný účinek (Gascoigne, 2000).

V mnoha studiích o tradiční čínské rostlinné medicíně se provádí identifikace a kontrola kvality léčivých rostlin a jejich metabolitů s využitím kvantitativních a kvalitativních metod. Je však nutné zdokonalit určité kombinace metod, které mohou poskytnout u neznámých sloučenin výsledky přesně a rychle (Huang et al., 2016).

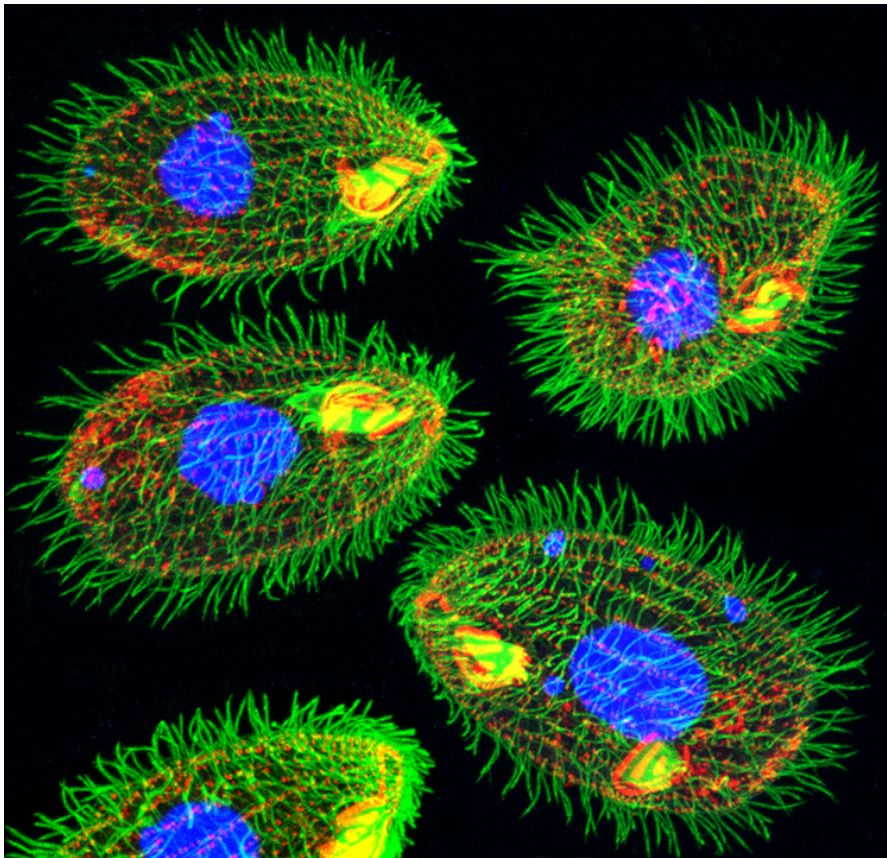
### 1.3. Cíl práce

Cílem této práce bylo vyhodnotit cytotoxicitu - antiprotozoální aktivitu extraktů získaných z různých rostlinných částí na jednobuněčném organismu *Tetrahymena thermophila* metodou MTT. Mezi vybrané rostliny patří *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum* a *Ziziphus jujuba*.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

V této části je popsána *Tetrahymena thermophila* - zařazení, charakteristika, růst a výživa. Dále jsou popsány jednotlivé rostliny, z nichž byly získány extrakty a na závěr kapitoly je probrána metoda MTT.

### 2.1. *Tetrahymena thermophila* (Nanney& McCoy)



Obrázek č. 1: *Tetrahymena thermophila*

([http://41.media.tumblr.com/7ddcbc4a2294e844f04f6d8e7ee88c2a/tumblr\\_msmf13rZ771rhb9f5o2\\_r1\\_1280.jpg](http://41.media.tumblr.com/7ddcbc4a2294e844f04f6d8e7ee88c2a/tumblr_msmf13rZ771rhb9f5o2_r1_1280.jpg)) ©) 7. 3. 2016

### 2.1.1. Zařazení

Nadříše: *Eukaryota*

Zahrnují velké množství od jednobuněčných po vícebuněčné jedince. Na rozdíl od prokaryotní buňky tyto organismy mají své jádro, které je od cytoplazmy odděleno membránou. Kromě bakterií, sinic a nebuněčných virů jsou všechny organismy řazeny do eukaryot. Mohou vystupovat jako parazité nebo žít v rovnováze s ostatními organismy. Vyznačují se přítomností specifických organel jako například alveoly, mitochondrie, chloroplasty, trichocysty, Golgiho aparát, bičíky, endoplasmatické retikulum, které plní svou funkci v buňce. U některých jedinců je způsob ochrany tvorba cyst nebo spor, díky nimž se mohou šířit i do okolí. Jednobuněčné organismy se mohou rozmnožovat nepohlavně nebo pohlavně (Sedlák, 2000).

Říše: *Protozoa*

Prvoci tvoří převážnou část velké skupiny zvané protista. Protista je označení pro eukaryotní jednobuněčné organismy. Na rozdíl od řas, hub se odlišují nemožností fotosyntézy a schopností pohybu díky pohybovým organelám (Sedlák, 2000).

Podříše: *Alveolata*

Zahrnuje tři podstatné kmeny Ciliophora, Apicomplexa a Dinoflagellata (<http://palaeos.com>). Známý výtrusovec rodu Plasmodium je původcem onemocnění malárie (Sedlák, 2000). Obrněnky žijí ve sladkovodních nebo mořských vodách jako symbionti například pro polypy, jejichž zásluhou vznikají korálové útesy (<http://www.sinicearasy.cz>).

Kmen: *Ciliophora*

Povrch nálevníků je pokryt pohybovými ciliemi, které slouží zároveň k získání potravy. Specifickým rysem je kortex, ve které můžeme najít alveoly, trichocysty (při podráždění povrchu vytvoří ochranný obal buňky), komplex mikrotubulů. Typickými rysy nálevníků jsou potravní, osmoregulační orgány a jaderný dualismus. Mohou se množit pohlavně konjugací nebo pučením, rozpadem struktury. Většina zástupců se uplatňuje k měření míry znečištění (Sedlák, 2000).

Třída: *Oligohymenophorea*

Řád: *Hymenostomatida*

Jsou to primárně sladkovodní obrvení prvoci. Známým představitelem tohoto řádu je kožovec rybí, který je ektoparazitem ryb (Sedlák, 2000). Trepka velká je používaná jako bioindikátor znečištěných vod, modelový organismus v genetickém výzkumu nebo funkci brv (<https://microbewiki.kenyon.edu>).

Čeleď: *Tetrahymenidae*

Rod: *Tetrahymena*

Druh: *Tetrahymena thermophila* (Sedlák, 2000)

### 2.1.2. Charakteristika

*Tetrahymena thermophila* je jednobuněčný sladkovodní organismus, který se pohybuje prostřednictvím brv neboli cilií. Je využíván jako modelový organismus eukaryot. Má prakticky všechny základní znaky živočišné buňky s výjimkou intermediálních filament a chybí mu znaky rostlinné buňky, každopádně po biochemické stránce není bližší živočichům než rostlinám. Měří okolo 50 µm a široký je cca 20 µm. Jejím hlavním rysem je jaderný dualismus a uspořádání struktur v kortex. Diploidní mikronucleus je nositelem genomu a uplatňuje se ve fázi konjugace. Makronucleus je považován za somatické jádro (Asai, 2000).

Práce s *Tetrahymena thermophila* přinesla mnoho poznatků o pohybových organelách, objevení dyneinu jakožto skupině bílkovin, které jsou motory buňky. Umožňují například pohyb bičíků nebo transport organel uvnitř buňky (Asai, 2000), (<http://www.merriam-webster.com>).

*Tetrahymena thermophila* a lidé mají velmi podobné požadavky na výživu a tato vlastnost z ní učinila vhodný organismus k testování potravin pro konzumní společnost (Asai, 2000).

### 2.1.3. Růst a výživa

*Tetrahymena thermophila* může růst poměrně dobře v různých mediích. Generační čas se pohybuje v rozmezí 2-3 hodin, optimálně 1,4 hodin. Za vhodných podmínek roste exponenciální řadou  $2 \times 10^5$  buněk na mililitr. Rozmezí buněčné hustoty se pohybuje  $1 \times 10^6$  buněk na mililitr (Asai, 2000).

Jedny z prvních živných medií byly navrženy v letech 1940. Rozsáhlé studie prokázaly, že *Tetrahymena thermophila* pro svůj růst potřebuje 11 esenciálních aminokyselin, vitaminy skupiny B, kyselinu lipovou, železité ionty, guanin, uracil a některé stopové prvky například měď, draslík a hořčík (Asai, 2000).

Pokud je živena bakteriemi nebo je v peptonu, roste rychle s vysokou účinností. Buňky se poprvé rozmnožily v bakteriálním nálevu zeleninového původu. *Tetrahymena thermophila* je velmi citlivá na nečistoty, mýdlová rezidua a je zapotřebí použít deionizovanou nebo destilovanou vodu vysoké čistoty a stejně tak laboratorní sklo. Vhodným živným médiem pro růst buněk je proteózní pepton (PP). Velmi výborné pro růst je tzv. SSP médium (složené z 2% PP, 0,1% extraktu droždí, 0,2% glukózy a 0,003% sekvestrantů (Fe-EDTA) ). Růst v peptonu může být limitován železem, v takovém případě může být doplněn solemi železitými. Nevýhodou  $\text{FeCl}_3$  je, že precipituje v autoklávu. Obecně doplnění železa je jedna z prvních variant, když chceme zvýšit rychlost růstu (Asai, 2000).

## 2.2. Rostliny

### 2.2.1. *Salvia officinalis* L.

Tato silně aromatická rostlina patří do čeledi *Lamiaceae*. Dorůstá do výšky polokeře a její listy jsou řapíkaté a šedoplstnaté. Květy se skládají pouze ze dvou tyčinek. Pro lékopisné účely se používá *Salviae officinalis folium* a *Salviae herba* (Jahodář, 2009). Zbarvení květů může být narůžovělé až modrofialové (Castleman, 2004). Pro tuto práci byl extrahován list.

V *Salvia officinalis* nacházíme silice. Jejich hlavními složkami jsou: kafr, 1,8-cineol,  $\alpha$ -thujon,  $\beta$ -thujon, borneol, kamfen,  $\beta$ -karyofyllen,  $\alpha$ -humulen,  $\alpha$ -pinen. Zmiňované  $\alpha$ -,  $\beta$ - thujon jsou toxické pro naši centrální nervovou soustavu a zvláště opatrní při užití šalvěže by měly být těhotné ženy a děti. V posledních letech byly prováděny pokusy na snížení obsahu těchto složek (Opletal, Skřivanová, 2010). Při přípravě nálevu se velká část thujonu degraduje takže riziko otravy je velmi nízké. Zvláštní opatření má samotná šalvěžová silice, která je toxická a není možno ji konzumovat vnitřně (Castleman, 2004). V nati můžeme najít deriváty kyseliny hydroxyskořicové (kyselina rozmarinová), diterpen kyseliny karnosolové (salvin) a diterpenický hořčin pikrosalvin. *Salvia officinalis* obsahuje také flavonoidy, třísloviny (Opletal, Skřivanová, 2010).

Název *Salvia* pochází z latinského slova *salvere* a znamená cítit se zdráv, léčit. V praxi se *Salvia officinalis* využívá jako karminativum, spasmolytikum, antioxidant, antiseptikum, diaforetikum (Garran, 2009). Je obsažena v přípravcích, které jsou doporučovány proti nadměrnému pocení. Je součástí některých ústních vod, zubních past, mýdel, pleťové kosmetiky (<http://naturstuff.sweb.cz>). Účinnost *Salvia officinalis* při bolestech v krku je vysvětlována přítomností tříslovin s adstringentním účinkem. Užívání *Salvia officinalis* by se měli vyhnout těhotné a kojící ženy, z důvodu zastavení tvorby mateřského mléka (Garran, 2009).



**Obrázek č. 2:** *Salvia officinalis*

(<http://www.thepavilion.ie/wp-content/uploads/2012/08/salvia.jpg?79f2cf> ©)

18. 10. 2015

## **Obsahové látky v *Salvia officinalis*:**

### **β-thujon**

Molekulární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

Molekulová hmotnost: 152,233 g/mol

Systematický název: (1S,4S,5R)-4-methyl-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexan-3-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6553876>)

### **α-thujon**

Molekulární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

Molekulová hmotnost: 152,233 g/mol

Systematický název: (1S,4R,5R)-4-methyl-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexan-3-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/261491>)

### **Kafr**

Molekulární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

Molekulová hmotnost: 152,23 g/mol

Systematický název: 4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2537>)

### **1,8-Cineol**

Molekulární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O

Molekulová hmotnost: 154,24 g/mol

Systematický název: 2,2,4-trimethyl-3-oxabicyclo[2.2.2]octane

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2758>)

## Salviol

Molekulární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 302,45 g/mol

Systematický název: (3S,4aS,10aS)-1,1,4a-trimethyl-7-propan-2-yl-2,3,4,9,10,10a-

hexahydrophenanthrene-3,6-diol

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13966146>)

## Kyselina rozmarýnová

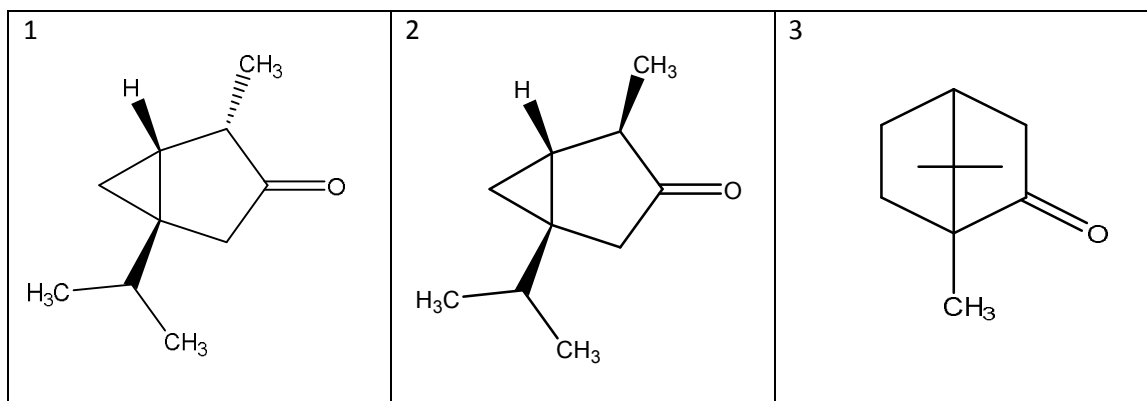
Molekulární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>

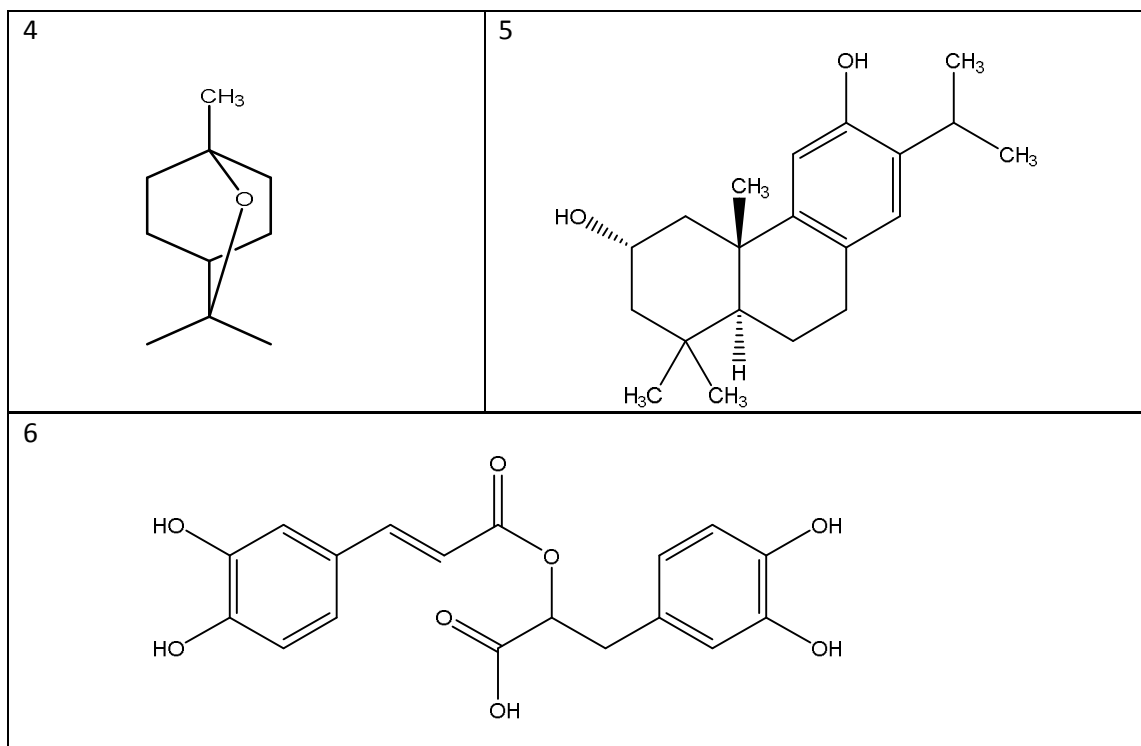
Molekulová hmotnost: 360,31 g/mol

Systematický název: 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)

prop-2-enoyl]oxypropanoic acid

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281792>)





**Tabulka vzorců č. 1:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Salvia officinalis*: 1.  $\beta$ -thujon, 2.  $\alpha$ -thujon, 3. kafr, 4. 1,8-cineol, 5. salviol, 6. kyselina rozmarýnová (vytvořeno v programu chemdraw)

### 2.2.2. *Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill.) Gaud.

Český název celer bulvový patří do čeledi Apiaceae. Celer je známá jako kořenová zelenina, u které najdeme mnoho léčivých látek, obzvláště v nati a semenech. Obě rostlinné části nejsou jedovaté (Castleman, 2004). Použitá odrůda Celer maxim je vhodná i pro průmyslové využití. Poskytuje 300kg bulev/ 100m<sup>2</sup> a průměrná hmotnost bulvy činí 540g (<http://ozahrade.webnode.cz>). Pro získání extraktu byla použita semena.

Celer je zdrojem vlákniny, vitamínů A, B, C, E a dále obsahuje vysoký obsah draslíku, sodíku, fosforu, železa a hořčíku (<http://greenearthinstitute.org>). Má velmi nízký obsah cholesterolu a spolu s obsaženou vlákninou je výbornou zeleninou při snaze snížit cholesterol. U izolované látky 3-n-butylftalid byla prokázána účinnost na snížení hladiny cholesterolu u vybraných zvířat (Castleman, 2004). Uvádí se, že složkou silice je sedanolid a zmiňovaný butylftalid, které dávají této zelenině typickou vůni (<http://www3.hhu.de>). Další významnou látkou ze skupiny

furanokumarinů jsou psoraleny. Jejich uplatnění najdeme v léčbě psoriázy, vitiliga nebo lymfomů T-buněk (Castleman, 2004). Psoraleny patří mezi fototoxické látky které, mohou u pěstovatelů vyvolat nepříjemnou vyrážku (<http://www.dermanet.cz>).

Ve středověku byla semena celeru považována jako nejlepší lék na dnu a o 800let později výzkumy dané tvrzení prokázaly. Bylo zjištěno, že celerový extrakt odbourává kyselinu močovou a působí protizánětlivě. 800mg tableta s obsahem extraktu semen celeru vydá za jednu tabletu allopurinolu, který je lékem 1. volby při léčbě dny. *Apium graveolens* může pomoci také jako diuretikum, antihypertenzivum a jako sedativum při nespavosti nebo stavech úzkosti (Castleman, 2004).



**Obrázek č. 3:** *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*

**Obrázek č. 4:** *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*

([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a7/Knolselderij\\_plant\\_\(Apium\\_graveolens\\_var.\\_rapaceum\)\\_'Dolvi'.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a7/Knolselderij_plant_(Apium_graveolens_var._rapaceum)_'Dolvi'.jpg)) ©) 20. 10. 2015

([http://www.bio-gaertner.de/sites/default/files/images/Botanikus/Apium\\_graveolens\\_var.\\_rapaceum.jpg](http://www.bio-gaertner.de/sites/default/files/images/Botanikus/Apium_graveolens_var._rapaceum.jpg)) ©) 2. 11. 2015

## Obsahové látky v *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*

### 3-Butylftalid

Molekulární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 190,24 g/mol

Systematický název: 3-butylphthalide

([http://www.eurochem.cz/index.php?EURID=321032121&CompNo=1&PropNo=0&LtoB=1&QSAS=4&QSPG=1&MN=3-BUTYLFTALID&ID=0&MLEV=0&DT=134217728&SPC=0&ACT=30&M\\_ID=0&M\\_MLEV=0&M\\_SPC=0&LA=CS](http://www.eurochem.cz/index.php?EURID=321032121&CompNo=1&PropNo=0&LtoB=1&QSAS=4&QSPG=1&MN=3-BUTYLFTALID&ID=0&MLEV=0&DT=134217728&SPC=0&ACT=30&M_ID=0&M_MLEV=0&M_SPC=0&LA=CS))

### Sedanolid

Molekulární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 194,27 g/mol

Systematický název: 3-butyl-3a,4,5,6-tetrahydro-3H-2-benzofuran-1-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5018391>)

### D-Limonen

Molekulární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

Molekulová hmotnost: 136,23 g/mol

Systematický název: 1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/22311>)

## Psoralen

Molekulární vzorec:  $C_{11}H_6O_3$

Molekulová hmotnost: 186,16 g/mol

Systematický název: 7H-Furo[3,2-g]chromen-7-one

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5964.html>)

## Apiin

Molekulární vzorec:  $C_{26}H_{28}O_{14}$

Molekulová hmotnost: 564,49 g/mol

Systematický název: 7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-

(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-

5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280746>)

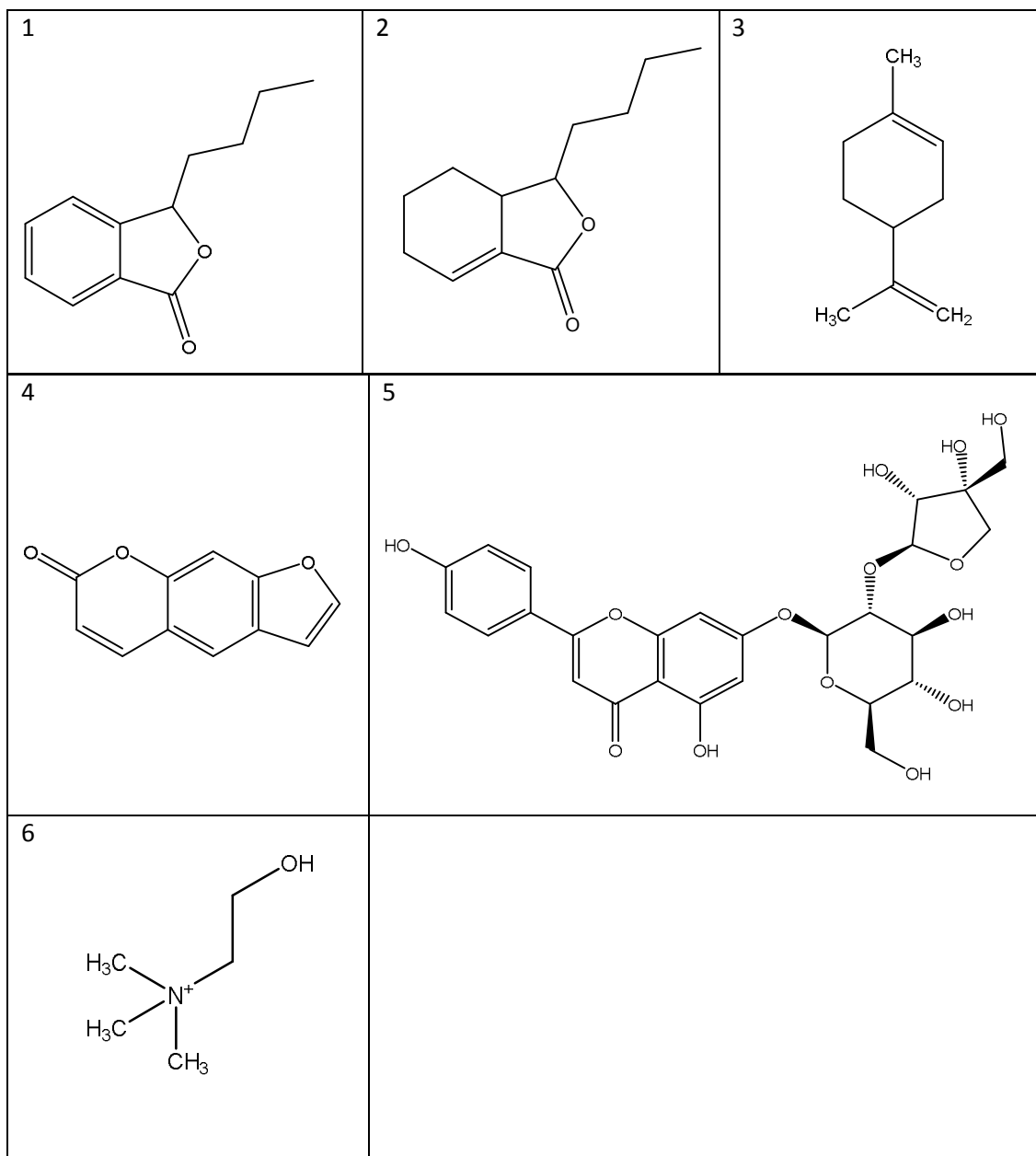
## Cholin

Molekulární vzorec:  $C_5H_{14}NO^+$

Molekulová hmotnost: 104,17 g/mol

Systematický název: 2-hydroxyethyl(trimethyl)azaniu

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/305>)



**Tabulka vzorců č. 2:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*: 1. 3-butylftalid, 2. sedanolid, 3. D-limonen, 4. psoralen, 5. apiin, 6. cholin (vytvořeno v programu chemdraw)

### 2.2.3. *Evodia rutaecarpa* L.

Tato rostlina původem pocházející z Číny patří do čeledi *Rutaceae*. Čeleď *Rutaceae* je tvořena převážně stromy a keři, které rostou v tropech a subtropích. Je pro ně charakteristické, že jejich listy jsou proti světlu tečkované. Květy nacházíme

ve vrcholičnatých květenstvích (Novák, Skalický, 2008). *Evodia rutaecarpa* je nedílnou součástí tradiční čínské medicíny (Jahodář, 2009). Pro tuto práci byl použit plod.

Hlavními složkami jsou chinolové a indol-chinazolinové alkaloidy. Jednou z prvních látek izolovaných z *Evodia rutaecarpa* byl evodiamin, považovaný za hlavní alkaloid rostliny. Dalším důležitým alkaloidem je rutaecarpin.

(<http://www.itmonline.org>).

Plody *Evodia rutaecarpa* jsou využívány v tradiční čínské medicíně při bolestech hlavy, břicha dále při průjmech, gastrointestinálních potížích, pneumoniích u dětí nebo hypertenzi (<http://www.chineseherbshealing.com>). Nachází se v řadě redukčních doplňků, které napomáhají spalování tuků (Kobayashi et al., 2001). Evodiamin vykazuje různé biologické účinky jako například protizánětlivé (Chiou et al., 1997), proti obezitě (Kobayashi et al., 2001) vazodilatační (Chiou et al., 1992), termoregulační (Tsai et al., 1995). Některé studie poukázaly na to, že evodiamin inhibuje aktivitu buněk karcinomu tlustého střeva a ne jen jeho (Ogasawara et al., 2001). Inhibuje růst nádorových buněk a spouští apoptózu nádorových buněk (Liao et al., 2005).



**Obrázek č. 5:** *Evodia rutaecarpa*

([http://traditionalherb.org/wp-content/uploads/2015/05/evodia\\_fruit\\_opt.jpg](http://traditionalherb.org/wp-content/uploads/2015/05/evodia_fruit_opt.jpg) ©)

2. 11. 2015

## Obsahové látky v *Evodia rutaecarpa*

### Evodiamin

Molekulární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 303,35 g/mol

Systematický název: 14-Methyl-8,13,13b,14-tetrahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-b]quinazolin-5(7H)-one

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.133343.html>)

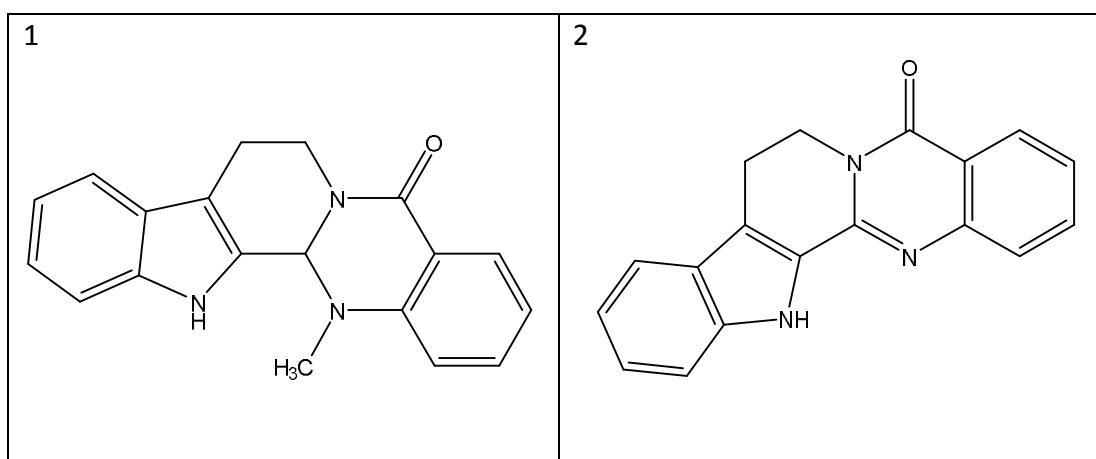
### Rutaecarpin

Molekulární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnost: 287,31 g/mol

Systematický název: 8,13-Dihydroindolo[2',3':3,4]pyrido[2,1-b]quinazolin-5(7H)-one

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.59175.html>)



**Tabulka vzorců č. 3:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Evodia rutaecarpa*:

1. evodiamin, 2. rutaecarpin (bylo vytvořeno v programu chemdraw)

#### 2.2.4. *Coptis chinensis* L. (Franch.)

V překladu nitolist čínský patří do významné čeledi *Ranunculaceae*. Je využíván jako rostlina tradiční čínské medicíny. Kořen je zbarven hnědožlutě a uvnitř je žlutooranžový. V přízemní růžici má řapíkaté, dlانيتě dělené listy. Květenstvím je vrcholík. Plodem je měchýřek s mnoha semeny (Valíček et al., 1998). Extrakt byl získán z oddenku.

Pro tuto čeleď je typický vysoký obsah alkaloidů. Konkrétně v *Coptis chinensis rhizoma* nacházíme protoberberinové alkaloidy coptisin, worenin, berberin, palmatin, jatorrhizin (Valíček et al., 1998). Berberin se izoluje z oddenku rostliny a je dominující surovinou pro jeho izolaci (Jahodář, 2009).

*Coptis chinensis* je hojně využíván při různých zánětlivých onemocněních, indukuje tvorbu žluče, dá se využít při střevních potížích, zevně ho lze aplikovat do ran nebo popálenin (<http://www.celostnimediceina.cz>). V minulosti využívaly tuto rostlinu Číňanky k zabránění přenosu infekce od matky nebo proti jedům u novorozenců (Valíček et al., 1998).



**Obrázek č. 6:** *Coptis chinensis*

**Obrázek č. 7:** *Coptis chinensis*

(<http://www.itmonline.org/image/impet2.jpg> ©) 20. 10. 2015

([http://dentomed.u-toyama.ac.jp/syouyaku/SCC000007\\_2.jpg](http://dentomed.u-toyama.ac.jp/syouyaku/SCC000007_2.jpg) ©) 2. 11. 2015

## **Obsahové látky v *Coptis chinensis***

### **Coptisin**

Molekulární vzorec:  $C_{19}H_{14}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 320,31 g/mol

Systematický název: 6,7-Dihydro[1,3]dioxolo[4,5-g][1,3]dioxolo[7,8]isoquinolino  
[3,2-a]isoquinolin-5-ium

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65268.html>)

### **Worenin**

Molekulární vzorec:  $C_{20}H_{16}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 334,34 g/mol

Systematický název: 14-Methyl-5,6-dihydro[1,3]dioxolo[4,5-g][1,3]dioxolo  
[6,7]isoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-ium

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16736097.html>)

### **Berberin**

Molekulární vzorec:  $C_{20}H_{18}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 336,36 g/mol

Systematický název: 9,10-Dimethoxy-5,6-dihydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolino  
[3,2-a]isoquinolin-7-ium

(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2263.html>)

## Palmatin

Molekulární vzorec:  $C_{21}H_{22}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 352,40 g/mol

Systematický název: 2,3,9,10-tetramethoxy-5,6-dihydroisoquinolino[2,1-b]

isoquinolin-7-ium (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19009>)

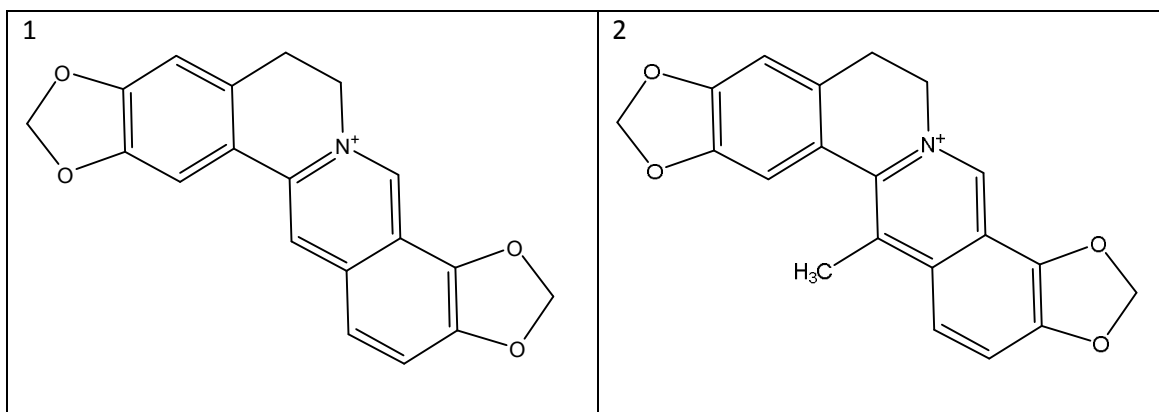
## Jatorrhizin

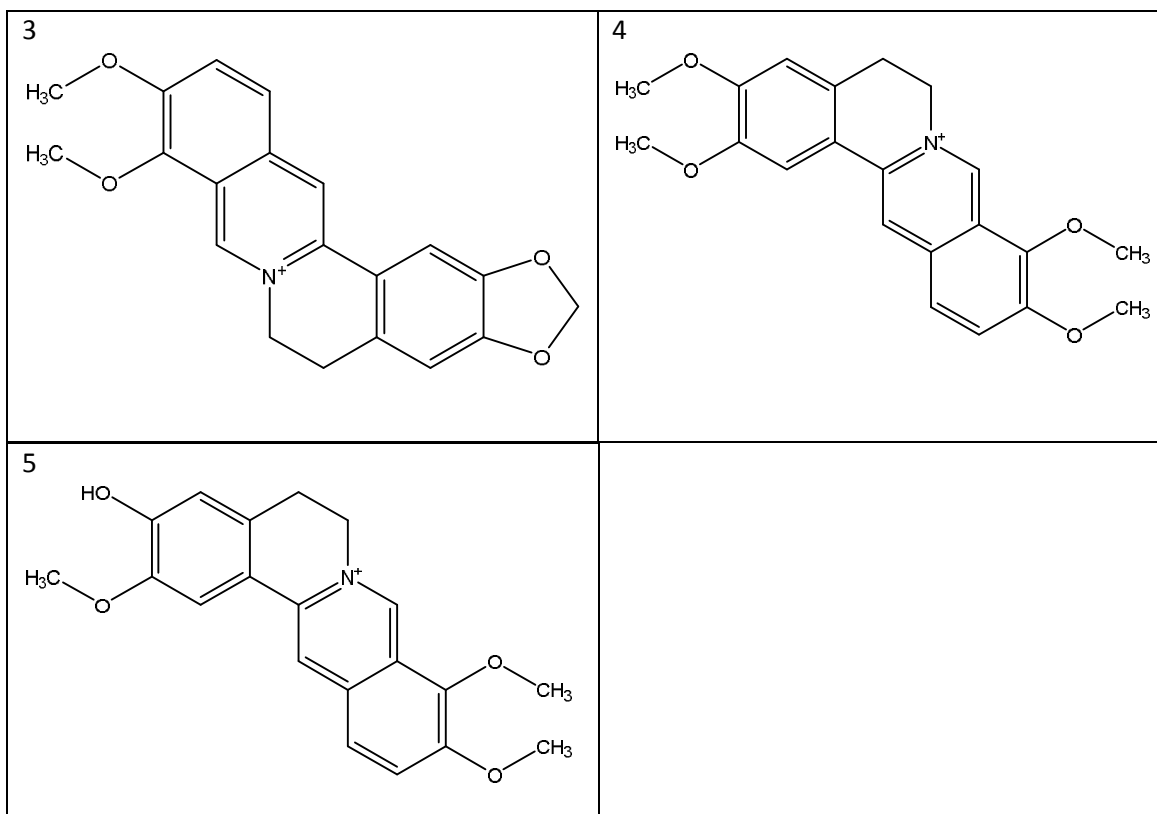
Molekulární vzorec:  $C_{20}H_{20}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 338,37 g/mol

Systematický název: 2,9,10-trimethoxy-5,6-dihydroisoquinolino[2,1-b]isoquinolin-

7-ium-3-ol (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72323>)





**Tabulka vzorců č. 4:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Coptis chinensis*: 1. coptisin, 2. worenin, 3. berberin, 4. palmatin, 5. jatrorrhizin (bylo vytvořeno v programu chemdraw)

### 2.2.5. *Zanthoxylum nitidum* L.

Tento trnitý popínavý keř nebo strom je řazen do čeledi *Rutaceae*. Český název zní žlutodřev (<http://databaze.dendrologie.cz>). Listy jsou lichozpeřené a dorůstají délky 3-15 cm. Jejich spodní strana listu je ochlupená. Trny nacházíme na kmeni i větvích. Plodem je jedlý měchýřek, který obsahuje 4mm černá, kulatá semena (<http://www.rostliny.net>). Rod *Zanthoxylum* zahrnuje asi tak 250 druhů, z nich 12 druhů je využíváno v tradiční čínské medicíně (Hu et al., 2007). *Zanthoxylum nitidum* je poměrně variabilním druhem, který roste jako liána v deštných pralesích nebo jako keř na suchých místech. Široce je rozšířen především po celé jihovýchodní části Číny (Kong et al., 1996). Pro získání extraktu byl použit kořen.

Hlavními obsahovými látkami v *Zanthoxylum nitidum* jsou alkaloidy typu benzofenantridinu, které jsou pro čeleď *Rutaceae* typické (Kong et al., 1996).

Dále se podařilo identifikovat flavonoidy, kumariny a lignany, které byly izolovány z kořene *Zanthoxylum nitidum* (Shen et al., 2005). Mezi významné látky v rostlině s využitelnou farmakologickou aktivitou patří nitidin a chelerythrin se silným protinádorovým účinkem. Bylo potvrzeno, že inhibuje topoizomerázu I. a stabilizuje komplex enzym-DNA (Fang et al., 1993). U alkaloidu liriodeninu bylo zjištěno, že inhibuje topoizomerázu II. a blokuje proliferaci buněčných linií karcinomu jater (Hsieh et al., 2005). Protoberberinové alkaloidy coptisin, berberin byly jako první nalezeny právě u čeledi *Rutaceae* (Kong et al., 1996). U většiny identifikovaných alkaloidů v *Zanthoxylum nitidum* se předpokládá, že tyto látky se vyskytují i u jiných druhů rodu *Zanthoxylum* (Hu et al., 2007).

*Zanthoxylum nitidum* je využíván v tradiční čínské medicíně k léčbě žaludečních potíží, při bolestech zubů, při horečce, při revmatismu, paréze nebo jako insekticid a pesticid (Bhattacharya et al., 2009). Další využití má plod, kterým je možno řešit koliky, kašel, zvracení a průjem (Chen et al., 2011). Biologické účinky rodu *Zanthoxylum* zahrnují aktivitu antimikrobiální, protizánětlivou, analgetickou, antiparazitární, protinádorovou a protivirovou (Patiño et al., 2012).



**Obrázek č. 8:** *Zanthoxylum nitidum*

(<http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/Gallery/1109/Zanthoxylum%20nitidum-lsj.jpg>) © 17. 11. 2015

## Obsahové látky v *Zanthoxylum nitidum*

### Nitidin

Molekulární vzorec:  $C_{21}H_{18}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 348,37g/mol

Systematický název: 2,3-dimethoxy-12-methyl-[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridin-12-ium (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4501> )

### Chelerythrin

Molekulární vzorec:  $C_{21}H_{18}N^+O_4$

Molekulová hmotnost: 348,37 g/mol

Systematický název: 1,2-dimethoxy-12-methyl-[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridin-12-ium (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2703>)

### Liriodenin

Molekulární vzorec:  $C_{17}H_9NO_3$

Molekulová hmotnost: 275,26 g/mol

Systematický název: 8H-[1,3]Benzodioxolo[6,5,4-de]benzo[g]quinolin-8-one  
(<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9738.html>)

### Skimmianin

Molekulární vzorec:  $C_{14}H_{13}NO_4$

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

Systematický název: 4,7,8-trimethoxyfuro[2,3-b]quinoline  
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6760>)

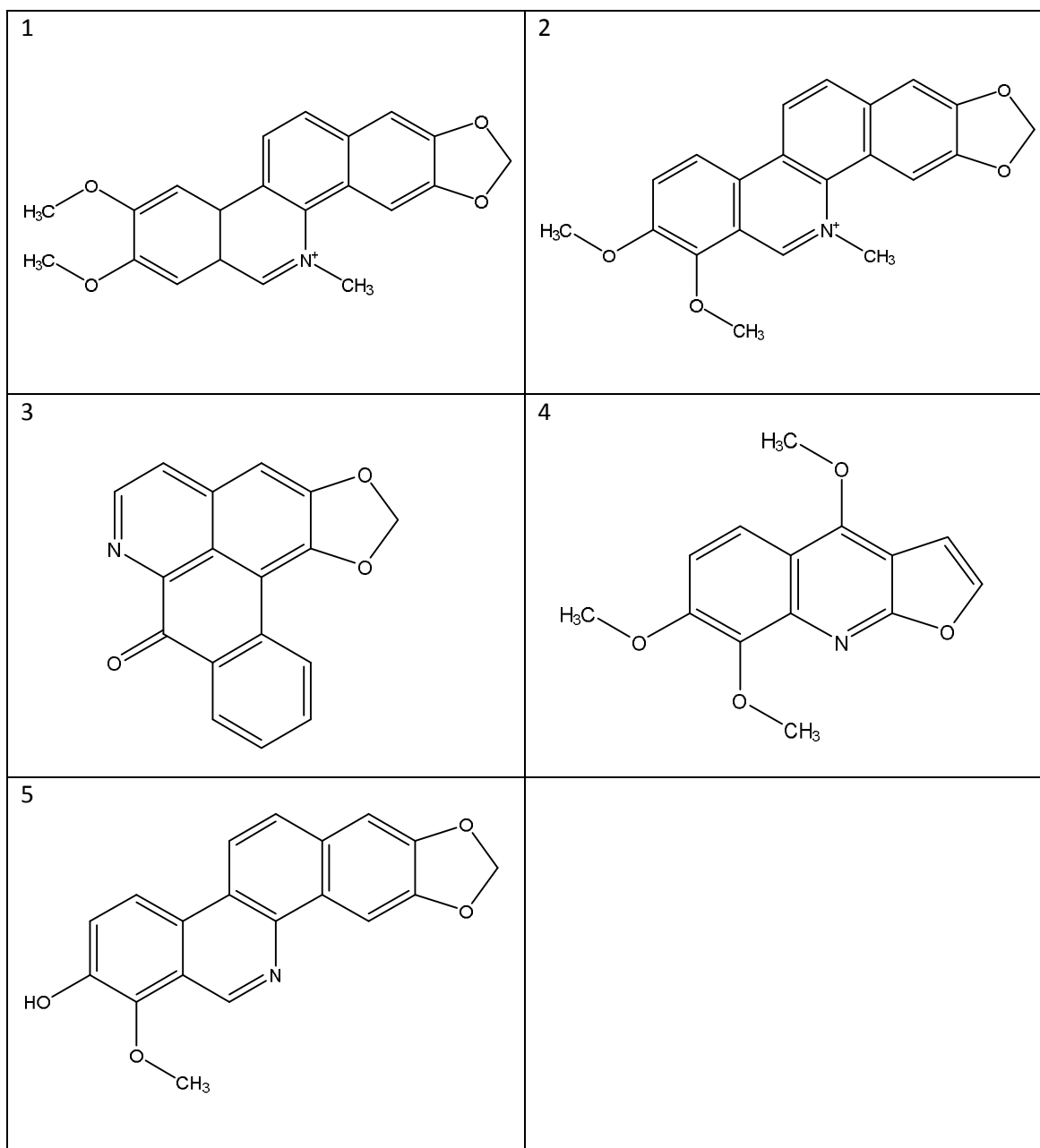
## Decarin

Molekulární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 319,31 g/mol

Systematický název: 1-methoxy-[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridin-2-ol

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/179640>)



**Tabulka vzorců č. 5:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Zanthoxylum nitidum*:

1. nitidin, 2. chelerythrin, 3. liriodenin, 4. skimmianin, 5. decarin (bylo vytvořeno v programu chemdraw)

### **2.2.6. *Zizyphus jujuba* L.**

Česky nazývaný Cicimek holý je opadavý strom, který dává tzv. čínské datle. Je taxonomicky řazen do čeledi *Rhamnaceae* (Novák, Skalický, 2008). Od ostatních druhů cicimků se odlišuje výskytem listů až v horní polovině stromu (Jahodář, 2009). *Zizyphus jujuba* pochází z Číny, ale postupně se rozšířil do Asie, USA a Austrálie. Tento nanejvýše 8-metrový strom preferuje slunná stanoviště se suchými půdami. Listy jsou střídavé, krátce řapíkaté 2-4 cm dlouhé. Palisty se mění v trny (<http://botany.cz>). Žlutozelené pětičetné květy vyrůstají v úžlabí listů. Plodem je peckovice 2-5 cm velká s lesklým hnědým oplodím (Valíček et al., 1998). Extrakt látek byl izolován z plodu.

Z kůry a listů se podařilo získat látky charakteru isochinolinových, indolových, indolizidinových a makrolidových alkaloidů, saponiny, pentacyklické triterpeny  $\beta$ -amyrinového, lupanového typu a flavonoidy (Jahodář, 2009). *Zizyphi jujubae fructus* obsahuje kyselinu betulinovou, ursolovou, vitamin B2, C, stopové prvky kobalt, železo, jód. V semenech můžeme najít triterpenoidní saponin jujubosid A a B, flavonoidní glykosidy swertisin, spinosin. V listech se nachází triterpenoidní glykosid ziziphyn, který blokuje receptory pro vnímání sladké chuti (Valíček et al., 1998).

*Zizyphus jujuba* je hojně využívána v tradiční čínské medicíně pro své účinky. Je vhodná k léčbě nespavosti, psychických poruch nebo léčbě vysokého krevního tlaku (Valíček et al., 1998). U kyseliny betulinové byl prokázán protizánětlivý účinek a protinádorový účinek proti některým nádorovým buněčným liniím (Kim et al., 1998). Semena a listy mají využití při nespavosti nebo k zmírnění úzkostí (Peng et al., 2000).



**Obrázek č. 9:** *Ziziphus jujuba*

**Obrázek č. 10:** *Ziziphus jujuba* strom

(<http://jardinerie.jardiland.com/back-office/photos/2476-ziziphus-jujuba-zizyphus.jpg>)  
©)17. 11. 2015

(<https://mythosandfaith.files.wordpress.com/2013/06/jujuba-tree.jpg>) ©)17. 11. 2015

## **Obsahové látky v *Ziziphus jujuba***

### **Kyselina betulinová**

Molekulární vzorec:  $C_{30}H_{48}O_3$

Molekulová hmotnost: 456,71 g/mol

Systematický název: (1R,3aS,5aR,5bR,7aR,9S,11aR,11bR,13aR,13bR)-9-hydroxy-

5a,5b,8,8,11a-pentamethyl-1-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,

13b-hexadecahydrocyclopenta[a]chrysene-3a-carboxylic acid

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64971>)

## Kyselina ursolová

Molekulární vzorec: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 456,70 g/mol

Systematický název: (1S,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-

hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic acid

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64945> )

## Swertisin

Molekulární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>

Molekulová hmotnost: 446,40 g/mol

Systematický název: 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-6-

[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/369636>)

## Spinosin

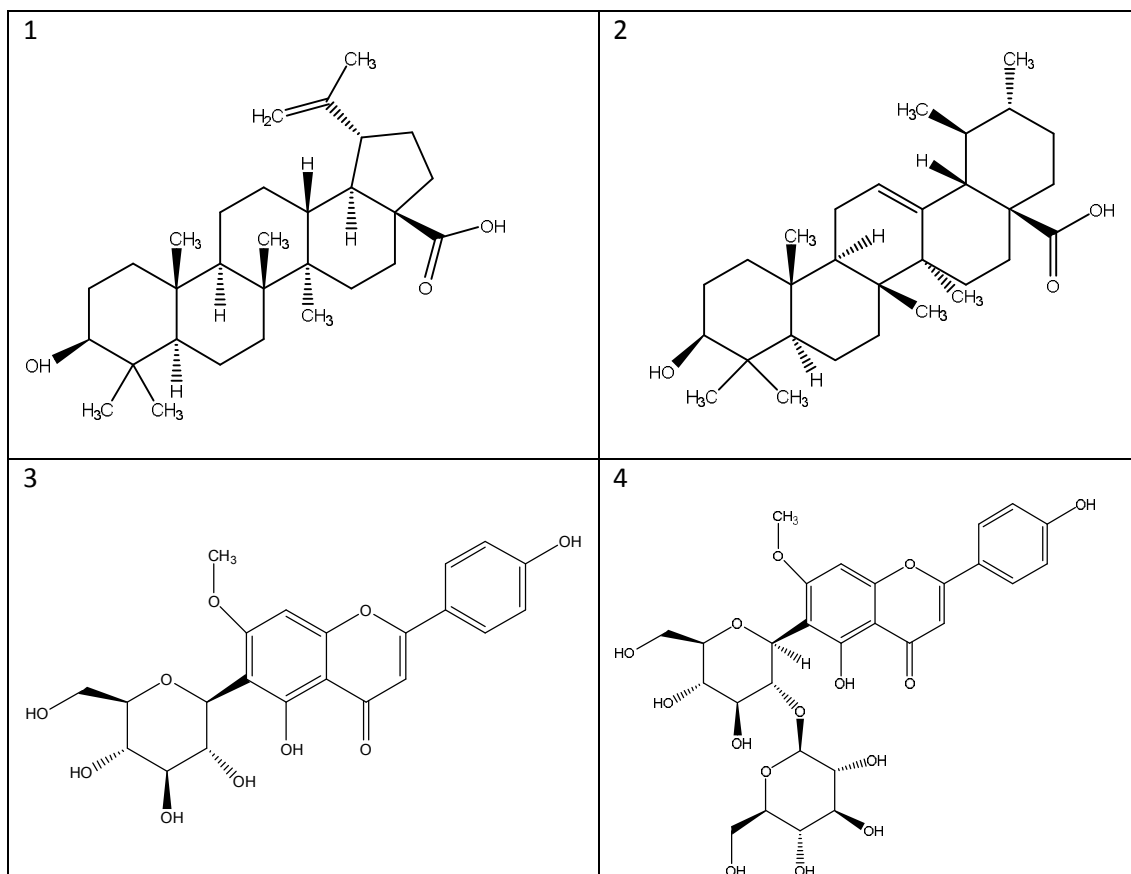
Molekulární vzorec: C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>

Molekulová hmotnost: 608,54 g/mol

Systematický název: 6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-

3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychromen-4-one

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/155692>)



**Tabulka vzorců č. 6:** jednotlivé vzorce účinných látek v *Ziziphus jujuba*: 1. kyselina betulinová, 2. kyselina ursolová, 3. swertisin, 4. spinosin (bylo vytvořeno v programu chemdraw)

### 2.3. Metoda MTT

Tento způsob zkoušky je široce využíván pro zkoumání cytotoxicity cizorodých látek, pro vyhodnocení rychlosti proliferace a analýzy buněčné aktivity (Jaszczyszyn, 2008). Podstatou kvantitativní spektrofotometrické metody je redukce MTT neboli (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) (Dias, 1998).

Tetrazolinové barvivo je redukováno na nerozpustný fialově zbarvený formazan mitochondriálními dehydrogenázami. Výsledkem redukce barviva jsou formazanové krystaly ve vodě nerozpustné (Stowe et al., 1995). Mohou být pozorovány v mikroskopu nebo rozpuštěny v dimethylsulfoxidu a spektrofotometricky vyhodnoceny (Mosmann, 1983).

Důvodů pro určitá omezení metody MTT je několik. Jedním z nich je možnost, že testované sloučeniny budou interagovat s tetrazolinovým barvivem (Ulukaya, 2008). Příkladem je kyselina askorbová redukující zbarvení MTT v bezbuněčném systému. Naopak v přítomnosti retinolu je zbarvení intenzivnější (Chakrabarti, 2000). Před samotným zahájením měření je nezbytné vyloučit interakce, které by mohly vést k falešným výsledkům. Dalším omezením může být přítomnost testovaných látek, které mohou narušit aktivitu mitochondriální dehydrogenázy a způsobit přecenění (aktivace MTT redukující dehydrogenázy) nebo podcenění výsledků (inhibice mitochondriální dehydrogenázy) (Ulukaya, 2008). Příkladem může být měření s doxorubicinem, který indukoval intracelulární generaci volných radikálů a tyto radikály způsobily větší redukci MTT (Collier, 2003).

Pro životaschopnost buněk je nezbytná přítomnost média, pokud je odstraněno, buňka hyne. Nevýhodou přítomnosti média je to, že médium pepton obsahuje proteiny, které se střetávají se čtením optické hustoty a mohou snižovat citlivost testu (Dias, 1998).

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole jsou popsány potřebné materiály, pomůcky k testování organismu, jejich příprava, vlastní postup provedení experimentu a způsob vyhodnocení.

### 3.1. Použitý materiál

#### 3.1.1. Testovaný organismus

Pro daný experiment jsme použili jednobuněčný organismus *Tetrahymena thermophila*, který jsme si předkultivovali cca 24 hodin před začátkem provádění pokusu.

#### 3.1.2. Použité chemikálie

Vodné extrakty z rostlinných částí vybraných rostlin *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum*, *Ziziphus jujuba*

Dichroman draselný (Mr=294,18g/mol) (FLUKA)

Proteose-pepton (FLUKA)

Deionizovaná voda

MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid) (SIGMA-ALDRICH)

DMSO (dimethyl-sulfoxid) (SIGMA-ALDRICH)

75% Ethanol k dezinfekci rukavic

### **3.1.3. Vybavení**

#### **Pomůcky:**

Stojan na zkumavky

Zkumavky 12x75mm

Odměrné baňky

Malé prachovnice

Eppendorfovy zkumavky

Lžičky, Lodička

Kádinky

Automatické mikropipety a špičky

Mikrotitrační destička s 96 jamkami

Rukavice a lihový fix

#### **Přístroje:**

Analytické digitální váhy KERN ABJ

Třepačka VORTEX-GENIE 2

Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN

Box s laminárním prouděním AURA 2000 M.A.C.

Reader ANTHOS 2010

Inkubátor AQUALYTIC

## 3.2. Pracovní postup

### 3.2.1. Příprava extraktů

Před vlastním testováním bylo potřeba extrakty získat z různých rostlinných částí. Příprava probíhala na Katedře botaniky podle návodu Prof. Opletala. Nejprve jsme si rozemleli v mixeru rostlinné části na prášek a odvážili cca 5g. Na 1g rostlinné drogy jsme použili 15 ml vody. Vodu jsme zahřáli na teplotu cca 90°C a nalili jí do baňky s rostlinnou drogou. Poté jsme destilační baňku nasadili na vodní chladič a zahřívali alespoň 15 minut. Drogu jsme nechali sednout ke dnu a zfiltrovali tak, aby zůstala i nadále v baňce. Přilili jsme opět zahřátou vodu a celý proces zopakovali. Oba filtráty jsme spojili a zfiltrovali přes tubus s vrstvou křemeliny. Získali jsme roztok, který jsme odpařili ve vakuové odparce za sníženého tlaku. Vznikl tmavý viskózní odparek, který jsme i s baňkou umístili do vakuového exsikátoru se silikagelem a takto sušili několik dní. Jako poslední krok jsme přidali suchý led (CO<sub>2</sub>), díky kterému jsme získali homogenizované práškové formy extraktů a z těchto extraktů jsme dále připravili vzorky pro provedení experimentu.

Použitá část rostliny	Navážka rostlinné drogy v g	Získané množství práškové formy extraktu v g
<b>Salviae officinalis folium</b>	5,01	0,5163
<b>Apii graveoli semen</b>	5,03	0,7139
<b>Evodiae rutaecarpae fructus</b>	3,89	0,6133
<b>Coptis chinensis rhizoma</b>	4,8	0,9345
<b>Zanthoxyli nitidi radix</b>	4,98	0,2357
<b>Ziziphi jujubae fructus</b>	5,03	1,82

**Tabulka č. 7:** Hmotnosti rostlinných drog na začátku procesu a získané množství extraktů



**Obrázek č. 11:** Vakuová odparka na Katedře botaniky a ekologie (foto autor)

### **3.2.2. Příprava suspenze s *Tetrahymena thermophila***

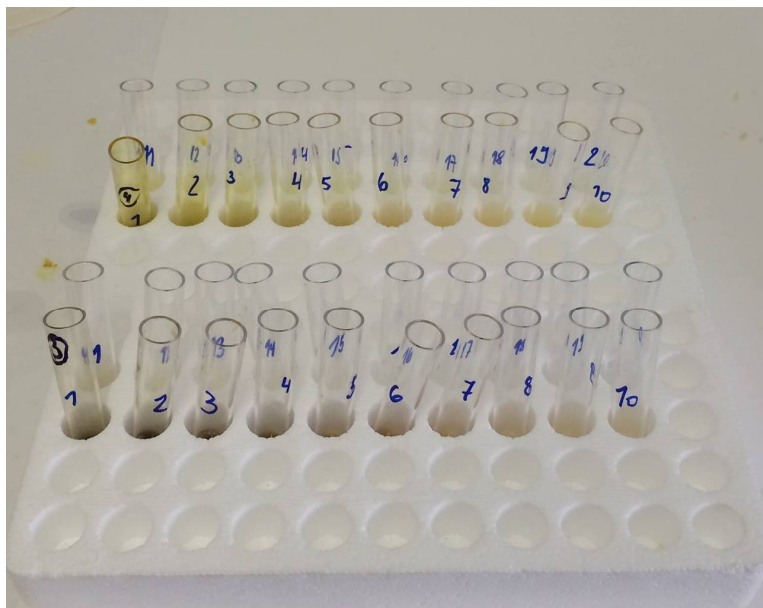
Suspenzi jednobuněčného organismu pro experiment jsme získali v růstovém médiu cca o 1 den dříve před pokusem, tak aby byl zajištěn dostatečný počet jedinců.

### **3.2.3. Příprava média**

Vhodným prostředím pro *Tetrahymena thermophila* je médium složené z 1,5% peptonu a 0,025% kvasnicového extraktu. Sterilizační metoda se uplatňuje ta v autoklávu při teplotě 121°C a 100 KPa.

### 3.2.4. Příprava vzorků

Navázili jsme potřebné množství extraktu, tak aby skutečná koncentrace byla 75 mg/ml (reálná 25 mg/ml). Odvážené množství testovaného extraktu jsme rozpustili v 600  $\mu$ l deionizované vody a umístili na vortex do úplného rozpuštění. Pro lepší rozpustnost jsme zkumavku umístili na pár minut do ultrazvukové lázně. Vytvořili jsme řadu 20-ti klesajících koncentrací extraktu s 1,5 ředěním.

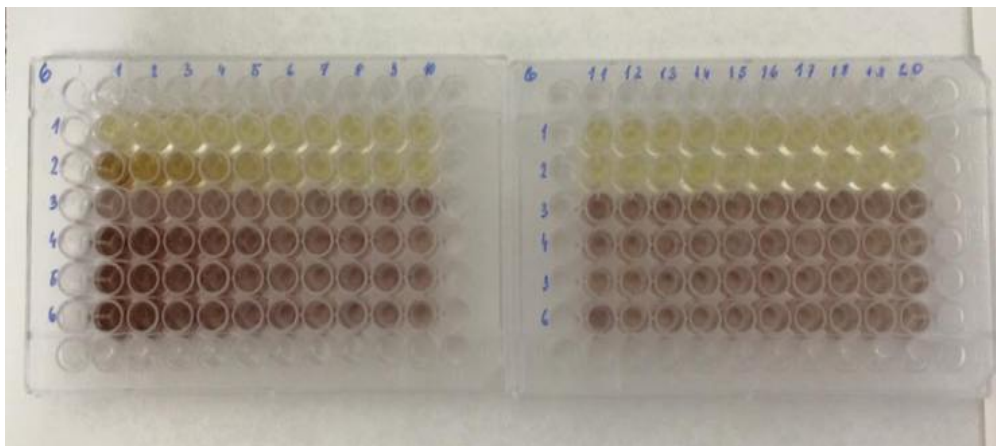


**Obrázek č. 12:** Připravené vzorky k nanášení do destiček (foto autor)

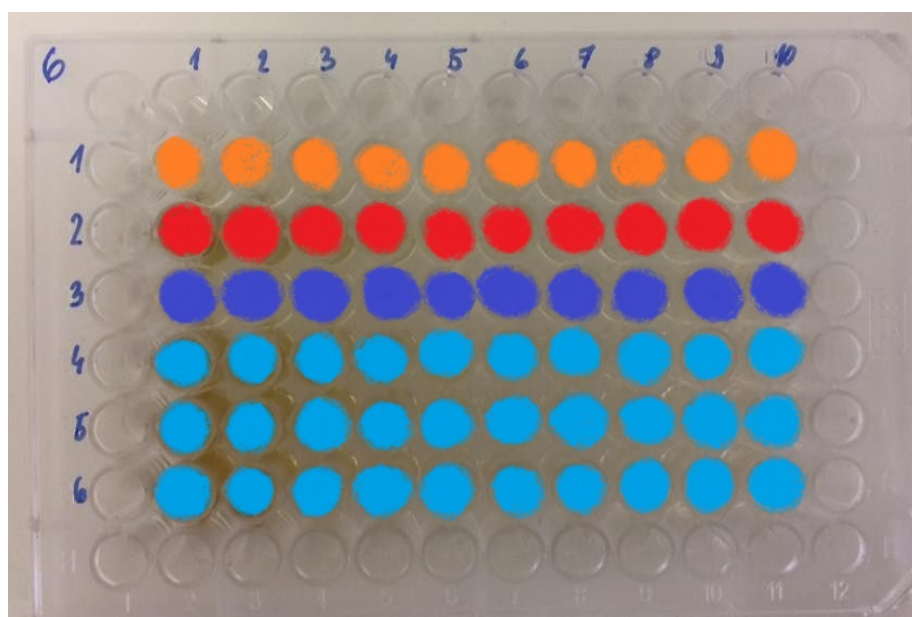
### 3.3. Vlastní provedení testů a vyhodnocení

Po vytvoření klesající řady testovaného extraktu se práce přesunula do laminárního boxu, kde jsme podle daných pravidel plnili mikrotitrační destičky. Na jeden extrakt jsme potřebovali 2 destičky a okraje destiček zůstali prázdné. Získali jsme šest řad, ve které byly následující látky. Nejdříve jsme do první řady napipetovali 150  $\mu$ l peptonu. Do druhé a třetí řady jsme napipetovali 100  $\mu$ l peptonu a do čtvrté, páté, šesté po 50  $\mu$ l peptonu. Poté jsme přidali 50  $\mu$ l testovaného extraktu do druhé, čtvrté, páté a šesté řady. Pipetování vzorků probíhalo od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Jako poslední jsme přidali 50  $\mu$ l *Tetrahymena thermophila* do třetí, čtvrté, páté a šesté řady.

Po naplnění destiček jsme změřili optickou hustotu v čase 0 na readeru ANTHOS 2010 při vlnové délce 492nm. Poté jsme destičky umístili na hodinu do inkubátoru bez přítomnosti světla při 25°C. Jako další krok jsme do všech jamek napipetovali 10  $\mu$ l MTT, umístili na pár minut na vortex a poté vložili zpátky do inkubátoru na 5 hodin od počátku. Po 5 hodinách jsme přidali 150  $\mu$ l DMSO do úplného rozpuštění krystalů.



**Obrázek č. 13:** Mikrotitrační destičky po naplnění (foto autor)



**Obrázek č. 14:** Schéma mikrotitrační destičky s 96-jamkami (foto autor + úprava v programu Malování)

## Popis mikrotitrační destičky:

řádek s označením 1: pepton 150  $\mu$ l

řádek s označením 2: pepton 100  $\mu$ l + extrakt 50  $\mu$ l

řádek s označením 3: pepton 100  $\mu$ l + *Tetrahymena thermophila* 50  $\mu$ l- kontrola

řádek s označením 4, 5, 6: pepton 50  $\mu$ l + extrakt 50  $\mu$ l + *Tetrahymena thermophila*  
50  $\mu$ l

Zkumavky	1. extrakt (mg/ml)	2. extrakt (mg/ml)	3. extrakt (mg/ml)	4. extrakt (mg/ml)	5. extrakt (mg/ml)	6. extrakt (mg/ml)	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (mg/l)
1	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	300,00
2	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	200,00
3	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	133,33
4	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	88,89
5	4,94	4,94	4,94	4,94	4,94	4,94	59,26
6	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	39,51
7	2,19	2,19	2,19	2,19	2,19	2,19	26,34
8	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	17,56
9	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	11,71
10	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	7,80
11	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	5,20
12	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	3,47
13	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	2,31
14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	1,54
15	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	1,03
16	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,69
17	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,46
18	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,30
19	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,20
20	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,14

**Tabulka č. 8:** Hodnoty řady koncentrací extraktů v jednotlivých zkumavkách

## Vyhodnocení

Ze získaných hodnot jsme sestrojili graf závislosti procentuální inhibice na koncentracích testovaných extraktů a pomocí statistického programu GraphPad Prism 6 byly zjištěny hodnoty střední inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  pro všechny testované extrakty.

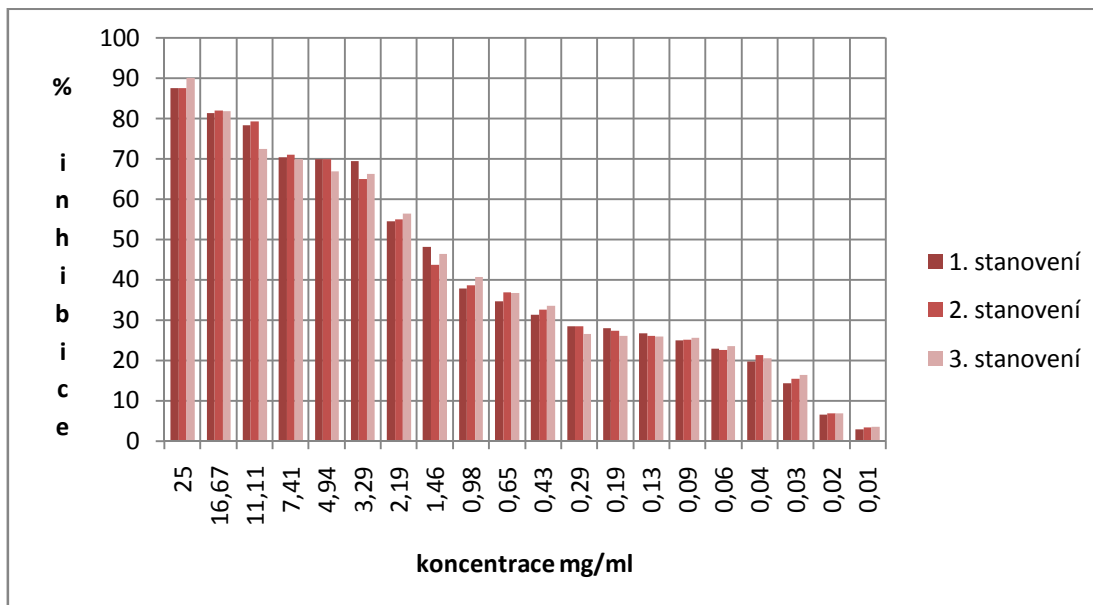
## 4. VÝSLEDKY

Všechny extrakty byly nanášeny na destičky ve 3 paralelních měřeních a každý experiment byl nejméně třikrát opakován. Do výsledků byly zaneseny hodnoty pouze ze dvou měření při vlnové délce 492nm.

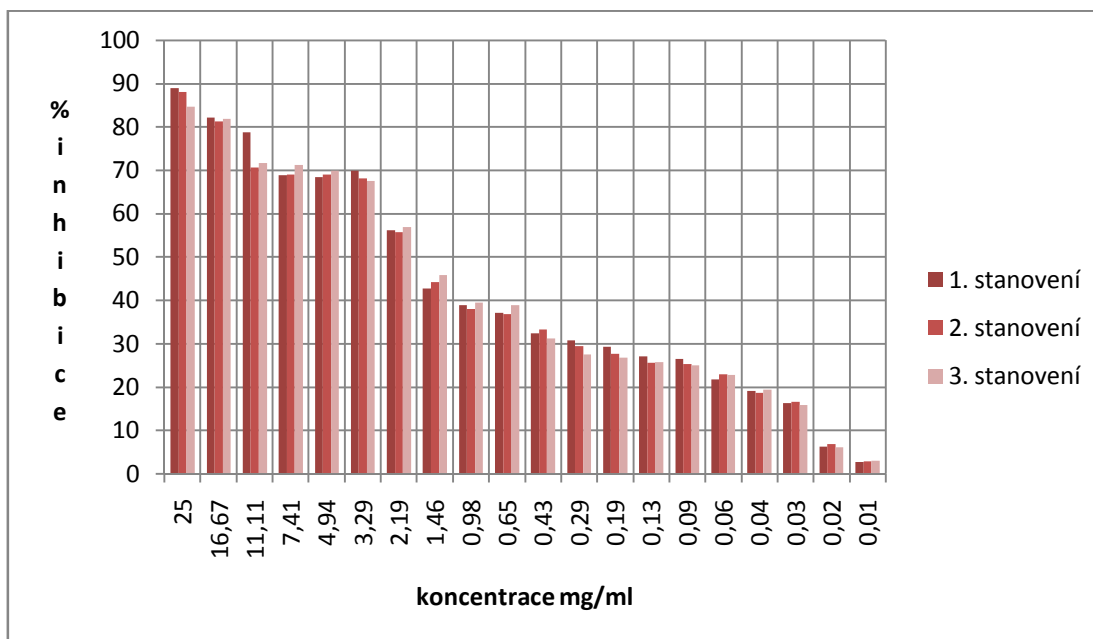
Výsledky procentuální inhibice *Tetrahymena thermophila* na koncentraci extraktů byly zaneseny do grafů a pro každý extrakt byla zjištěna hodnota střední inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>.

Pro kontrolu citlivosti a správnosti testování byl využit dichroman draselný ve své nejvyšší koncentraci 300 mg/l s ředěním 1,5. Jeho hodnota střední inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> byla 216,65 ± 6,576 mg/l.

#### 4.1. Extrakt č. 1 získaný z rostl. části *Salvia officinalis*



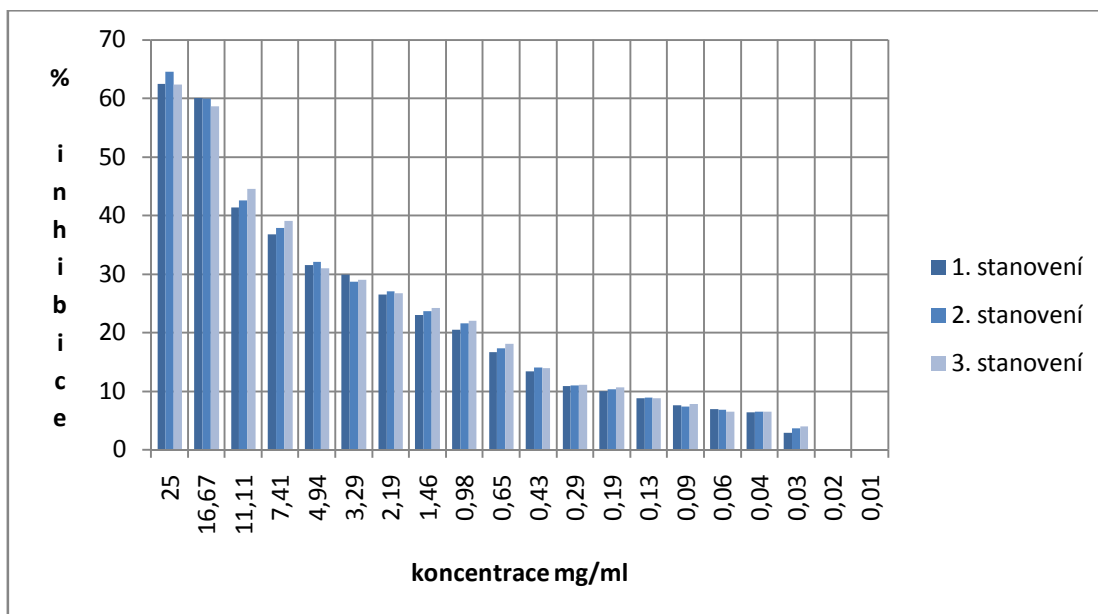
**Obrázek č. 15:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 1 při 1. měření



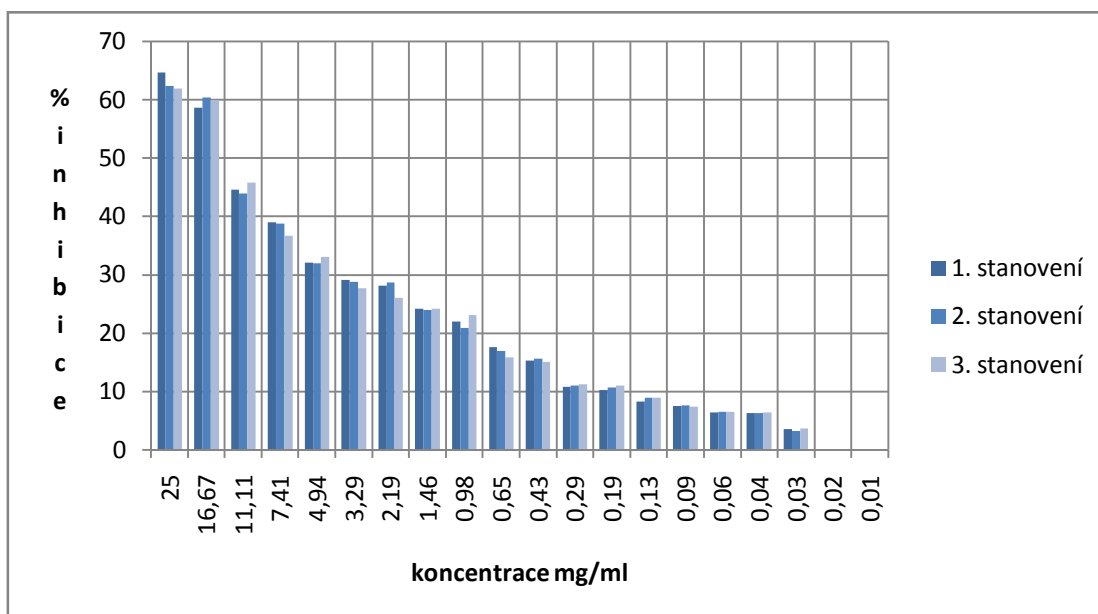
**Obrázek č. 16:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 1 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 1,317 \pm 0,004$  mg/ml**

## 4.2. Extrakt č. 2 získaný z rostl. části *Apium graveolens L.* *var. rapaceum*



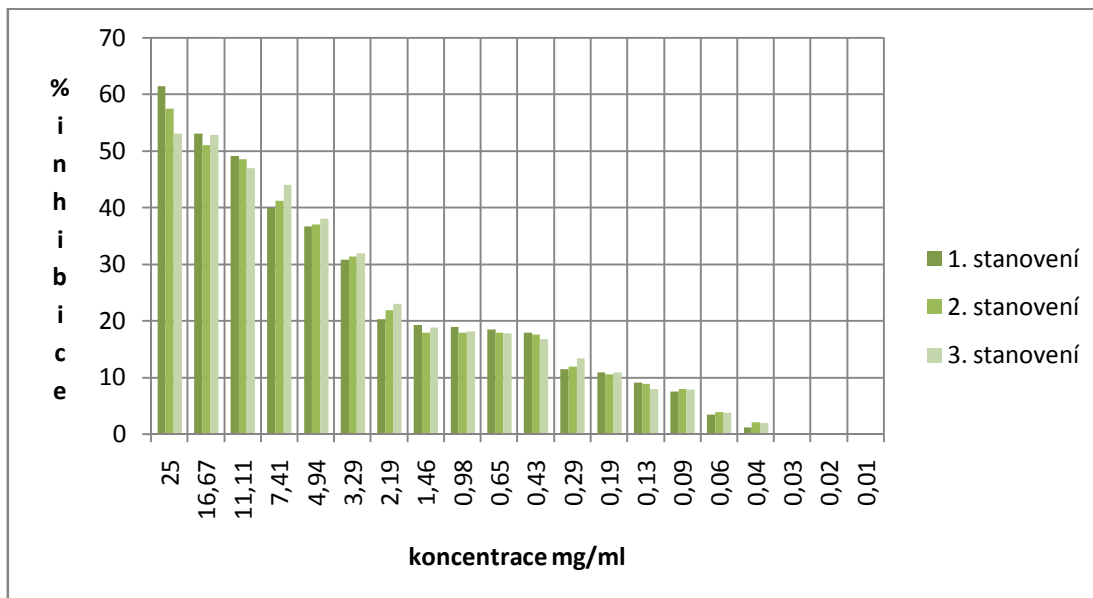
**Obrázek č. 17:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 2 při 1. měření



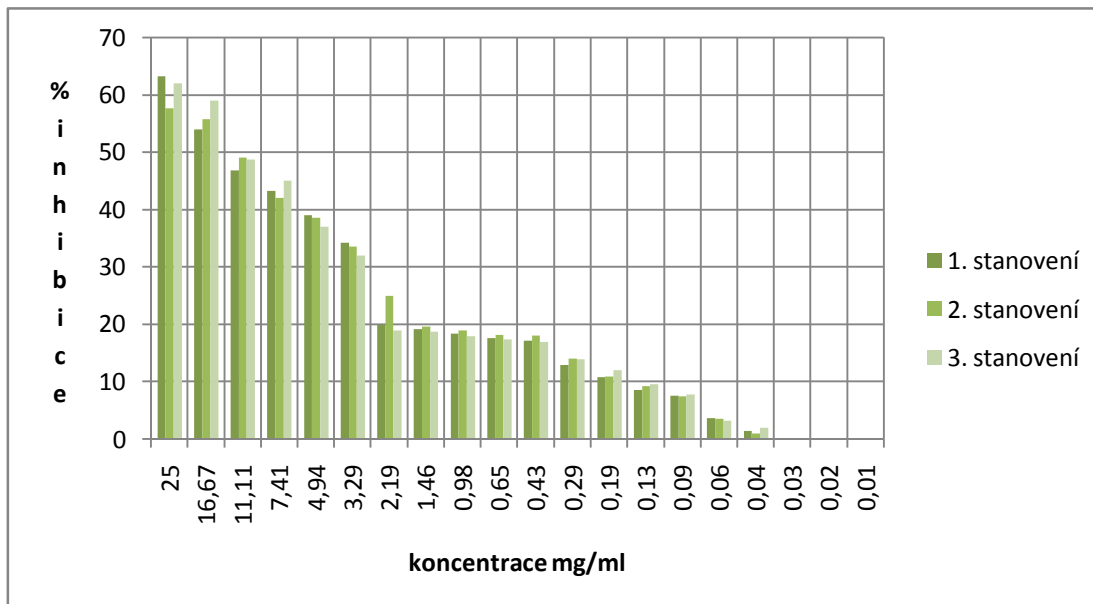
**Obrázek č. 18:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 2 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 13,18 \pm 0,311$  mg/ml**

### 4.3. Extrakt č. 3 získaný z rostl. části *Evodia rutaecarpa*



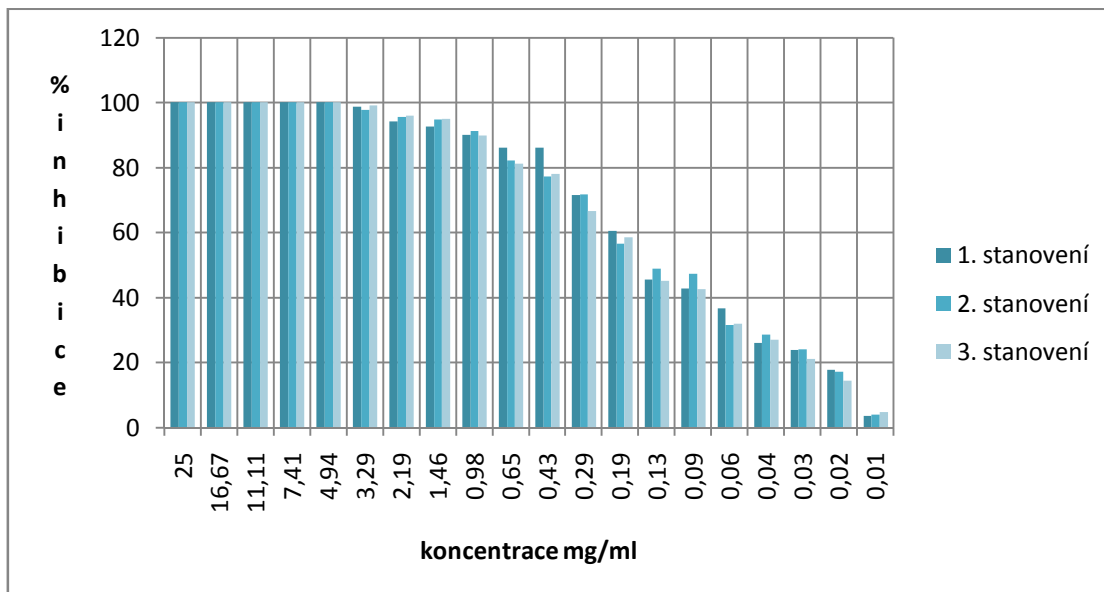
**Obrázek č. 19:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 3 při 1. měření



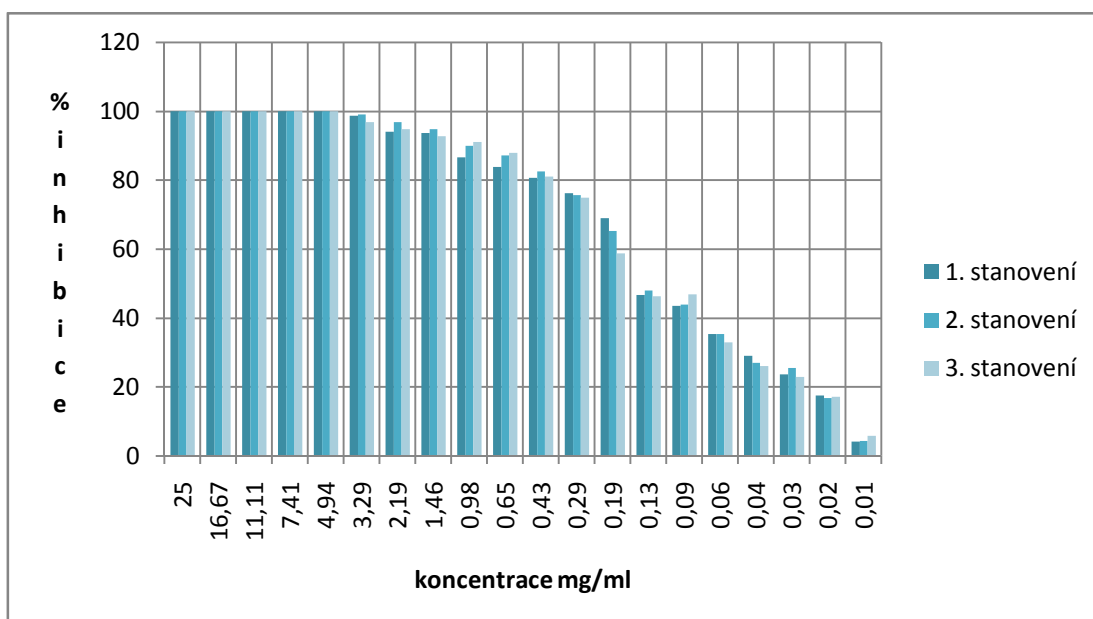
**Obrázek č. 20:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 3 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 13,07 \pm 1,442$  mg/ml**

#### 4.4. Extrakt č. 4 získaný z rostl. části *Coptis chinensis*



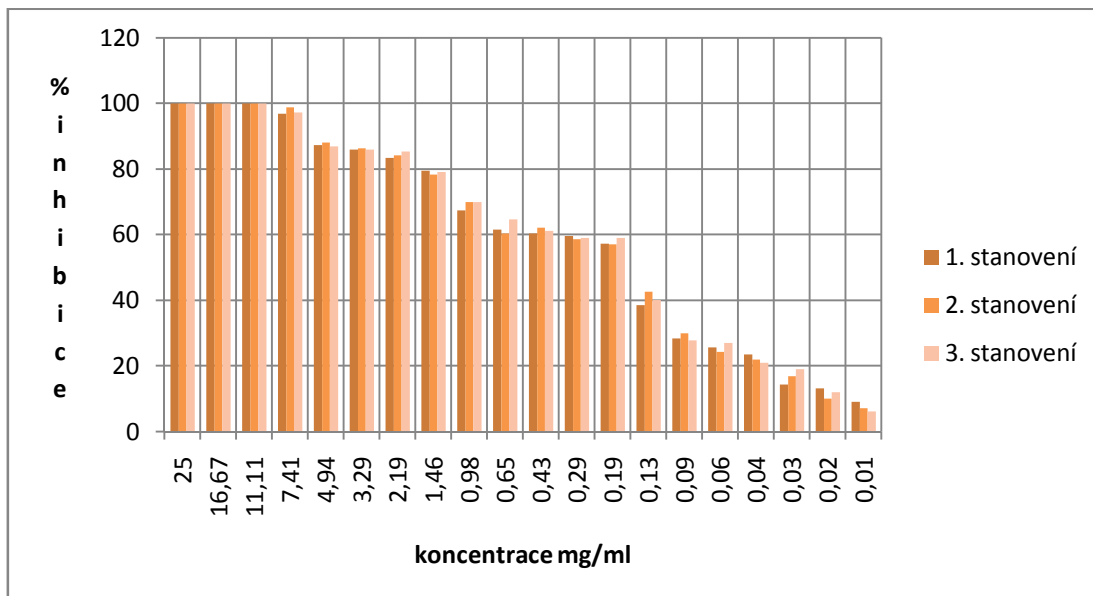
**Obrázek č. 21:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 4 při 1. měření



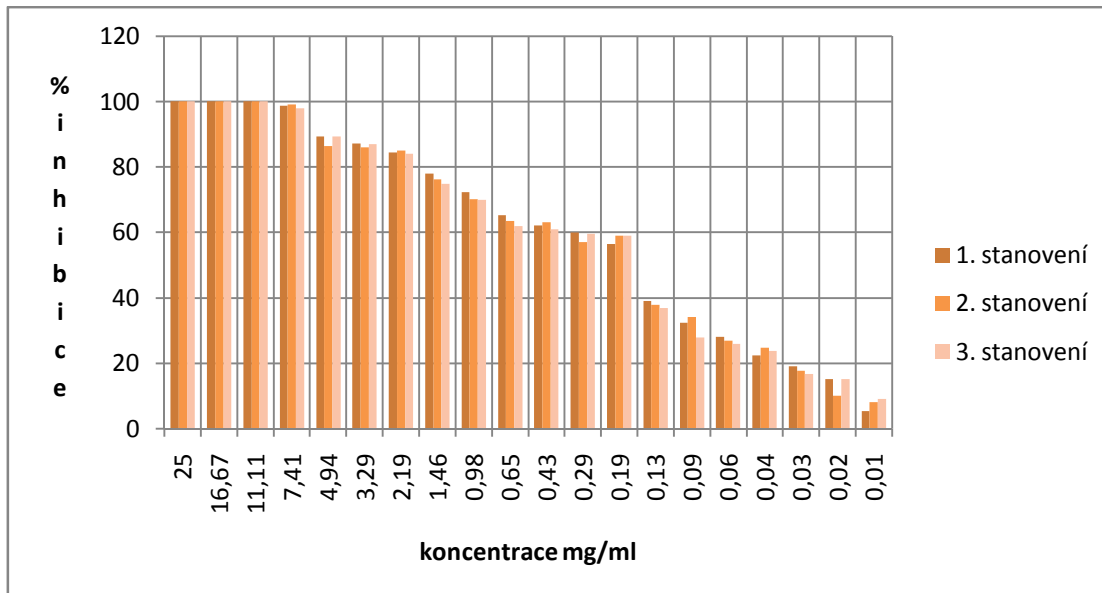
**Obrázek č. 22:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 4 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 0,116 \pm 0,007$  mg/ml**

#### 4.5. Extrakt č. 5 získaný z rostl. části *Zanthoxylum nitidum*



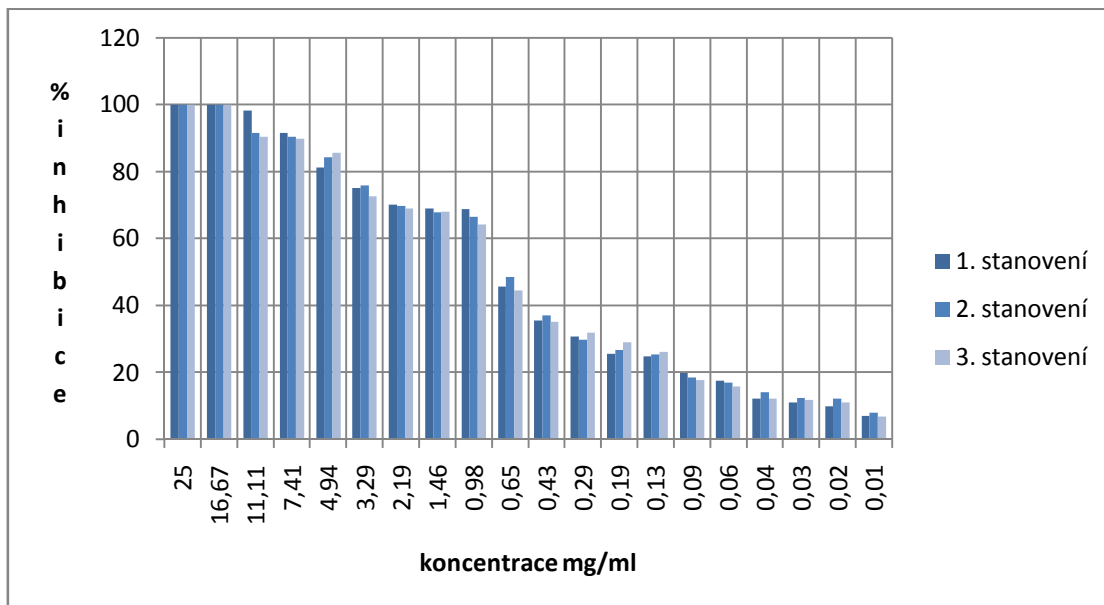
**Obrázek č. 23:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 5 při 1. měření



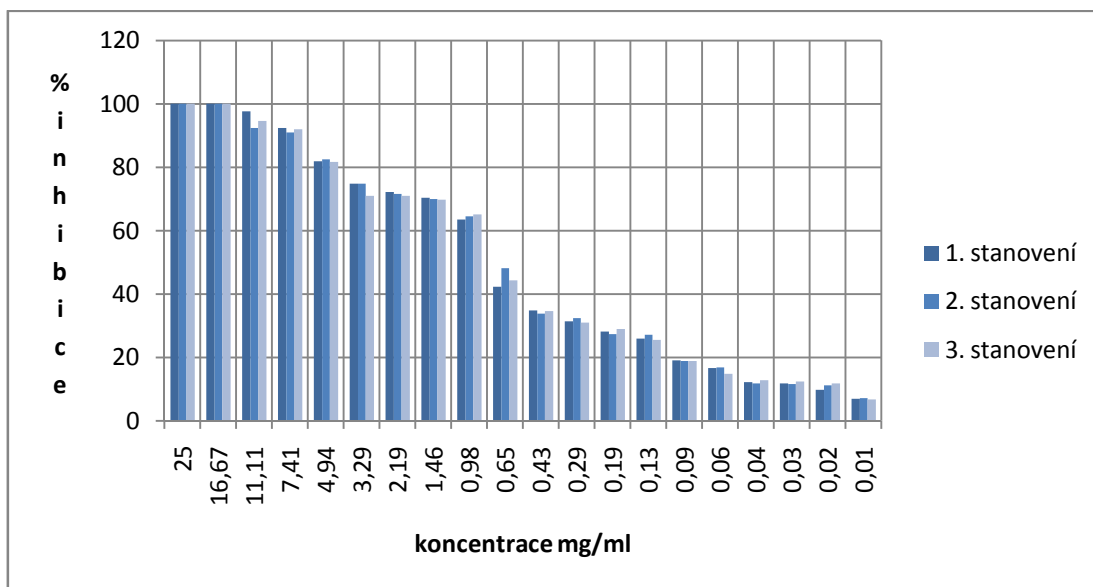
**Obrázek č. 24:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 5 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 0,225 \pm 0,006$  mg/ml**

#### 4.6. Extrakt č. 6 získaný z rostl. části *Ziziphus jujuba*



**Obrázek č. 25:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 6 při 1. měření



**Obrázek č. 26:** Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci extraktu č. 6 při 2. měření

**Hodnota střední inhibiční koncentrace  $IC_{50} = 0,622 \pm 0,001$  mg/ml**

## 5. DISKUSE

V této diplomové práci byla hodnocena antiprotozoální aktivita šesti extraktů z dostupných rostlinných zdrojů zpracovaných na Katedře botaniky a ekologie. Některé zmiňované rostliny nacházejí uplatnění v léčbě řady onemocnění a informace o jejich účincích jsou známy stovky let.

V první řadě nejstarším lékařským systémem, který využívá bylinnou léčbu je tradiční čínská medicína. Terapie léčivými rostlinami nachází uplatnění v řadě poruch souvisejících se stárnutím organismu například poruchy paměti, ale ne jen to (Adams et al., 2007). But uvedl ve své práci, že z 26 092 druhů rostlin uvedených v Flora Sinica, 19 % z nich je využíváno v bylinné medicíně, která je stále velmi zajímavým předmětem pro výzkum nových potencionálně účinných léčivých rostlin a jejich metabolitů (But et al., 1980).

Celosvětově narůstající mortalitu a morbiditu způsobují především infekční onemocnění. Jednou z možností terapie je léčba tradičními čínskými bylinami, které mají známé své účinky a využití po tisíce let. Ding do své studie zahrnul přes 1100 druhů rostlin, které mají využití při nachlazení, chřipce, malárii, úplavici, tuberkulóze a snažil se analyzovat protiinfekční účinek bylin a obsahových látek. Zjistil, že většina druhů pochází z čeledi *Asteraceae*, *Fabaceae* a *Lamiaceae*. Téměř  $\frac{1}{3}$  daných druhů má v Číně využití při zánětu nebo infekci (Ding et al., 2014).

Cílem této diplomové práce bylo porovnání antiprotozoální aktivity získaných extraktů z rostlinných částí *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum*, *Ziziphus jujuba*. Jako modelový organismus byl použit jednobuněčný organismus z obsáhlého kmene nálevníků *Tetrahymena thermophila*, který se vyznačuje snadnou kultivací, rychlým množením a dostatečnou citlivostí vůči toxickým látkám.

Z hodnot procentuální inhibice *Tetrahymena thermophila* na koncentracích testovaných extraktů byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> pro každý extrakt.

Extrakt	Hodnota IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Č. 1	1,317 ± 0,004
Č. 2	13,18 ± 0,311
Č. 3	13,07 ± 1,442
Č. 4	0,116 ± 0,007
Č. 5	0,225 ± 0,006
Č. 6	0,622 ± 0,001

**Tabulka č. 9:** Hodnoty střední inhibiční koncentrace pro každý testovaný extrakt

Prvním testovaným vzorkem byl extrakt pocházející z listu *Salvia officinalis*. Tento extrakt byl již využit v jiných studiích při testování antibakteriální, antifungální, antiprotozoální nebo antioxidační aktivity.

Ve studii, která se zabývala antiprotozoální aktivitou proti *Leishmania major* způsobující kožní formu leishmaniózy, byly testovány methanолоvé extrakty z *Calendula officinalis*, *Datura stramonium* a *Salvia officinalis*. Jako první byly aplikovány do mikrotitračních destiček s *Leishmania major* rostlinné extrakty a kolorimetrickým stanovením byla zjištěna hodnota IC<sub>50</sub>. Poté byly makrofágy infikovány tímto prvokem a léčeny těmito extrakty. Výsledky ukázaly na to, že rostlinné extrakty inhibovaly růst různých stádií *Leishmania major* a jejich hodnoty IC<sub>50</sub> byly 108,19 µg/ml pro *C. officinalis*, 155,15 µg/ml pro *D. stramonium* a 184,32 µg/ml pro *S. officinalis*. I přesto, že extrakty vykazovaly podstatě nižší toxicitu než látka miltefosin používanou k léčbě leishmaniózy, byla potvrzena účinnost extraktů v redukcii různých forem *Leishmania major* (Nikmehr et al., 2014).

Cílem další studie bylo optimalizovat podmínky a metody vodného extraktu z *Salvia officinalis* pro získání větší výtěžnosti polyfenolů, flavonoidů a maximální antioxidační aktivity. Optimálních výsledků bylo dosaženo při teplotě 201,5 °C a času extrakce 15,8 min. Antioxidační aktivita byla definována inhibiční koncentrací

$IC_{50} = 13,38 \mu\text{g/ml}$ , která vyjadřuje v tomto případě koncentraci zkoušeného roztoku k zachycení 50% volných radikálů (Pavlic et al., 2016).

V další studii byla studována cytotoxicita extraktu *Salvia officinalis* a *Thymus vulgaris* metodou MTT. Zvoleným subjektem byly nádorové buňky jater, které byly vystaveny různým koncentracím rostlinných extraktů (0-100 mg/ml) po dobu 24hod. Hodnoty střední inhibiční koncentrace byly u extraktu šalvěže 5,7 mg/ml a u tymiánu 4,3 mg/ml. Dále byla prokázána významná antioxidační aktivita extraktu *Salvia officinalis* získaného z listu rostliny (Kozics et al., 2013).

V našem experimentu byla zjištěna inhibice při nejvyšší koncentraci 90% a postupně se snižovala. Hodnota  $IC_{50}$  zjištěná pro tento extrakt byla  $1,317 \pm 0,004$  mg/ml.

Druhý zvolený extrakt byl získán ze semen ***Apium graveolens L. var. rapaceum***. V jedné studii byl použit práškový extrakt *Apium graveolens* spolu s *Pimpinella anisum* a *Crocus sativus* jako kombinace s analgetickým účinkem na poporodní bolesti. Studie se účastnily ženy ve věku 25-30 let, které buď užívaly tuto kombinaci přírodního produktu nebo kyselinu mefenamovou ze skupiny neselektivních inhibitorů COX. Výsledky poukázaly na to, že uživatelky s přírodním produktem měli patrnější snížení bolestivosti, jedinou nevýhodou byla délka trvání účinku, který byl kratší než efekt po kyselině mefenamové (Simbar et al., 2015)

Jedna ze studií měla za cíl posoudit gastroprotektivní účinek a antisekreční vlastnosti ethanolového extraktu *Apium graveolens* na krysách, kterým byl po třiceti šesti hodinách hladovění podán indomethacin. Extrakt poskytl v závislosti na podané dávce (250-500 mg/kg) ochranu proti tvorbě vředů a snížil sekreci žaludeční kyseliny. Předpokládá se, že gastroprotektivní účinek může souviset s antioxidačními vlastnostmi extraktu z *Apium graveolens* (Al-Howiriny et al., 2010).

V našem měření vykazoval extrakt z *Apium graveolens L. var. rapaceum* nejnižší inhibici ze všech testovaných extraktů. Inhibice *Tetrahymena thermophila* byla při nejvyšší koncentraci extraktu 64% a při posledních koncentracích byla 0%. Hodnota

IC<sub>50</sub> zjištěná pro tento extrakt byla 13,18 ± 0,311 mg/ml a v porovnání s ostatními působila na *Tetrahymena thermophila* nejméně toxicky.

Dalším extraktem v této diplomové práci byl použit extrakt získaný z plodu čínské rostliny ***Evodia rutaecarpa***. V následující studii byly izolovány chinolonové alkaloidy z plodu *Evodia rutaecarpa* a s pomocí spektroskopických metod identifikovány. *In vitro* u nich byla pozorována cytotoxická aktivita proti čtyřem buněčným nádorovým liniím (HL-60, N87, H-460, HepG2) metodou MTT. Všechny tyto buněčné linie byly kultivovány v mediu při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Hodnoty absorbance byly změřeny při 490nm. Testované alkaloidy vykazovaly inhibici v rozmezí IC<sub>50</sub> 13-23 μmol/l. Všechny chinolonové alkaloidy vykazovaly cytotoxickou aktivitu proti čtyřem liniím. Rozdílná cytotoxicita na použitých rakovinných buňkách je podle všeho způsobena rozdílným počtem dvojných vazeb a délkou postranního alifatického řetězce ve struktuře alkaloidů. V této studii byl potvrzen potencionální protinádorový účinek použitých sloučenin (Huang et al., 2012).

V další studii byla měřena antibakteriální a cytotoxická aktivita chinolonových alkaloidů izolovaných z plodu *Evodia rutaecarpa*. Antibakteriální aktivita byla měřena na kmenech *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*. Zjištěné hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 4-128 μg/ml. Patrné rozdíly v MIC byly zřejmě způsobeny rozdílnou délkou a substitucí postranního řetězce na uhlíku C2. Cytotoxicita byla stanovena metodou MTT a zvolenými subjekty byly nádorové buněčné linie (HepG2, Hela, BEL7402, BEL7403). Jako pozitivní kontrola byl použit doxorubicin s hodnotami IC<sub>50</sub> = 1,7-25,43 μmol/l. Získané hodnoty IC<sub>50</sub> pro některé chinolonové alkaloidy byly v rozmezí 15,85-56,36 μmol/l (Wang et al., 2013).

V našem experimentu byla zjištěna inhibice *Tetrahymena thermophila* u nejvyšší koncentrace vzorku 63% a spolu s předešlým extraktem vykazovaly nejnižší hodnoty procentuální inhibice. Hodnota IC<sub>50</sub> zjištěná pro tento extrakt byla 13,07 ± 1,442 mg/ml.

V pořadí čtvrtým vzorkem byl extrakt získaný z oddenku rostliny ***Coptis chinensis***, která je známá pro svůj vysoký obsah alkaloidů. Ve studii, která se zabývala potenciálními účinky berberinu, jakožto alkaloidu izolovatelného z *Coptis chinensis*,

byly shrnuty jednotlivá farmakologická uplatnění. Berberin je řazen mezi potenciální léčivo, které nachází uplatnění v léčbě diabetes mellitus, hyperlipidemie nebo rakoviny. Jedinou nevýhodou je velmi nízká perorální biodostupnost (Liu et al., 2016).

Cílem v další studii bylo ověřit antimikrobiální aktivitu berberinu izolovaného z *Mahonia aquifolium*. Antimikrobiální aktivita byla testována na 17 mikroorganismech (gramnegativní a grampozitivní bakterie, kvasinky, houby). Aktivita berberinu byla vyjádřena v IC<sub>50</sub> a MIC. Nejcitlivěji berberin působil proti *Staphylococcus aureus*, jeho hodnoty IC<sub>50</sub> byly 14,6 mg/l a MIC 212 mg/l. Naopak nejmenší aktivitu berberin vykazoval proti *Trichoderma viride*. Jeho zjištěné hodnoty IC<sub>50</sub> byly 809 mg/l a MIC 1345 mg/l (Čerňáková et al., 2002).

V další studii byl testován extrakt z *Coptis chinensis rhizoma* na modelu potkanů s dráždivým tračníkem. Metodou HPLC byly identifikovány z extraktu čtyři hlavní alkaloidy (jatorrhizin, coptisin, palmatin, berberin). Výsledky poukazují na to, že tento extrakt výrazně snižuje viscerální bolesti u potkanů, které jsou u dráždivého tračníku typické a také opakující. Předpokládá se, že účinek je dán snížením uvolňováním serotoninu ve střevě potkanů (Tjong et al., 2011).

V další práci studovali cytotoxicitu extraktů z *Rhizoma coptidis*, *Radix scutellariae* a *Cortex phellodendri*. Cílem studie bylo prověřit, zda by tyto extrakty mohly být použity v prevenci a léčbě očních infekcí, zvláště způsobené *Acanthamoeba keratitis*. U extraktu z *Rhizoma coptidis* došlo k poškození buněčné membrány a zániku buňky při koncentraci 1% a je proto nepravděpodobné, že by byl použit k léčbě očních infekcí. Zbývající dva rostlinné extrakty mají potenciál do budoucna pro využití v očních přípravcích (Boost et al., 2016).

Při našem měření extrakt vykazoval 100% inhibici pro prvních pět koncentrací (25-4,94 mg/ml) a ještě při koncentraci 0,19 mg/ml byla změřena inhibice *Tetrahymena thermophila* více než 60%. Ze všech testovaných extraktů působil nejvíce toxicky. Hodnota IC<sub>50</sub> zjištěná pro tento extrakt byla 0,116 ± 0,007 mg/ml.

Pátým testovaným vzorkem byl extrakt získaný z kořene *Zanthoxylum nitidum*. V jedné ze studií o *Zanthoxylum nitidum* byly testovány alkaloidy z kůry stromu a *in vitro* u nich byla hodnocena cytotoxicita na buněčných nádorových liniích (MC-7, NCI-H460, SF-268). Nejvíce cytotoxický z testování vyšel liriodenin s hodnotami střední inhibiční koncentrace v rozmezí 2,19-3,19 µg/ml. Skimmianin s hodnotami IC<sub>50</sub> v rozmezí 8,03-13 µg/ml. Pro posouzení cytotoxicity byl použit actinomycin D s hodnotami IC<sub>50</sub> 0,020-0,127 µg/ml (Yang et al., 2009).

V další studii měřili u izolovaných sloučenin z *Zanthoxylum nitidum* inhibici superoxidových radikálů, které byly produkovány neutrofily a které destrukovaly tkáň při chronické zánětlivé chorobě. Hodnoty střední inhibiční koncentrace některých sloučenin jako například decarinu, scopoletinu, sesaminu a fagarinu byly ≤ 7,95 µg/ml (Chen et al., 2011).

Cílem v další studii bylo prozkoumat účinek benzofenantridinových alkaloidů získaných z kořene *Zanthoxylum nitidum* var. *fastuosum* na čtyřech různých nádorových liniích (A549, Hela, SMMC-7721, EJ). U některých sloučenin byly změřeny hodnoty střední inhibiční koncentrace v rozmezí 16-60 µmol/l. Hodnoty měření prokázaly potencionální protinádorový účinek některých sloučenin (Wang et al., 2015).

V našem měření extrakt z kořene *Zanthoxylum nitidum* vykazoval při nejvyšší koncentraci inhibici *Tetrahymena thermophila* 100% a ta přetrvávala ještě další tři koncentrace. Hodnota IC<sub>50</sub> zjištěná pro tento extrakt byla 0,225 ± 0,006 mg/ml a ze všech extraktů byl druhý nejtoxičtější.

Poslední testovaný extrakt byl získán z plodu rostliny *Ziziphus jujuba*, která je hojně využívána v tradiční čínské medicíně. V jedné ze studií byl pozorován gastroprotektivní účinek extraktu získaného ze stonku kůry *Ziziphus jujuba*. Vodný extrakt vyvolal určité změny žaludeční sliznice u potkanů a účinek 400mg extraktu byl srovnatelný s účinkou ranitidinu podaného jiné testované skupině potkanů (Hamedi et al., 2015).

V další studii byla testována kyselina betulinová jakožto látka s potencionálním protinádorovým účinkem, která byla izolována z plodu *Ziziphus jujuba*. Kyselina

betulinová byla testována také společně v komplexu s  $\beta$ -cyklodextrinem, který zlepšil její rozpouštění. Výsledky studie potvrdily inhibici růstu rakovinných buněk MCF-7, inhibici buněčného cyklu a indukci apoptózy. Cytotoxicita byla vyhodnocena metodou MTT a hodnoty absorbance byly měřeny při 570nm. Výsledky  $IC_{50}$  komplexu byly 11,60  $\mu\text{mol/l}$  a  $IC_{50}$  samotné kyseliny betulinové 25,32  $\mu\text{mol/l}$ . Závěr studie ukázal, že komplex má silnější antiproliferativní účinek na rakovinných buňkách MCF-7 než samotná kyselina betulinová (Sun et al., 2013).

Výsledkem další studie bylo zjištění, že fenoly obsažené v semenech *Ziziphus jujuba* mohou sloužit jako zdroj antioxidantních látek a pomohou zvýšit životaschopnost neuronů (Choi et al., 2015).

V našem experimentu byla zjištěna inhibice *Tetrahymena thermophila* při nejvyšší koncentraci 100%. Hodnota  $IC_{50}$  zjištěná pro tento extrakt byla  $0,622 \pm 0,001$  mg/ml.

Dále bych ráda uvedla k porovnání výsledky kolegyně, se kterou jsme společně pracovali na získání extraktů a které taktéž použila ve své práci. Testovaným organismem v její práci byl *Artemia salina*. Z hodnot jejích měření získala  $LC_{50}$ , které byly u jednotlivých extraktů: *S. officinalis* 2,291 mg/ml, *A. graveolens* L. var. *rapaceum* 4,07 mg/ml, *E. rutaecarpa* 2,334 mg/ml, *C. chinensis* 0,1359 mg/ml, *Z. nitidum* 1,148 mg/ml, *Z. jujuba* 6,454 mg/ml (Ježková, 2016).

Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvíce toxický pro oba organismy (*Artemia salina*, *Tetrahymena thermophila*) byl extrakt z *Coptis chinensis* a také extrakt z *Zanthoxylum nitidum*. Naopak nejméně toxický pro organismus *Artemia salina* byl extrakt z *Ziziphus jujuba* a pro *Tetrahymena thermophila* extrakt z *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*.

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo určit cytotoxicitu - antiprotozoální aktivitu vybraných extraktů získaných z různých rostlinných částí *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum*, *Ziziphus jujuba*. Experimenty byly vyhodnoceny metodou MTT a jako modelový organismus byl použit *Tetrahymena thermophila*.

Získané práškové extrakty byly rozpuštěny v deionizované vodě a aplikovány do mikrotitračních destiček v rozmezí koncentrací 25,0-0,01 mg/ml spolu s peptonem a *Tetrahymena thermophila*. Během experimentu bylo přidáno barvivo MTT a nakonec DMSO. Od počátku provádění pokusu byla v časových intervalech měřena optická hustota při vlnové délce 492nm.

Ze získaných hodnot byly spočítány procentuální inhibice organismu v závislosti na koncentracích testovaných extraktů a dále byly spočítány pomocí programu GraphPad Prism 6 hodnoty střední inhibiční koncentrace pro každý extrakt zvlášť.

Získané hodnoty IC<sub>50</sub>:

<b>Extrakt získaný z <i>Salvia officinalis</i></b>	1,317 ± 0,004 mg/ml
<b>Extrakt získaný z <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i></b>	13,18 ± 0,311 mg/ml
<b>Extrakt získaný z <i>Evodia rutaecarpa</i></b>	13,07 ± 1,442 mg/ml
<b>Extrakt získaný z <i>Coptis chinensis</i></b>	0,116 ± 0,007 mg/ml
<b>Extrakt získaný z <i>Zanthoxylum nitidum</i></b>	0,225 ± 0,006 mg/ml
<b>Extrakt získaný z <i>Ziziphus jujuba</i></b>	0,622 ± 0,001 mg/ml

Z daných výsledků vyplývá, že největší inhibici *Tetrahymena thermophila* způsobil extrakt z *C. chinensis* a toxicita klesá v pořadí extrakt *C. chinensis* > extrakt *Z. nitidum* > extrakt *Z. jujuba* > extrakt *S. officinalis* > extrakt *E. rutaecarpa* > extrakt *A. graveolens* L. var. *rapaceum*.

Z daných výsledků vyplývá, že nejvíce cytotoxicky působil na *Tetrahymena thermophila* extrakt z *C. chinensis*.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adams M., Gmünder F., Hamburger M., Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature, *J. Ethnopharmacol.* 113, 2007, p. 303-381

Al-Howiriny T., Alsheikh A., Al-Yahya M. et al., Gastric antiulcer, antisecretory and cytoprotective properties of celery (*Apium graveolens*) in rats, *Pharm. Biol.* 48, 2010, p. 786-793

Ando V., Čížek H., Potužák M., Valíček P., Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny, Vyd. 1., Hradec Králové: Svítání, 1998, 321 s.

Asai D. J., Forney J. D., Tetrahymena thermophila, *Methods in Cell Biology*, Vol.62, Academic Press 2000, 580 s.

Bhattacharya S., Zaman K., Ghosh A. K., Histological and Physico-chemical Evaluation of *Zanthoxylum nitidum* Stem Bark, *Ethnobot. Leaflets* 13, 2009, p. 540-547

Boost M., Yau P., Yap M., Cho P., Determination of cytotoxicity of traditional Chinese medicine herbs, Rhizoma coptidis, Radix scutellariae and Cortex phellodendri, by three methods, *Cont. Lens Anterior Eye* 39, 2016, p. 128-132

But P. P. H., Hu S. Y., King C. Y., Vascular Plants Used in Chinese Medicine, *Fitoterapia* 51, 1980, p. 245-264.

Castleman M., Velká kniha léčivých rostlin: Klasický průvodce představující ta nejúčinnější - časem i vědou prověřená přírodní léčiva, Vyd. 1., Praha: Columbus, 2004, 635 s.

- Collier A. C., Pritsos Ch. A., The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay, *Biochem. Pharmacol.* 66, 2003, p. 281-287
- Čerňáková M., Košťálová D., Antimicrobial Activity of Berberine - a Constituent of Mahonia aquifolium, *Folia Microbiol.* 47, 2002, p. 375-378
- Dias N., Nicolau A., Carvalho G.S. et al., Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants, *J. Basic Microbiol.* 39, 1999, p. 103-108
- Ding W., Gu J., Cao L. et al., Traditional Chinese herbs as chemical resource library for drug discovery of anti-infective and anti-inflammatory, *J. Ethnopharmacol.* 155, 2014, p. 589-598
- Fang S. D., Wang L. K., Hecht S.M., Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*, *J. Org. Chem.* 58, 1993, p. 5025-5027
- Garran T. A., Naše bylinky v tradiční čínské medicíně Praktický průvodce, Vyd. 1., Brno: Computer Press, 2009, 311 s.
- Gascoigne S., Čínskou medicínou ke zdraví: jak se sami uzdravit pomocí bylinek, akupresury, čchi-kung a správné výživy, Vyd. 1, Praha: Knižní klub, 2000, 160 s.
- Hamedi S., Arian A. A., Farzaei M. H., Gastroprotective effect of aqueous stem bark extract of *Ziziphus jujuba* L. against HCl/Ethanol-induced gastric mucosal injury in rats, *J. Tradit. Chin. Med.* 35, 2015, p. 666-670
- Hausmann K., Hülsmann N., Protozoologie, Vyd. 1., Praha: Academia, 2003, 347 s.
- Hsieh T. J., Liu T. Z., Chern C. L. et al., Liriodenine inhibits the proliferation of human hepatoma cell lines by blocking cell cycle progression and nitric oxide-mediated activation of p53 expression, *Food Chem. Toxicol.* 43, 2005, p. 1117-1126

- Hu J., Zhang W. D., Shen Y. H. et al., Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 2007, p. 114-117
- Huang X., Li W., Yang X. W., New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa*, *Fitoterapia* 83, 2012, p. 704-714
- Huang Y., Wu Z., Su R. et al., Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research, *J. Chromatogr. B*, 2016, v tisku
- Chakrabarti R., Kundu S., Kumar S., et al., Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C, *J. Cell. Biochem.* 80, 2001, p. 133-138
- Chen J. J., Lin Y. H., Day S. H. et al., New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum*, *Food Chemistry* 125, 2011, p. 282-287
- Chiou W. F., Chou C. J., Shum A. Y. et al., The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: mode of action, *Eur. J. Pharmacol.* 215, 1992, p. 277-283
- Chiou W. F., Sung Y. J., Liao J. F. et al., Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages, *J. Nat. Prod.*, 60, 1997, p. 708-711
- Choi J., An X., Lee B. H. et al., Protective effects of bioactive phenolics from jujube (*Ziziphus jujuba*) seeds against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in neuronal PC-12 cells, *Food Sci. Biotechnol.* 24, 2015, p. 2219-2227
- Jahodář L., Farmakobotanika: semenné rostliny, Vyd. 2. upr a dopl., Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2009, 264 s.
- Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing, *Adv. Clin. Exp. Med.* 17, 2008, p. 525-529

- Ježková V., Hodnocení přírodních látek pomocí *in vivo* testů s *Artemia salina*, diplomová práce, Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016
- Kim D. S. H. L., Pezzuto J. M., Pisha E., Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1998, p. 1707-1712
- Kobayashi Y., Nakano Y., Kizaki M. et al., Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist, *Planta Med.* 67, 2001, p. 628-633
- Kong D.Y., Alexander I.G., Tom G.H. et al., Alkaloids from an Australian accession of *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae), *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 1996, p. 87-88
- Kozics K., Klusová V., Srančíková A. et al., Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells, *Food Chem.* 141, 2013, p. 2198-2206
- Liao C.H., Pan S.L., Guh J.H. et al., Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multidrug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells *in vitro* and *in vivo*, *Carcinogenesis* 26, 2005, p. 968-975
- Liu Ch. S., Zheng Y. R., Zhang Y. F. et al., Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability, *Fitoterapia* 109, 2016, p. 274- 282
- Mossman T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 1983, p. 55-63
- Nikmehr B., Ghaznavi H., Rahbar A. et al., . *In vitro* anti-leishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves, *Chin. J. Nat. Med.* 12, 2014, p. 423-427
- Novák J., Skalický M., Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika, Vyd. 1., Praha: Powerprint, 2008, 327 s.

- Ogasawara M., Matsubara T., Suzuki H., Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration, *Biol. Pharm. Bull.* 24, 2001, p. 720-723
- Opletal L., Skřivanová V., Přírodní látky a jejich biologická aktivita svazek 2., Vyd. 1., Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2010, 653 s.
- Patino O. J., Prieto R. J. A., Cuca S. L. E., Zanthoxylum genus as potential source of bioactive compounds, *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, 2012, p. 185-218
- Pavlic B., Vidovic S., Vlastic J. et al., Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products – process optimization by response surface methodology, *J. Supercrit. Fluids*, 2016, v tisku
- Peng W. H., Hsieh M. T., Lee Y. S. et al., Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety, *J. Ethnopharmacol.* 72, 2000, p. 435-441
- Sedlák E., Zoologie bezobratlých, Vyd. 1., Brno: Masarykova univerzita, 2000, 337 s.
- Simbar M., Shadipour M., Salamzadeh J. et al., The combination of “*Pimpinella anisum*, *Apium graveolens* and *Crocus sativus* (PAC)” is more effective than “mefenamic acid” on postpartum after-pain, *J. Herb. Med.* 5, 2015, p. 20-25
- Shen J. W., Zhang X. F., Peng S.L. et al., Chemical Constituents of *Zanthoxylum nitidum*, *Nat. Prod. Res. Dev.* 17, 2005, p. 33-34
- Stowe R. P., Koenig D. W., Mishra S. K. et al., Non destructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemulsion, *J. Microbiol. Methods* 22, 1995, p. 283-292
- Sun Y. F., Song Ch. K., Viernstein H. et al., Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulinic acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway, *Food Chem.* 138, 2013, p. 1998-2007

Tjong Y., Ip S., Lao L. et al., Analgesic effect of *Coptis chinensis* rhizomes (*Coptidis Rhizoma*) extract on rat model of irritable bowel syndrome, *J. Ethnopharmacol.* 135, 2011, p. 754-761

Tsai T. H., Lee T. F., Chen C. F. et al., Thermoregulatory effects of alkaloids isolated from *Wu-chu-yu* in afebrile and febrile rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 1995, p. 293-298

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., et al., The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested, *Toxicol. In Vitro* 22, 2008, p. 232–239

Wang X. X., Zan K., Shi S. P. et al., Quinolone alkaloids with antibacterial and cytotoxic activities from the fruits of *Evodia rutaecarpa*, *Fitoterapia* 89, 2013, p. 1-7

Wang Ch. F., Fan L., Tian M. et al., Cytotoxicity of benzophenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. var. *fastuosum* How ex Huang, *Nat. Res. Prod.* 29, 2015, p. 1380-1383

Yang Ch. H., Cheng M. J., Lee S. J. et al., Secondary Metabolites and Cytotoxic Activities from the Stem Bark of *Zanthoxylum nitidum*, *Chem. Biodivers.* 6, 2009, p. 846-857

<http://www.ucmp.berkeley.edu/protista/ciliata/ciliatalh.html> (staženo 15. 3. 2016)

<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Paramecium> (staženo 7. 3. 2016)

<http://www.sinicearasy.cz/pokr/dino> (staženo 15. 3. 2016)

<http://naturstuff.sweb.cz/botdir/koreni3.html> (staženo 18. 10. 2015)

<http://ozahrade.webnode.cz/products/celer-bulvovy/> (staženo 22. 3. 2016)

[http://greenearthinstitute.org/index.php?main\\_page=document\\_general\\_info&products\\_id=927](http://greenearthinstitute.org/index.php?main_page=document_general_info&products_id=927) (staženo 22. 3. 2016)

<http://www3.hhu.de/biodidaktik/Blattgewuerze/german/chemie/alkylphthalid.html> (staženo 22. 3. 2016)

[http://www.dermanet.cz/cs/kozni-choroby/abeceda-koznich-nemoci/fototoxicka-dermatitida-%28dermatitis-phototoxica%29\\_\\_s589x7313.html](http://www.dermanet.cz/cs/kozni-choroby/abeceda-koznich-nemoci/fototoxicka-dermatitida-%28dermatitis-phototoxica%29__s589x7313.html) (staženo 23. 3. 2016)

<http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=9011> (staženo 17. 11. 2015)

[http://www.rostliny.net/rostlina/Zanthoxylum\\_nitidum#.Vkr4s78Wxf0](http://www.rostliny.net/rostlina/Zanthoxylum_nitidum#.Vkr4s78Wxf0) (staženo 17. 11. 2015)

<http://botany.cz/cs/zizophus-jujuba/> (staženo 17. 11. 2015)

<http://www.chineseherbshealing.com/evodia-rutaecarpa/> (staženo 25. 3. 2016)

<http://www.itmonline.org/articles/evodia/evodia.htm> (staženo 25. 3. 2016)

<http://www.merriam-webster.com/dictionary/dynein> (staženo 7. 3. 2016)

<http://www.prirodnimedicina.cz/index.html> (staženo 15. 4. 2016)

<http://www.celostnimedicina.cz/koptis-cinsky.htm> (staženo 23. 4. 2016)

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Lenka Nechanická

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

## Antiprotozoální aktivita přírodních látek

Objevování nových účinných látek a rostlin s potencionálním antiprotozoálním účinkem je v dnešní době cílem mnoha studií a potřebné pro získání účinnějších léčiv v řadě protozoálních onemocnění. V této práci byla studována antiprotozoální aktivita extraktů získaných z různých rostlinných částí *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum* a *Ziziphus jujuba*. Vliv testovaných extraktů byl hodnocen na typickém jednobuněčném organismu *Tetrahymena thermophila* pomocí metody MTT. Ze získaných hodnot byla zjištěna procentuální inhibice *Tetrahymena thermophila* a pro každý extrakt spočítána hodnota střední inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>. Z testovaných extraktů měl největší antiprotozoální aktivitu extrakt z *C. chinensis*, dále aktivita extraktů klesala v pořadí *C. chinensis* > *Z. nitidum* > *Z. jujuba* > *S. officinalis* > *E. rutaecarpa* > *A. graveolens* L. var. *rapaceum*

Klíčová slova: antiprotozoální aktivita, *Tetrahymena thermophila*, cytotoxicita, přírodní látky

# Abstract

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec králové  
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Lenka Nechanická

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

## Antiprotozoal activity of natural substances

The discovery of new active substances and plants with a potential antiprotozoal effect nowadays is the aim of many studies and is required for obtaining more active drugs in a number of protozoal disease. In this study was investigated antiprotozoal activity of extracts obtained from various plant parts *Salvia officinalis*, *Apium graveolens* L. var. *rapaceum*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum* and *Ziziphus jujuba*. Effect of the tested extracts was evaluated in a typical unicellular organism *Tetrahymena thermophila* using MTT method. From the values obtained the percent inhibition was detected *Tetrahymena thermophila* and for each extract value calculated median inhibitory concentrations IC<sub>50</sub>. Of the extracts tested had the greatest antiprotozoal activity of the extract of *C. chinensis*, further extracts activity decreases in the order *C. chinensis* > *Z. nitidum* > *Z. jujuba* > *S. officinalis* > *E. rutaecarpa* > *A. graveolens* L. var. *rapaceum*

Key words: antiprotozoal activity, *Tetrahymena thermophila*, cytotoxicity, natural substances