

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY  
POMOCÍ *ARTEMIA SALINA***

**Evaluation of biological activity using  
*Artemia salina***

**Vedoucí rigorózní práce:** RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

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

**HRADEC KRÁLOVÉ 2016**

**Mgr. Radka Kvapilová**

## **Poděkování**

Na začátku bych chtěla poděkovat RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za její odborné vedení, čas a cenné rady při zpracovávání této rigorózní práce.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 292.

**PROHLÁŠENÍ:**

„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 využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2016

.....

# OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1. Členovci.....	9
3.1.1. Stavba těla.....	9
3.1.2. Smysly.....	9
3.1.3. Rozmnožování.....	10
3.2. Testovací organismus <i>Artemia salina</i> .....	11
3.2.1. Taxonomické zařazení.....	11
3.2.2. Anatomie žábronožky.....	12
3.2.3. Rozmnožování.....	13
3.2.4. Zastoupení žábronožky.....	13
3.2.5. Zajímavosti.....	14
3.3. Tradiční čínská medicína.....	15
3.3.1. Učení jin a jang.....	15
3.3.2. Učení o pěti elementech.....	15
3.4. Testované rostliny.....	17
3.4.1. <i>Epimedii herba</i> .....	17
3.4.2. <i>Salviae miltiorrhizae radix</i> .....	19
3.4.3. <i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i> .....	21
3.4.4. <i>Nelumbinis folium</i> .....	23
3.4.5. <i>Gardeniae fructus</i> .....	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1. Metoda.....	27
4.2. Použité pomůcky.....	29
4.3. Vyhodnocení testu.....	30
4.3.1. Příprava testu.....	30
4.3.2. Vyhodnocení testu.....	32
5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	34
5.1. <i>Epimedii herba</i> .....	35
5.2. <i>Salviae miltiorrhizae radix</i> .....	36

5.3. <i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i> .....	37
5.4. <i>Nelumbinis folium</i> .....	38
5.5. <i>Gardeniae fructus</i> .....	39
6. DISKUSE.....	40
7. ZÁVĚR.....	45
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	46
Abstrakt.....	51
Abstract.....	52

# 1. ÚVOD

Členovci tvoří největší kmen v celé živočišné říši. Zahrnuje velmi rozmanité skupiny od roztočů, kteří jsou okem neviditelní, až po velekraba japonského (*Macrocheira kaempferi*), který v rozpětí dosahuje až 4 metrů. Členovci jsou zastoupeni v takovém množství, že významně ovlivňují potravní vztahy a prostředí. Jsou přítomni ve všech místech na Zemi, od nejnižších propastí oceánů až po nejvyšší vrcholy hor, od nejsušších koutů pouští až po nejmokřejší deštné pralesy. (McGavin, 2000)

*Artemia salina* je primitivní vodní živočich. Typická je pro ni vysoká tolerance slanosti vody a přežití v prostředí s malým obsahem kyslíku. Její hlavní využití je především jako krmivo pro akvarijní ryby. (Dumitrascu, 2011) *Artemia salina* je díky své odolnosti často používána v alternativních zkouškách pro stanovování toxicity chemických a přírodních produktů. (Parra *et al.*, 2001)

Čínská medicína je částečně založena na myšlence, že energie (tzv. qi) teče podél drah v těle, kterým říkáme meridiány. Pokud je tok qi podél těchto meridiánů blokován nebo nesymetrický, pak může dojít k onemocnění. (www.webmd.com)

Čínský název pro léčivé byliny čínské medicíny je „ben cao“. Ben – rostlina s tuhým stonkem, cao – travina. Dříve se rostliny používaly samostatně, až od roku 220 př. n. l. jsou užívány směsi. (Li Wu, 2013)

Minerály, léčivé byliny a léky živočišného původu byly v Číně používány již od nepaměti. Během dlouhých let byly přírodní medikamenty stále zkvalitňovány a dále rozvíjeny. Čínská bylinná receptura využívá spoustu svých zkušeností ke správnému dávkování a kombinaci přísad, aby daný přípravek byl co nejúčinnější. (Li Wu, 2013)

Problémem bezpečnosti a kvality čínských bylinných léků jsou jedovaté byliny, kontaminace těžkými kovy, mikrobiální organismy a jiné nečistoty. Některé byliny nebo minerály jsou toxické. Musí být tedy používány s opatrností pod dohledem vysoce kvalifikovaných odborníků. (Li *et al.*, 2003)

Tradiční čínská medicína je čím dál víc populární. Jinak tomu není ani u pacientů s rakovinou. Čínská medicína hraje důležitou roli v minimalizaci vedlejších účinků léčby a zlepšuje tím kvalitu života. To zahrnuje především prevenci relapsu nebo metastáz, krvácení, radiační poškození, terapií vyvolané nevolnosti a zvracení. (Li *et al.*, 2013)

Staletí před vznikem chemických léků a léčiv využívali naši předkové speciální rostliny pro kontrolu symptomů chorob a nemocí. Úspěchy dovedly člověka k používání různých forem tradiční medicíny, které byly zodpovědné za udržování zdraví člověka po celá staletí. Ovšem jen do doby před více než sto lety, kdy chemici začali systematicky využívat malých molekul chemie. (Leung *et al*, 2016)

## 2. CÍL PRÁCE

Zjištění efektů vodných extraktů bylin využívaných se v tradiční čínské medicíně - *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Nelumbinis folium* a *Gardeniae fructus* na vodní organismus *Artemia salina* pro zjištění toxicity.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části jsou popsáni členovci – stavba těla, smysly a rozmnožování. Dále je zde popsána tradiční čínská medicína, testovaný organismus a jednotlivé zkoušené rostliny.

### 3.1. Členovci

Členovci jsou vysoce rozvinutá skupina bezobratlých živočichů. Zahrnují například stonožky, pavouky, roztoče, štíry, hmyz a korýše. Z hlediska druhové rozmanitosti jsou členovci na špičkové úrovni. Členovců existuje více než jeden milion druhů, drtivá většina z nich jsou hmyz. (Ruppert *et al.*, 2004)

Členovci patří k nejpočetnějším živočišným kmenům a mají nesmírný hospodářský význam. Ve vývoji prvoústých došli k největšímu stupni dokonalosti. (Jelínek *et al.*, 2000)

#### 3.1.1. Stavba těla

Členovci mají pevnou, tvrdou i pružnou vnější kostru, která slouží převážně k ochraně před vyschnutím, promočením a tlakem. Článkované končetiny jsou přizpůsobeny k mnoha činnostem. Například běhu, chůzi, plavání, skákání, létání, chytání kořisti, vábení partnera, oplození, bodnutí nepřítele. (Kantorek *et al.*, 1993)

#### 3.1.2. Smysly

Smyslové systémy členovců dokáží reagovat na velké množství vnitřních a vnějších podnětů. Dokáží rozpoznat zrakové, mechanické a chemické podněty. Někteří mají dokonce čidla rozpoznávající teplo a vlhko. (McGavin, 2000)

Oči jsou velmi důležité k nalezení potravy a třeba i partnera. Někteří mají složené oči. Jiní jednoduché, sloužící jen k rozlišení světla a tmy. Létající jedinci mají většinou větší oči a ostřejší vidění, někdy jsou situované na celém povrchu hlavy. Chemoreceptory sloužící ke vnímání čichu a chuti jsou například na ústních orgánech,

chodidlech a tykadlech. Díky tomu snadněji najdou potravu, a také vhodné místo na kladení vajíček. Mnoho členovců (hlavně hmyz) má na svém těle chloupky, které vnímají proudění vzduchu, otřesy i zvukové vlny. Uložení sluchových orgánů je též různé (cvrčci a kobylky je mají na holeních předních nohou). ( McGavin, 2000)

### **3.1.3. Rozmnožování**

U většiny členovců se musí samec a samice spářit dříve, než je samička schopná naklásť vajíčka. Jednotlivci se mohou jen náhodně potkat, někteří musí partnera nalákat pachem, zpěvem nebo světelnými efekty. K páření jsou často zapotřebí například křídla, tykadla, nohy, vylučování feromonů. Ne všechny samičky členovců potřebují samce. Mnohé umějí klást vajíčka i bez samce, jsou totiž partenogenetické. (McGavin, 2000)

## 3.2. Testovací organismus *Artemia salina*



Obrázek č. 1 : *Artemia salina*

(<https://sciencesediment.files.wordpress.com/2013/11/wp16392.jpg> ©)

### 3.2.1. Taxonomické zařazení

Říše: *Animalia* (živočichové)

Rozdíl mezi živočichem a rostlinou je, že rostlina si sama nedokáže vyrábět organické látky. Díky tomu je nucena požírat ostatní organismy. Živočichové mají schopnost reprodukce a dokáží vnímat podněty a reagovat na ně. Spousta se dokáže alespoň v některém stádiu života hýbat. Principem života je rozmnožit se a zajistit pokračování druhu. Mohou se rozmnožovat nepohlavně, ale také hlavně pohlavně, kdy potřebují k sobě druhého partnera. Délka života je také různá – od hodiny až po stovku let. (Raja *et al.*, 2000)

Kmen: *Arthropoda* (členovci)

Podkmen: *Crustacea* (korýši)

Korýši patří do kmene členovců. Tělo je kryto krunýřem, první dva páry hlavových končetin jsou tykadla, následující tři páry jsou kusadla a čelisti. Vývoj je nepřímý přes larvu nauplius. (Jelínek *et al.*, 2000)

Řád: *Anostraca* (žábřonožky)

Český název tohoto řádu jsou žábřonožky. Jejich tělo je protáhlé, ze stran zploštělé a nemá hřbetní krunýř. Je rozděleno na hlavu, hrud' a zadeček. Barva je obvykle načervenalá, může být i žlutá, zelená až modrá. Hrud' je složena z 11 článků, zadeček z 8 článků a telsonu. Tělo je zakončené vidlicí. Velikost žábřonožek bývá mezi 2 až 3 centimetry. Oči jsou složeny a jsou na stopkách, hrudní nožky jsou dlouhé, široké a lupenité. (Míčová *et al.*, 1993)

Na břišní straně zadečku mají samičky nepárový pestře zbarvený vak s vajíčky. Samečci jsou obdařeni hákovitými tykadly, kterými přidržují samičky při kopulaci. Zajímavostí je, že plavou na dně a to hřbetem dolů. Potravou je nejčastěji plankton, který filtrují z vody. Žábřonožky žijí po celém světě i ve velmi chladných oblastech. Vajíčka totiž vydrží v suchém bahně i několik set let. (Míčová *et al.*, 1993)

Rod: *Artemia*

Druh: *Artemia salina*, L. (žábřonožka solná)

### **3.2.2. Anatomie žábřonožky**

České jméno tohoto živočicha je žábřonožka solná. Patří k primitivním členovcům se článkovaným tělem. Dorůstá délky od 8-10 mm u samičky, 10-12 mm u samečka. Šířka obou pohlaví, včetně nohou, je přibližně 4 mm. Tělo je rozděleno na

hlavu, hrudník a břicho. Hrudník je složen z jedenácti článků - každý má dvojici plavacích nohou. Břicho se skládá z osmi segmentů. Přední dva břišní články jsou nazývány jako genitální segmenty. (Freeman, 1989)

### 3.2.3. Rozmnožování

Samička může klást vajíčka do děložních komor, jestliže jsou příznivé podmínky - dochází k jejich vývinu a vznikají nauplie (larvy). Pokud nejsou dobré podmínky, samička klade vajíčka – cysty, které mají mnohem tvrdší skořápku a neobyčejnou životaschopnost. *Artemia* tedy může vytvářet cysty, které plavou na hladině vody. Cysty jsou metabolicky aktivní, dokud nejsou uchovávány v suchu. Při ponoření do mořské vody pokračuje zárodek v přerušném metabolismu. (Lavens *et al.*, 1996)



Obrázek č. 2: Vývoj žábřonožky

(<http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/14/artemia-salina> ©)

### 3.2.4. Zastoupení žábřonožky

Žábřonožku můžeme najít v tropických, subtropických a mírných klimatických pásmech. *Artemia salina* žije ve velkém množství ve slaných jezerech a tůňích při mořském pobřeží. (Míčová *et al.*, 1993) Přestože se jí líbí v přírodní mořské vodě, nemůže migrovat z jednoho fyziologického biotopu do dalšího, protože je závislá na fyziologické adaptaci k vysoké slanosti. Schopnost produkce spících cyst zaručuje jejich

přežití. Žábřonožka je díky vodním ptákům přenášena do velké části světa. Plovoucí cysty drží totiž na nohou a peří ptáků. Beze změny zůstávají i při požití ptákem v jeho trávicím traktu. Předpokládá se, že díky nedostatku některých tažných ptáků, nejsou některé oblasti vhodné pro žábřonožku přirozeně obývány. (Lavens *et al.*, 1996)

V současnosti najdeme na Zemi sedm druhů žábřonožky - *Artemia tunisiana* (Evropa a severní Afrika), *Artemia species* (Amerika, část Evropy, Asie), *Artemia franciscana* (Amerika, část Evropy), *Artemia parthenogenetica* (Evropa, Afrika, Asie, Austrálie), *Artemia sinica* (střední Asie, Čína), *Artemia persimilis* (Argentina) a *Artemia urmiana* (Írán). ([www.artemiaworld.com](http://www.artemiaworld.com))

### 3.2.5. Zajímavosti

*Artemia* žila už v době dinosaurů, je zde asi 100 milionů let. Ve vaječném vaku samičky je asi 200 vajíček. Žábřonožka má tři oči - jedno prosté vzniká v larválním vývoji, v dospělosti se vyvíjejí další dvě oči složitější. *Artemia* nespí - je neustále vzhůru kvůli dýchání a živění se. Sameček má dva reprodukční orgány a má na hlavě dvě velké antény. Samička má jednu malou anténu a velký vaječný vak. ([www.artemiaworld.com](http://www.artemiaworld.com))



**Obrázek č. 3:** Fotografie samičky (nahore) a samečka (dole)

(<http://2.bp.blogspot.com/>-

LTw5V4\_r\_Zk/TbKwB0KcQFI/AAAAAAAAAHyY/WgzIRYeNFRg/s1600/AZS02300  
4R.jpg ©)

### **3.3. Tradiční čínská medicína**

Tradiční čínská medicína (TČM) je založena na vícestupňovém systému ošetřovatelských a diagnostických forem rozvíjejících se tři a půl tisíce let. Základem je jednota těla, mysli a duše. Hlavním smyslem tohoto učení je život v souladu se vším živým a dosažení nesmrtelnosti. K léčebným postupům patří akupunktura, léčivé byliny, výživa, meditace a tělesná cvičení. (Li Wu, 2013)

Zatímco si západní kultura prosadila v 17. století oddělení mysli od těla a člověka od přírody, čínská medicína trvá na svých principech. Západní lékař má čínskou medicínu za šarlatánství, čínský lékař uznává některé chirurgické zákroky a akutní medicínu. TČM je nakloněna všem novým směrům a postupům. (Hoffmann, 2002)

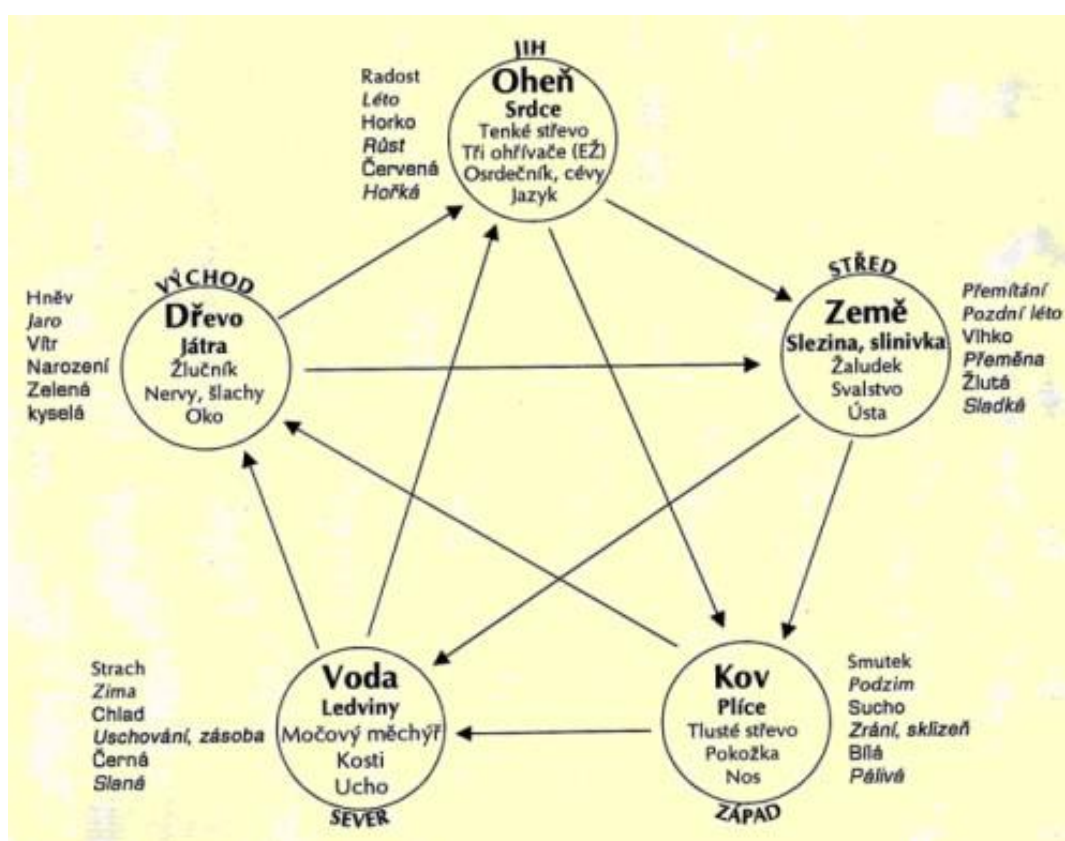
#### **3.3.1. Učení jin a jang**

Tato dvojice tvoří celek a současně jsou protichůdné. Jin představuje „temná strana hory“. Ztělesňuje Měsíc, zimu, noc, chlad, klid, pasivitu, ženu, hebkost, tmu a nitro. Oproti jang vyjadřuje „světlá strana hory“. Jde o Slunce, léto, den, teplo, aktivitu, muže, tvrdost a vnějšek. V TČM je lidské tělo pokládáno za strukturu jin – jang. Když mezi nimi panuje rovnováha, jedná se o zdraví. Pokud je však nerovnováha, jedná se o nemoc. Cílem této medicíny je vyrovnaní jinových a jangových aspektů těla. Jin v těle zaujímá dolní polovinu těla, přední stranu, pravou polovinu, vnitřní části, tělesné dutiny, plné orgány, pokožka a kosti. Jang v těle představuje horní polovinu těla, zadní stranu, levá polovina, vnější části, duté orgány, šlachy a chrupavky. (Li Wu, 2013)

#### **3.3.2. Učení o pěti elementech**

Další důležitou součástí čínské medicíny je učení o pěti elementech. Toto číslo je považováno za číslo života. Základem je vždy souhra jin a jang. Příkladem je semínko (jin), z něho vyrostne rostlina (jang), a ta se po uhynutí změní opět v jin (smrt). (Li Wu, 2013)

Elementy jsou dřevo, oheň, země, kov a voda. Teorií vzájemného rození je, že dřevo rodí oheň, neboť oheň vzniká při tření dřeva, které je zdrojem pro oheň. Oheň rodí zemi, protože oheň dává zemi popel a tím ji vytváří. Země rodí kov, protože zdrojem kovu jsou rudy pocházející ze země. Kov rodí vodu, neboť při vysokých teplotách kov kapalní a v kovových nádobách se pára sráží ve vodu. Voda rodí dřevo, protože voda dává vláhu rostlinám a díky ní pak rostou. (www.wudang.cz)



**Obrázek č. 4:** Pentagram s prvky, orgány a interakcí mezi nimi

(<http://www.tradicnicinska.cz/wp-content/uploads/2014/06/pentagram.jpg>) ©

## 3.4. Testované rostliny

### 3.4.1. *Epimedii herba*

*Epimedium sagittatum* je v češtině nazývána škornice šípolistá. Patří do čeledi *Berberidaceae*. Tato rostlina roste hlavně v horských oblastech a většina je distribuována z Číny. Je charakteristická štiplavou a sladkou chutí. Je jednou z nejstarších čínských afrodiziak, kterou objevil pastýř koz. Jeho kozel snědl škornici a poté se začal projevovat mnohem větší sexuální aktivitou než kdykoliv předtím. Proto je přezdívána Yin Yang Huo neboli bylina „prostopášného kozla“. (<http://www.herbal-store.cz>)

#### **Popis:**

Škornice je vysoká asi 30 – 50 cm. Její listy jsou trojčetné a vejčitého tvaru. Na konci mají zašpičatělý tvar a povrch je kožovitý. Květy jsou zbarvené do bíla či žluta. Kvetení je typické v trsech od dubna do května. *Epimedium* roste ve vlhké a dobře vyživované půdě. Nejrady má stinná místa. Tato rostlina vydrží mrazy až do -35°C, proto se dá pěstovat celý rok. (<http://www.herbal-store.cz>)



**Obrázek č. 5 :** *Epimedium sagittatum* ([http://www.vimax.cz/wp-content/uploads/2015/09/skornice\\_sipolista2.jpg](http://www.vimax.cz/wp-content/uploads/2015/09/skornice_sipolista2.jpg) ©)

### **Použití:**

*Epimedii herba* patří do čínské bylinné medicíny. Má prokazatelný účinek v léčbě kardiovaskulárních chorob, osteoporózy, přispívá ke zlepšení sexuálních a neurologických funkcí. (Sze *et al.*, 2010)

Dále posiluje ledviny, používá se na impotenci, sterilitu, cirhózu jater, časté močení a pomočování. Pomáhá od bolesti kloubů, svalových křečí, dětské obrně a revmatické bolesti. Uplatnění má i u příznaku astmatu a odstraňuje hlen. Používá se i u koronárních onemocnění srdce, vysokého krevního tlaku. (<http://www.shen-nong.com>)

### **Obsahové látky:**

Hlavní složkou *Epimedii herba* jsou flavonoidy. Mezi hlavní flavonoidy patří icarrin, který se dále extrahuje pro farmakologické studie. Dalšími látkami jsou polysacharidy a vitamín C, který též přispívá k anti-oxidačním vlastnostem. Též obsahuje kyselinu linolovou, kyselinu olejovou, kyselinu palmitovou, tanin, vitamín E, steroly. (Sze *et al.*, 2010)

Icariin je hlavní aktivní složkou *Epimedii herba*. Byl zkoumán v rámci léčby osteonekrózy hlavice stehenní kosti v králičím modelu. Po 12 týdnech se množství nově vytvořené kosti výrazně zvýšilo. Z tohoto důvodu může být slibnou osteogenní sloučeninou pro opravy kostních defektů a může zabránit zhroucení hlavice stehenní kosti. (Xie *et al.*, 2015)



**Obrázek č. 6:** *Epimedii herba*

([http://www.justingredients.co.uk/media/catalog/product/cache/1/image/1800x/040ec09b1e35df139433887a97daa66f/3/1/31yin-yin\\_yang\\_huo.jpg](http://www.justingredients.co.uk/media/catalog/product/cache/1/image/1800x/040ec09b1e35df139433887a97daa66f/3/1/31yin-yin_yang_huo.jpg)) ©

### 3.4.2. *Salvia miltiorrhizae radix*

*Salvia miltiorrhiza*, v češtině nazývána šalvěj červenokořená. V Číně je velice populární bylinou, především pro své účinky na cévy a krevní srážlivost. Čínský název této rostlinky je Dan Shen. Spotřeba každoročně enormně stoupá, protože je základem téměř všech čínských bylinných směsí. (Zhou *et al.*, 2005)

#### **Popis:**

Šalvěj červenokořená je vytrvalá, plstnatě chlupatá bylina z čeledi *Lamiaceae* (hluchavkovité). Roste do výšky 30–60 cm. Kořeny jsou větvené a dužnaté. Jejich barva je cihlově červená. Listy jsou jednoduché nebo složené. Květy mají světle nachovou až modrou barvu s nachově fialovým kalichem. Rostlina pochází z Číny, Japonska, Mongolska a Koreje. Roste na stráních, podél potoků a lesů. Kořen šalvěje červenokořenné (*Salviae miltiorrhizae radix*) patří k oficiální části čínského lékopisu. (Navrátilová *et al.*, 2013)



**Obrázek č. 7:** *Salvia miltiorrhiza*

([http://www.toxicology.cz/\\_soubory/figure/salvia.jpg](http://www.toxicology.cz/_soubory/figure/salvia.jpg) ©)

#### **Použití:**

*Salvia miltiorrhiza* má uplatnění v čínské kultuře v léčbě anginy pectoris, infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody. Studie prokázaly, že dokáže rozšířit koronární tepny, zvyšuje koronární průtok krve, snižuje volné radikály u ischemické

choroby srdeční, aby se snížilo poškození buněk z ischemie a zlepšuje srdeční funkci. (Ji *et al.*, 2000)

Též se používá k léčbě aterosklerózy, hyperlipidemie, cirhózy jater, hepatitidy, bolestí kloubů, menstruačních obtíží, nervozity a nespavosti. Ulevuje též od bolestí břicha. Zevně se aplikuje ve formě masti ze sušeného kořene. Často se používá v kombinaci s dalšími rostlinami. (Navrátilová *et al.*, 2013)

### **Obsahové látky:**

Rostlina obsahuje více než 90 sloučenin, které se dají rozdělit na lipofilní a hydrofilní. Lipofilními látkami jsou například diterpenické sloučeniny tanshinony I a II, isotanshinon, nortanshinon, cryptotanshinon a isocryptotanshinon I a II. Mezi hydrofilní látky patří zejména fenolické sloučeniny- salviol, salvianolové kyseliny A, B, C, D, E a F. Dále kyselina ursolová, rozmarýnová a kávová. (Tsai-Hui *et al.*, 2010)



**Obrázek č. 8:** *Salvia miltiorrhizae radix*

(<http://www.mdidea.com/products/herbextract/danshen/SalviaRoot01.jpg> ©)

### 3.4.3. *Zanthoxyli fructus pericarpium*

Český název pro tuto rostlinu je pepř sečuánský, čínský Hua Jiao. Patří k nejstarším čínským kořením. Dříve se používalo jako oběť bohům. Zmíněný pepř není příbuzný se známým pepřem černým. ([www.zivebylinky.cz](http://www.zivebylinky.cz))

#### **Popis:**

Jsou to červenohnědé sušené plody keře, který je podobný akátu a jmenuje se žlutodřev peprný (*Zanthoxylum piperitum*). Patří do čeledi *Rutaceae*. Roste v jihovýchodní Asii. Je to keř s ostny, který má střídavé a lichožpeřené listy. Květy vyrůstají ve svazcích. Plodem je tobolka. Tobolka se sklízí před dosažením své zralosti. Semena v tobolce jsou hořká, a proto se odstraňují. Také je nazýván jako japonský nebo čínský pepř či fagara. ([www.dia-potraviny.cz](http://www.dia-potraviny.cz))



**Obrázek č. 9:** *Zanthoxylum piperitum*

([http://www.plantica.cz/data/ep2/tn2\\_002042\\_001622.jpg](http://www.plantica.cz/data/ep2/tn2_002042_001622.jpg) ©)

### **Použití:**

Tato droga se využívá k výrobě diuretických přípravků, které podporují vylučování moči. Dále má protizánětlivé účinky a mírně snižuje krevní tlak. Peří sečuánský se také hojně využívá jako koření. (양 윤희 *et al.*, 2014)

### **Obsahové látky:**

Hlavní složkou jsou silice. Jsou to bohaté směsi různých těkavých a často i vonných látek, z nichž nejbohatější jsou terpeny (citral, phellandren, geraniol, cineol, citronellal). Dále obsahuje pyranokumariny (xanthoxyletin, xanthyletin), alkaloidy (skimmianin, dictamin), pryskyřice a škrob. ( [www.dia-potraviny.cz](http://www.dia-potraviny.cz))



**Obrázek č. 10:** *Zanthoxyli fructus pericarpium*

(<http://cdn3.volusion.com/dxhou.cjyfh/v/vspfiles/photos/BHC0042-2.jpg?1407930547>)

©)

### 3.4.4. *Nelumbinis folium*

Lotos je český název pro tuto rostlinu patřící do vyšších dvouděložných rostlin (čínsky He Ye). Lotosové listy dlouho patří k bylinám, které se používají na hubnutí v tradiční čínské medicíně. V neposlední řadě je to také tajná přísada v asijské kuchyni. (Chen *et al.*, 2012)

#### **Popis:**

Lotosy patří k exotickým vodním rostlinám, které rostou z hlízovitého zdužnatělého oddenku. Patří do čeledi *Nelumbonaceae*. Lotos pochází původně z Indie. Často se zaměňuje za leknín, protože si jsou velmi podobní. (Shen-Miller *et al.*, 2002)

Jedná se o vytrvalou vodní rostlinu, u které jednotlivé listy a květy rostou přímo z kořenového systému. Čepele listů jsou zelené a plavou na hladině vody nebo z ní vyčnívají. Průduchy listů jsou jen na vrchní straně listu. Žilnatina je paprsovitá. Jednotlivé květy jsou drženy nad vodní hladinou na dlouhých stvolech. Květy jsou velké a oboupohlavné. Doba kvetení probíhá během léta a může trvat 2 – 3 měsíce. Plod je nepukavý oříšek. (<http://eol.org>)



**Obrázek č. 11:** *Nelumbinis folium*

(<http://www.chineseherbshealing.com/wp-content/uploads/2013/08/he-ye.jpg> ©)

### **Použití:**

Lotosový list má hořkou chuť a je velmi dobrý jako prostředek k hubnutí. Má totiž diuretický a projímavý účinek. Působí pozitivně i na srdce, játra, slezinu, žluč a plíce. Přispívá k vitální funkci těla, rozptyluje krevní sraženiny, zastavuje krvácení a ulevuje od bolesti hlavy. Doporučená denní dávka je od 3 do 10 gramů. (/www.chineseherbshealing.com)

### **Obsahové látky:**

Oddenky lotosu obsahují škrob, asparagin, cukr, vitaminy a různé soli. Kořeny mají vlákninu, vitamin C, thiamin, riboflavin, vitamin B6, draslík, fosfor, měď a mangan. (Chen *et al.*, 2012)



**Obrázek č. 12:** *Nelumbinis folium*

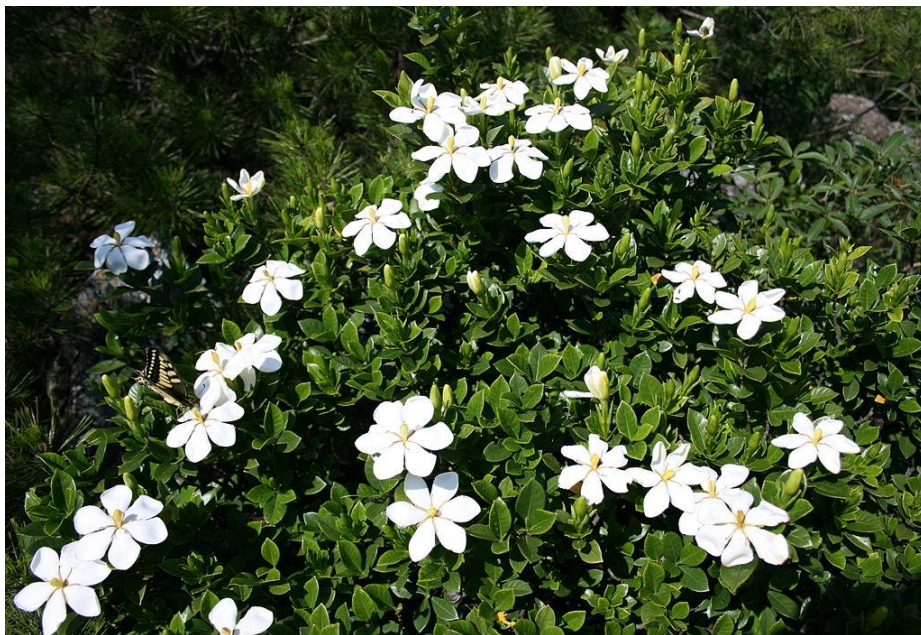
(<http://www.activeherb.com/img/chineseherbs/heyee.gif> ©)

### 3.4.5. *Gardeniae fructus*

*Gardeniae fructus* je jedna z mnoha léčivých bylin (čínsky Zhi Zi), která je používána v mnoha východních zemích jako v Koreji, Číně a Japonsku. Jedná se o sušené zralé plody *Gardenia jasminoides* (gardénie jasmínovitá) z čeledi *Rubiaceae*. (Lee *et al.*, 2013)

#### **Popis:**

Gardénie roste v hustých keřích. Pochází z jižní Číny. Tato rostlina se dorůstá výšky až 3 metry a ročně povyroste průměrně o 10-15 cm. Listy jsou zelené a lesklé. Květy jsou bílé a mají v průměru 10 cm. Jejich vůně připomíná jasmín. Žlutooranžová bobule ve tvaru vejce je plodem této rostliny. Nejčastěji se dá najít v křovinách a podél vodních toků v jižních částech Číny. (<http://toxicology.cz>)



**Obrázek č. 13:** *Gardenia jasminoides*

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/83/Gardenia\\_jasminoides\\_in\\_Mount\\_Yagi\\_2008-06-13.jpg/200px-Gardenia\\_jasminoides\\_in\\_Mount\\_Yagi\\_2008-06-13.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/83/Gardenia_jasminoides_in_Mount_Yagi_2008-06-13.jpg/200px-Gardenia_jasminoides_in_Mount_Yagi_2008-06-13.jpg) ©)

**Použití:**

Tato bylina se používá k léčbě nespavosti, podrážděnosti, úzkosti, zarudnutí očí, vysoké horečky, krvácení z nosu a krve v moči. Dále k podpoření funkce srdce, žaludku, plic a jater, působí proti bakteriím a má močopudný účinek. (Ni HY *et al.*, 2006)

**Obsahové látky:**

Plody gardénie obsahují iridoidní glykosidy - například genipin, geniposid, gardalosid, gardenosid, gardosid. Dalšími látkami jsou monocyklické monoterpenoidy - jasminodiol, jasminosidy. Dále triterpenoidy, cholin, flavonoidy, deriváty kys. chlorogenové, chinové a ursolové. (Chen Q. Ch. *et al.*, 2009)



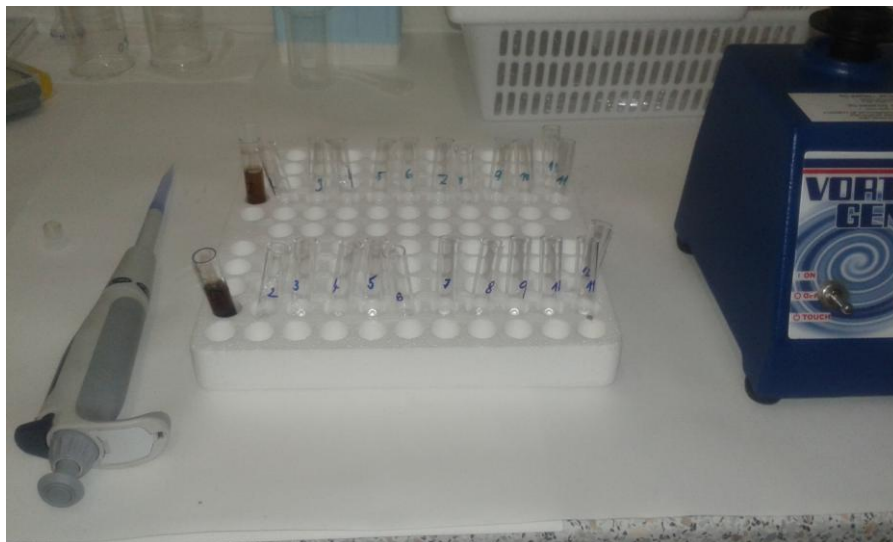
**Obrázek č. 14:** *Gardeniae fructus*

(<http://catstcmnotes.com/img/Herb%20Pics/Clear%20Heat/Drain%20fire/Zhi%20zi.jpg>)

©)

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části je popsána metoda, využití pomůcky a způsob vyhotovení testů.



Obrázek č. 15: Ředící řada zkoušené látky (foto autor)

### 4.1. Metoda

Příprava vodných extraktů rostlin:



Obrázek č. 16: Filtrát a odparek testované rostliny (foto autor)

Suchá rostlinná droga byla dodána firmou PRAGON s.r.o. se sídlem Imrychova 883, 143 00 Praha 4. Suchá droga byla v mixéru rozemleta na prášek. Na 1 g tohoto prášku bylo použito 15 ml vody. Tato voda byla zahřáta na 80-90 °C a nalita do destilační baňky, kam byla dána i rozdrčená rostlina. Baňka byla nasazena na vodní chladič a zahřívána na vodní lázni 15 minut. Poté byl extrakt zfiltrován. Do baňky bylo opět dáno odměřené množství vody ohřáté na 80-90 °C a vše bylo opakováno. Spojené filtráty byly zfiltrovány přes filtrační tubus neutrální křemeliny a čirý roztok byl odpařen na vakuové odparce při 60 °C až dosucha. Vznikl tmavě hnědý odparek.

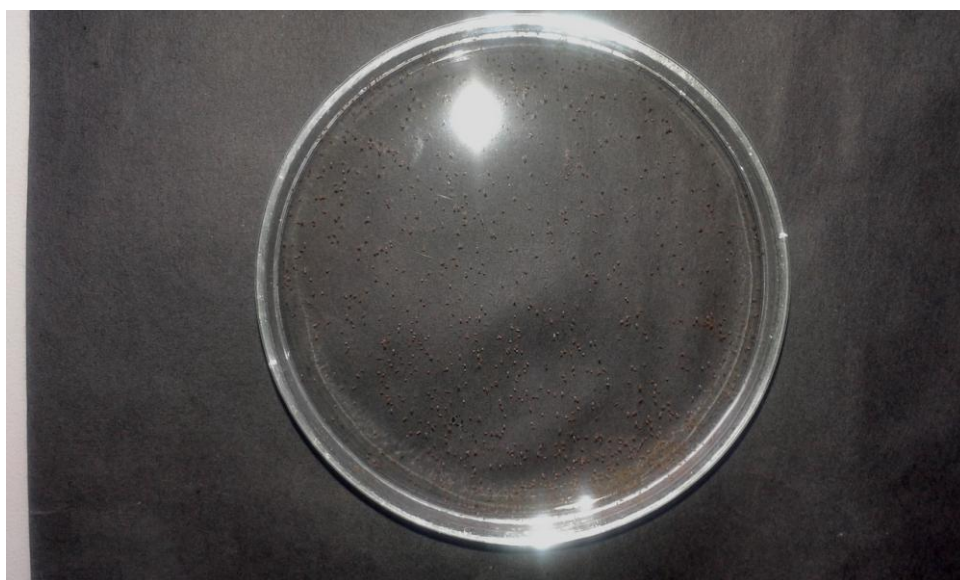


**Obrázek č. 17:** Filtrace přes křemelinu (foto autor)

#### Příprava testovaného organismu:

Cysty žábřonožek jsou k nám dováženy v konzervách, které pocházejí především z USA. Otevřená konzerva by měla být skladována bez přístupu světla a vlhkosti. Vajíčka jsou uchovávána ve skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem v lednici při teplotě 5°C.

Cysty *Artemia salina* byly naváženy do Petriho misky. Následně byly smáčeny uměle připravenou mořskou vodou. Petriho miska byla uzavřena a umístěna do inkubátoru s teplotou 25°C. Zde se po dobu 24 hodin a přítomnosti světla lýchly. Nevylíhnutá vajíčka byla na dně, prázdné skořápky plavaly na hladině.



**Obrázek č. 18:** Petriho miska s *Artemia salina* (foto autor)

## 4.2. Použité pomůcky

Analytické digitální váhy KERN ABJ

Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN

Třepačka VORTEX-GENIE 2

Mikroskop LEICA EZ4D

Malé zkumavky

96-jamková mikrotitrační destička typ F Fischer Brandt

Petriho miska

Mikropipeta

### 4.3. Vyhodnocení testu



Obrázek č. 19: Mikrotitrační destička (foto autor)

#### 4.3.1. Příprava testu

Jednotlivé extrakty rostlin byly naváženy na analytických vahách, převedeny do malých zkumavek a rozpuštěny v mořské vodě. Aby se látky dobře rozpustily, byly vloženy do ultrazvukové lázně.

Testovaná řada jednotlivých drog vznikla při ředícím koeficientu 1,5. Tato řada celkem čítala 11 zkumavek s postupně klesající koncentrací včetně negativní kontroly.

Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo odměřeno 100 $\mu$ l mořské vody u negativní kontroly a do zbylých jamek bylo napipetováno 100 $\mu$ l jednotlivých koncentrací testovaných látek. Nakonec ještě do každé jamky bylo vloženo pomocí plastového kapátka přesně 10 *Artemia salina*. Byl využit systém promývacích jamek, aby nedošlo ke snížení reálné koncentrace jednotlivých jamek. (Mayorga *et al.*, 2010), (Ghiasuddin *et al.*, 2011)

**Tabulka č. 1:** Hmotnosti jednotlivých drog

<b>Rostlinná droga</b>	<b>Hmotnost suché rostliny před extrakcí [g]</b>	<b>Hmotnost extraktu [g]</b>
<i>Epimedii herba</i>	8,0	1,1824
<i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	9,0	4,3565
<i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i>	10,0	0,9973
<i>Nelumbinis folium</i>	9,0	1,5562
<i>Gardeniae fructus</i>	9,0	2,3652

**Tabulka č. 2:** Koncentrace testovaných extraktů v mg/ml

Zkumavka č.	Koncentrace extraktu <i>Epimedii herba</i>	Koncentrace extraktu <i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	Koncentrace extraktu <i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i>	Koncentrace extraktu <i>Nelumbinis folium</i>	Koncentrace extraktu <i>Gardeniae fructus</i>
1.	10	25	10	10	6,67
2.	6,67	16,67	6,67	6,67	4,44
3.	4,44	11,11	4,44	4,44	2,96
4.	2,96	7,41	2,96	2,96	1,98
5.	1,98	4,94	1,98	1,98	1,32
6.	1,32	3,29	1,32	1,32	0,88
7.	0,88	2,19	0,88	0,88	0,59
8.	0,59	1,46	0,59	0,59	0,39
9.	0,39	0,98	0,39	0,39	0,26
10.	0,26	0,65	0,26	0,26	0,17
11.	0,17	0,43	0,17	0,17	0,12

Konečné koncentrace jednotlivých extraktů, použitých pro vlastní testování, vyšly z předběžných (preliminary) testů toxicity, kde byl zvolen širší rozsah testovaných koncentrací. Na základě těchto testů bylo zvoleno již užší rozpětí testovaných extraktů a rozdílná počáteční koncentrace testovaných extraktů, která vycházela z podmínky úplného rozpuštění testované navážky.

#### **4.3.2. Vyhodnocení testu**

Po 24 hodinách následovalo vyhodnocení testu. Pod mikroskopem byly spočítány artemie, které již nejevily známky života. Z tohoto údaje byla vypočítána hodnota  $LC_{50}$ , což je letální koncentrace, při které zemře 50% jedinců během 24 hodin. U každého testu byl proveden test se standardním toxinem chloridem manganatým pro ověření citlivosti testu.

## 5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Jednotlivé látky byly testovány třikrát. Jako kontrola citlivosti organismu a standardní proveditelnosti testů byl užit chlorid manganatý, který byl opakovaně testován při každém experimentu. Střední letální koncentrace chloridu manganatého je:

$$LC_{50} = 102,02 \pm 10,30 \text{ mg/ml.}$$

Pro ilustraci byly vytvořeny tabulky a grafy závislosti procenta inhibice *Artemia salina* na koncentraci jednotlivých látek.

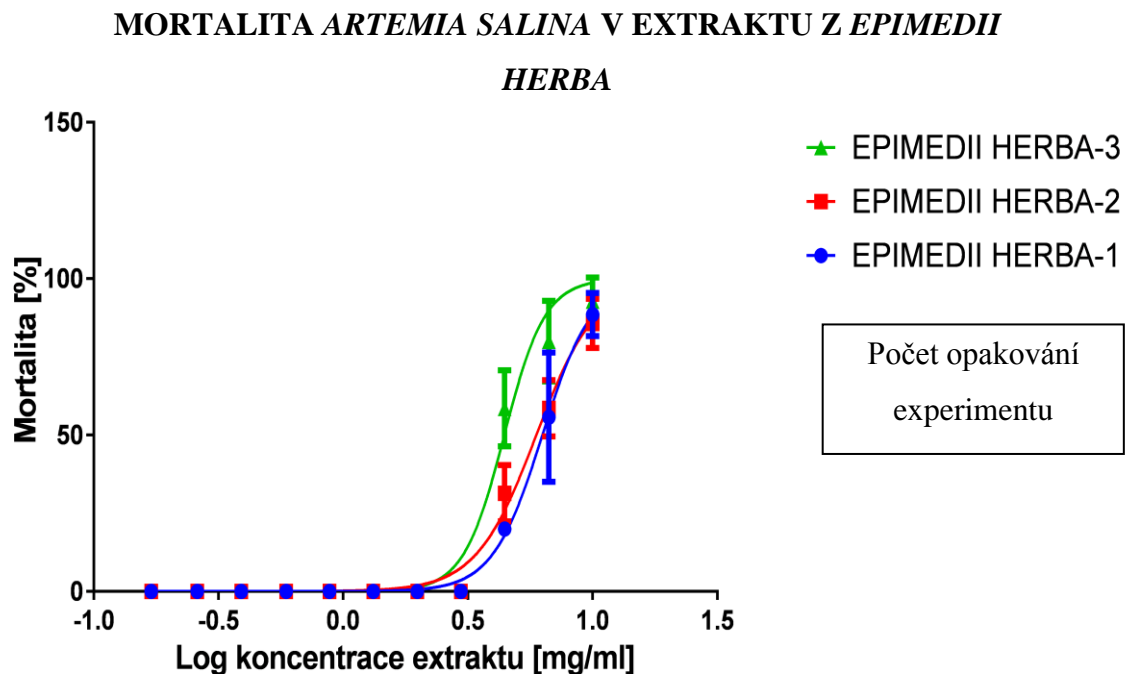
V programu GraphPad Prism 5 Project byla spočítána hodnota střední letální inhibice  $LC_{50}$  nelineární regresí.

## 5.1. *Epimedii herba*

Tabulka č. 3: Procentuální inhibice *Epimedii herba*

Koncentrace [mg/ml]	Průměr inhibice 3 měření [%]
10	89,05
6,67	64,76
4,44	36,67
2,96	0
1,98	0
1,32	0
0,88	0
0,59	0
0,39	0
0,26	0
0,17	0

Obrázek č. 20: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci *Epimedii herba*



Hodnota střední letální koncentrace *Epimedii herba*:

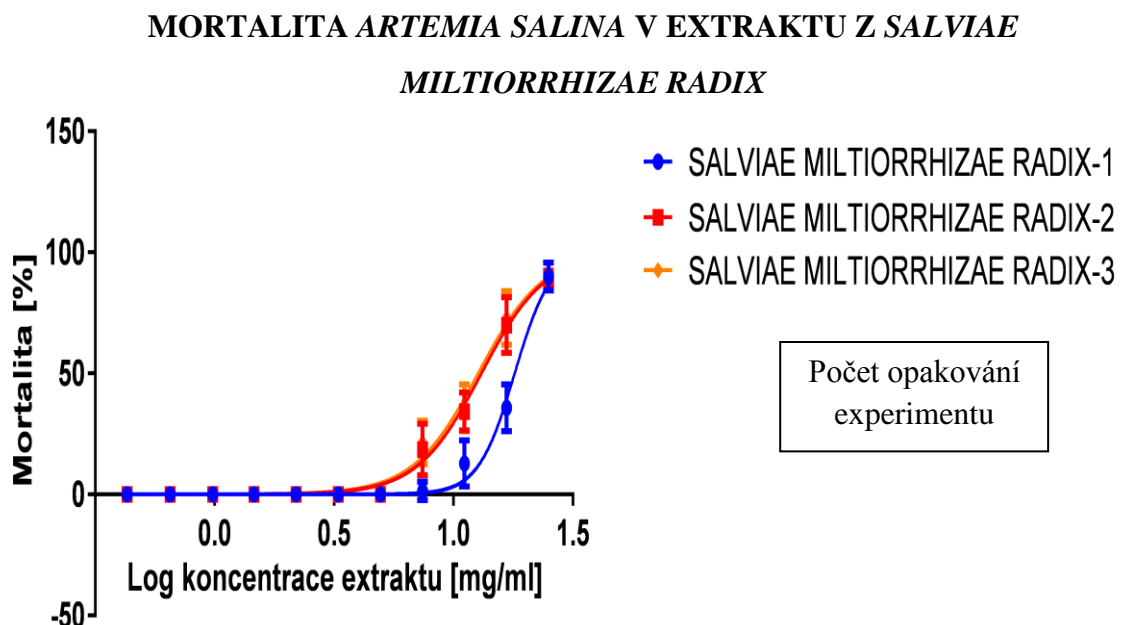
$$LC_{50} = 5,55 \pm 0,81 \text{ mg/ml}$$

## 5.2. *Salviae miltiorrhizae radix*

Tabulka č. 4: Procentuální inhibice *Salviae miltiorrhizae radix*

Koncentrace [mg/ml]	Průměr inhibice 3 měření [%]
25	82,95
16,67	42,05
11,11	23,57
7,41	0
4,94	0
3,29	0
2,19	0
1,46	0
0,98	0
0,65	0
0,43	0

Obrázek č. 21: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci *Salviae miltiorrhizae radix*



Hodnota střední letální koncentrace *Salviae miltiorrhizae radix*:

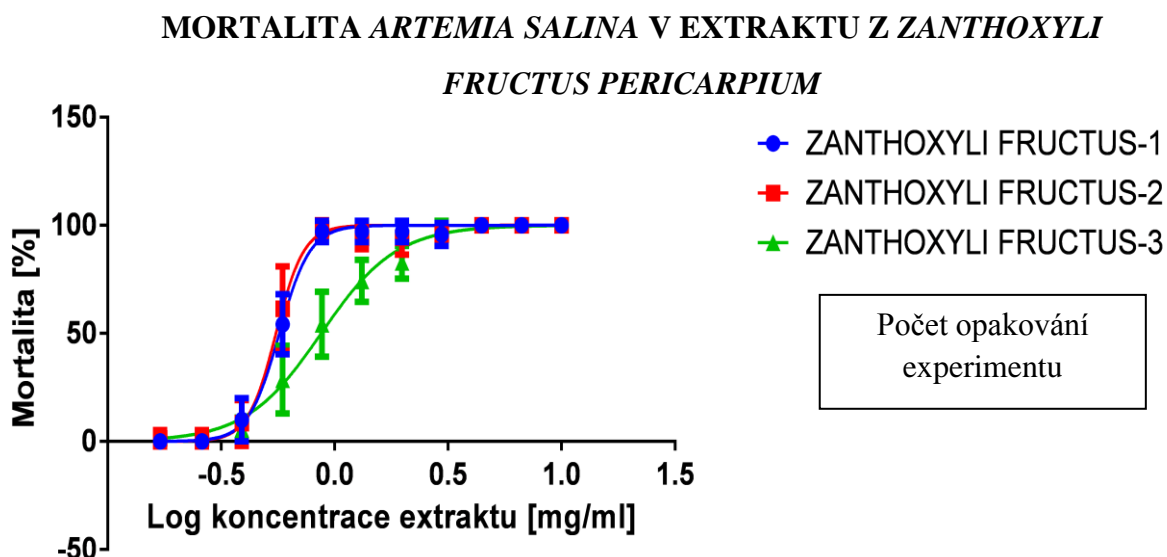
$$LC_{50} = 14,60 \pm 2,43 \text{ mg/ml}$$

### 5.3. *Zanthoxyli fructus pericarpium*

Tabulka č. 5: Procentuální inhibice *Zanthoxyli fructus pericarpium*

Koncentrace [mg/ml]	Průměr inhibice 3 měření [%]
10	100
6,67	100
4,44	100
2,96	96,19
1,98	94,29
1,32	88,67
0,88	83,33
0,59	48,19
0,39	8,10
0,26	0
0,17	0

Obrázek č. 22: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci *Zanthoxyli fructus pericarpium*



Hodnota střední letální koncentrace *Zanthoxyli fructus pericarpium*:

$$LC_{50} = 0,66 \pm 0,15 \text{ mg/ml}$$

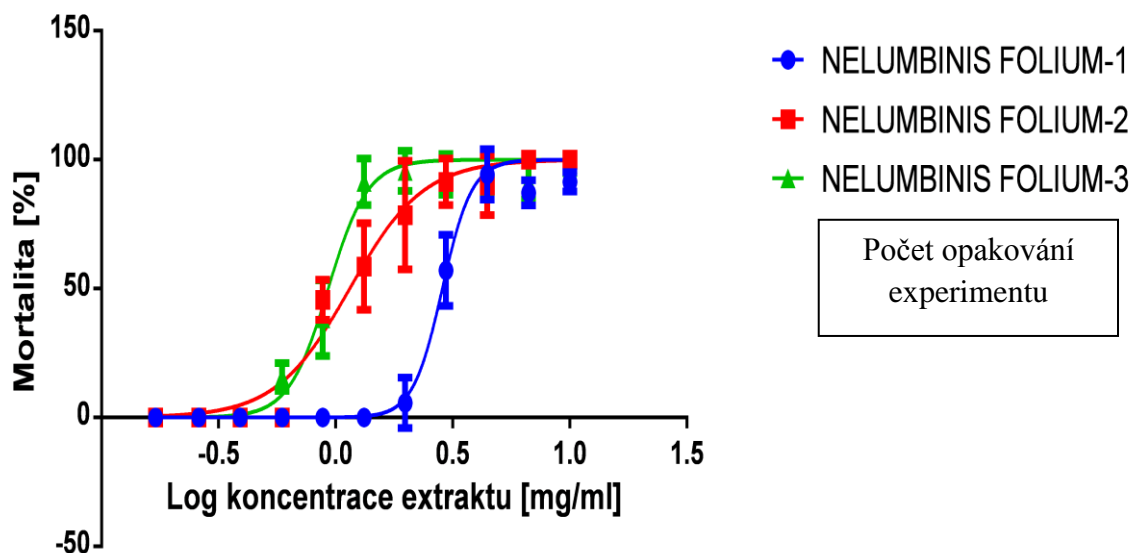
## 5.4. *Nelumbinis folium*

Tabulka č. 6: Procentuální inhibice *Nelumbinis folium*

Koncentrace [mg/ml]	Průměr inhibice 3 měření [%]
10	97,14
6,67	92,86
4,44	92,84
2,96	92,72
1,98	88,57
1,32	58,57
0,88	42,14
0,59	15,71
0,39	0
0,26	0
0,17	0

Obrázek č. 23: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci *Nelumbinis folium*

### MORTALITA ARTEMIA SALINA V EXTRAKTU Z *NELUMBINIS FOLIUM*



Hodnota střední letální koncentrace *Nelumbinis folium*:

$$LC_{50} = 1,64 \pm 0,86 \text{ mg/ml}$$

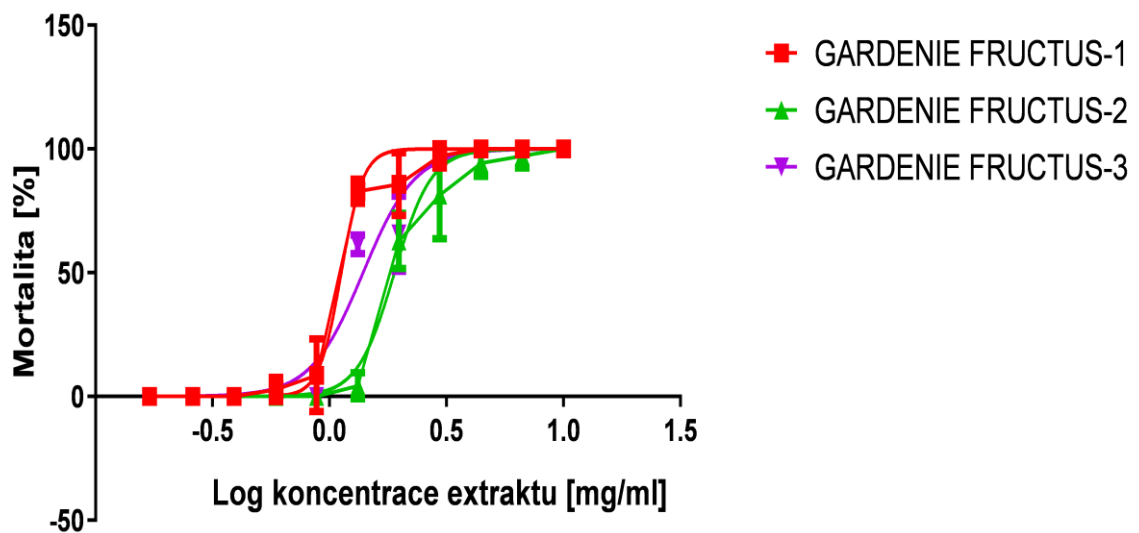
## 5.5. *Gardeniae fructus*

Tabulka č. 7: Procentuální inhibice *Gardeniae fructus*

Koncentrace [mg/ml]	Průměr inhibice 3 měření [%]
6,67	98,57
4,44	97,14
2,96	89,29
1,98	64,29
1,32	32,86
0,88	0
0,59	0
0,39	0
0,26	0
0,17	0
0,12	0

Obrázek č. 24: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci *Gardeniae fructus*

### MORTALITA ARTEMIA SALINA V EXTRAKTU Z GARDEBIAE FRUCTUS



Hodnota střední letální koncentrace *Gardeniae fructus*:

$$LC_{50} = 1,48 \pm 0,32 \text{ mg/ml}$$

## 6. DISKUSE

Čína patří k nejbohatším zemím světa na rostlinné zdroje. Z 300 000 druhů vyšších rostlin rostoucích na Zemi se asi 10% nalézá v Číně. Stejně jako v mnoha jiných zemích, tak i lidé v Číně používají rostliny k léčení nemocí již tisíce let. Rostliny dokáží syntetizovat a hromadit nepřehledné množství metabolitů, které jsou známy jako přírodní produkty. Ty jsou bohatým zdrojem pro moderní farmacii. V tradiční čínské medicíně se některé rostliny používají po staletí. Vývoj molekulární biologie a genomiky výrazně podporuje výzkum léčivých rostlin. (Yang *et al.*, 2016)

Navzdory nedostatku vědeckých důkazů o účinnosti tradiční čínské medicíny, popularita tradičních aplikací přetrvává po staletí. V této době, založené na důkazech klinické léčby, by bylo potřeba zabývat se těmito tradičními postupy. Cílem by bylo ověření vědecké účinnosti postupů. Po zjištění účinnosti praxe by následovalo další zkoumání na vyšší úrovni. (Leung *et al.*, 2016)

Například významného pokroku bylo dosaženo pomocí tradiční čínské medicíny (TČM) v léčbě syndromu získaného selhání imunity (AIDS). Cílem bylo přezkoumat nejnovější vývoj v léčbě AIDS pomocí tradiční čínské medicíny. Bylo zjištěno, že počet studií se zvýšil, což naznačuje účinnost a bezpečnost TČM. Měřítkem účinnosti byly totiž příznaky a symptomy, zlepšení kvality života, zlepšení dlouhodobého přežití a zmírnění vedlejších nežádoucích účinků antivirotik. Přesto je ale zapotřebí v budoucnu dalších výzkumů na toto téma. (Liu *et al.*, 2015)

V námi prováděném pokusu byla zjišťována střední letální koncentrace pěti rostlin tradiční čínské medicíny – *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Nelumbinis folium* a *Gardeniae fructus*. Celá práce se prováděla na organismu zvaném *Artemia salina*.

Hodnoty střední letální koncentrace LC<sub>50</sub> jednotlivých testovaných látek jsou uvedeny v tabulce.

**Tabulka č. 8:** Střední letální koncentrace jednotlivých látek

ČÁSTI ROSTLIN TČM	HODNOTA LC <sub>50</sub> [mg/ml] VODNÉHO ROZTOKU
<i>Epimedii herba</i>	5,55 ± 0,81
<i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	14,60 ± 2,43
<i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i>	0,66 ± 0,15
<i>Nelumbinis folium</i>	1,64 ± 0,86
<i>Gardeniae fructus</i>	1,48 ± 0,32

### **Epimedii herba**

Jednou z testovaných látek byla *Epimedii herba*. Čínský bylinný lék, kterému byla prokázána účinnost v léčbě kardiovaskulárních onemocnění, osteoporóze a ve zlepšení sexuální a neurologické funkce. Hlavní účinná složka icariin spolu s polysacharidy a vitamínem C byly účinné proti oxidačnímu stresu u *in vitro* testovaných hlodavců. (Sze *et al.*, 2010)

Cílem další studie bylo vyhodnotit účinky extraktu *Epimedii herba* na hladinu lipidů v krvi a na pohlavní hormony. Devadesát jedinců bylo náhodně rozděleno do dvou skupin: zkušební skupiny (užívala vodný extrakt *Epimedii herba*) a kontrolní skupiny (užívala stejné množství vody – placebo). Po 6 měsících testování byly naměřeny jednotlivé koncentrace sérového estradiolu, progesteronu, testosteronu, celkového cholesterolu a triglyceridů. Výsledky ukázaly, že extrakt *Epimedii herba* snížil hladinu triglyceridů a celkového cholesterolu. Dále výrazně zvýšil sérové hladiny estradiolu ve srovnání s úrovní před zahájením léčby. Lze tedy říci, že extrakt má příznivé účinky u žen po menopauze. (Yan *et al.*, 2008)

V další studii byla testována kombinace *Epimedii herba* a *Ligustri Lucidi fructus* k léčbě osteoporózy. Tato kombinace byla zkoumána na krysím modelu. Výsledky ukázaly, že se zvýšila hustota kosterních minerálů. To naznačuje, že kombinace extraktů může být prospěšná jako alternativní lék pro prevenci a léčbu osteoporózy. Bylo by ale vhodné uskutečnit další studie na toto téma. (RenHui *et al.*, 2015)

V další studii bylo za cíl zkoumat účinek směsi extraktu *Epimedii herba* a extraktu *Ginkgo folium* na koronární průtok izolovaných srdcí u krys. Bylo zjištěno, že směs může lépe zvýšit koronární průtok než každý extrakt zvlášť. (Zhang *et al.*, 2013)

V našem pokusu byla inhibice při nejvyšší koncentraci testované látky devadesátiprocentní. S postupně klesající koncentrací klesala i úmrtnost testovaného organismu. Od čtvrté nejvyšší koncentrace byla úmrtnost již nulová.

### **Salviae miltiorrhizae radix**

Další naší testovanou látkou byla *Salviae miltiorrhizae radix*. V jedné ze studií byla testována látka cryptotanshinon. Je to látka izolovaná z kořenů této rostliny. Rostlina byla široce používána v tradiční čínské medicíně pro léčbu různých onemocnění (např. ischemická choroba srdeční, hyperlipidemie, chronické selhání ledvin, Alzheimerova choroba), avšak nevykazovala žádné závažné nežádoucí účinky (po 48 - hodinách se v moči objevilo pouze 0,34% dávky cryptotanshinonu v nezměněné podobě, což naznačuje, že se v těle metabolizuje). Studie ukázaly, že cryptotanshinon má předpoklady pro léčení a prevenci zmíněných onemocnění, ale je těž účinný proti rakovině. (Chen *et al.*, 2013)

Další studie se týkala akutní pankreatitidy. *Salviae miltiorrhizae radix* má širokou škálu klinických použití. Bylo zjištěno, že je účinná i při léčbě akutní pankreatitidy. Došlo ke zlepšení poruch mikrocirkulace, eliminace volných radikálů kyslíku a blokování přítoku vápníku. Tato rostlina tedy může snížit úmrtnost a komplikace akutní pankreatitidy. (Zhang *et al.*, 2006)

V následující studii byly zkoumány farmakologické účinky *Salviae miltiorrhizae radix* v souvislosti s cévní mozkovou příhodou a možnými interakcemi mezi rostlinou a západními léky. Bylo zjištěno, že *Salviae miltiorrhizae radix* má antihypertenzní a antiagregační účinky, které brání cévní mozkové příhodě. Díky tomu může být použita v prevenci i léčbě. (Lin *et al.*, 2010)

*Salviae miltiorrhizae radix* byla použita nejen ke zlepšení krevního oběhu. Již dříve bylo zjištěno, že má neuroprotektivní účinky u potkanů. Účelem této studie bylo získat další informace o mechanismu neuroprotektce. Účinek na anoxické poškození v kultivovaných neuronech hipokampu narozených mláďat byl zkoumán pomocí

morfologických změn. Výsledky naznačují, že je zde přímý neuroprotektivní účinek na anoxické poškození hipokampu. (Liu *et al.*, 1998)

V našem testování byla inhibice při nejvyšší koncentraci osmdesáti procentní. Se snižující se koncentrací úmrtnost *Artemia salina* klesala až k nulové inhibici.

### **Zanthoxyli fructus pericarpium**

V pořadí třetí naší testovanou látkou byl *Zanthoxyli fructus pericarpium*. Ve studii farmakologických účinků vodného extraktu ze *Zanthoxyli pericarpium* byly zjištěny účinky, které zmírňují bolest. Dále se předpokládá, že chrání játra, pomáhá při gastrointestinálních poruchách a průjmech. (Zhang *et al.*, 1991)

Mnoho studií na tuto drogu bohužel není. V našem testu byla inhibice při nejvyšší koncentraci stoprocentní. Sto procent přetrvávalo až do třetí nejvyšší koncentrace. Následně úmrtnost začala klesat. U posledních dvou nejnižších koncentrací byla inhibice nulová.

### **Nelumbinis folium**

Následující testovanou látkou byl *Nelumbinis folium*. *Nelumbinis Folium* se používá k léčbě průjmu, bolesti hlavy a závratí. V této studii se testovaly protizánětlivé účinky metanolového extraktu *Nelumbinis folium* u myši. Metanolový extrakt potlačil hladiny oxidu dusnatého redukcí NO syntázy. Výsledky naznačují, že *Nelumbinis folium* má protizánětlivé účinky a má předpoklady pro terapeutické použití. (Lee *et al.*, 2012)

Bohužel ani u této drogy nebylo provedeno mnoho studií jejich účinků. V našem testu došlo v nejvyšší koncentraci skoro k 100% úmrtnosti. S klesající koncentrací inhibice klesala až na nulovou hodnotu u nejnižších koncentrací.

### **Gardeniae fructus**

Poslední testovanou látkou byla *Gardeniae fructus*. Četné studie potvrdily, že má mnoho účinků. Z výzkumu extraktu na několika modelech potkanů bylo zjištěno, že výrazně inhibuje shlukování krevních destiček. Důležité je ještě podrobněji prozkoumat otázky hepatotoxicity z důvodu dlouhodobé léčby. (Liu *et al.*, 2013)

V další studii se jednalo o protinádorový účinek. Dříve bylo zjištěno, že geniposid (hlavní složka *Gardeniae fructus*) vykazuje protinádorový účinek. V této studii byl zkoumán protinádorový účinek derivátu z *Gardeniae fructus* a to pentaacetyl geniposid (Ac) 5GP. Studie byla prováděna na potkanech. Bylo zjištěno, že (Ac) 5GP byl silnější než geniposid. (Ac) 5GP snížil poškození DNA a též bylo prokázáno, že inhibuje syntézu DNA nádorových buněk. Důkazy z pokusů *in vivo* ukázaly, že (Ac) 5GP není škodlivý pro játra, srdce ani ledviny. (Peng *et al.*, 2005)

Geniposid je jednou z hlavních složek *Gardeniae fructus* s různými biologickými aktivitami. Cílem této studie bylo zjistit účinky geniposidu na poranění vazů na modelu krysy. Obsah kolagenu byl zvýšen až na 131,4% a 124,2% kontrolní hodnoty díky extraktu *Gardeniae fructus* a geniposidu v daném pořadí. Naproti tomu růst buněk a obsah kolagenu byl snížen přidáním diklofenaku. Výsledky tedy ukazují, že extrakt a geniposid dokáže zlepšit léčbu poškozeného vazu a podporuje syntézu kolagenu. Avšak použití diklofenaku k léčbě akutních poranění vazů je třeba prozkoumat, přestože má potenciální účinek na zmírnění příznaků. (Chen *et al.*, 2010)

V našem testu došlo při nejvyšší koncentraci téměř ke stoprocentní inhibici. S klesající koncentrací od poloviny ředící řady se snižovala i úmrtnost testovaného organismu až k nulové hodnotě.

## 7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit účinky vodných extraktů následujících bylin - *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Nelumbinis folium* a *Gardeniae fructus* na modelovém organismu *Artemia salina*.

Jednotlivé drogy byly převedeny na vodné extrakty a z nich byly vytvořeny ředící řady od nejvyšších koncentrací po nejnižší. Nejvyšší připravená koncentrace byla 25 mg/ml, naopak nejnižší měla hodnotu 0,12 mg/ml. Následovalo převedení extraktů do mikrotitračních destiček od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Poté byl přidán modelový organismus *Artemia salina*.

Po 24 hodinách došlo k vyhodnocení testu a vypočítání střední letální koncentrace LC<sub>50</sub> a procentuální inhibice *Artemia salina* u zkoušených látek.

### Výsledky:

<i>Epimedii herba</i>	5,55 ± 0,81 mg/ml
<i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	14,60 ± 2,43 mg/ml
<i>Zanthoxyli fructus pericarpium</i>	0,66 ± 0,15 mg/ml
<i>Nelumbinis folium</i>	1,64 ± 0,86 mg/ml
<i>Gardeniae fructus</i>	1,48 ± 0,32 mg/ml

Z těchto hodnot vyplývá, že nejvíce toxický pro *Artemia salina* byl vodný extrakt připraven z *Zanthoxyli fructus pericarpium*, nejméně toxicky působil extrakt z *Salviae miltiorrhizae radix*. Seřazení od nejvyšší toxicity je *Zanthoxyli fructus pericarpium* > *Gardeniae fructus* > *Nelumbinis folium* > *Epimedii herba* > *Salviae miltiorrhizae radix*.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

- Dumitrascu M., *Artemia salina*, *Balneo-Research Journal*, **2**, 2011, p. 119-122.
- Freeman J. A., The integument of *Artemia* during early development, *Biochemistry and Cell biology of Artemia*, CRC Press, USA, 1989, p. 233-256.
- Ghiasuddin, Rehman T. U., Arfan M. *et al.*, Antimicrobial, insecticidal and phytotoxic activities of *Indigofera heterantha* roots, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 2011, p. 5835-5839.
- Chen J., Zhao H., Ma X. *et al.*, The Effects of Jiang-Zhi-Ning and Its Main Components on Cholesterol Metabolism, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2012, p. 1 -10.
- Chen Q. C., Zhang W. Y., Youn U., Iridoid glycosides from *Gardeniae fructus* for treatment of ankle sprain, *Phytochemistry*, **70**, 2009, p. 779- 784.
- Chen Q. C., Zhang W. Y., Kim H. *et al.*, Effects of *Gardeniae Fructus* extract and geniposide on promoting ligament cell proliferation and collagen synthesis, *Phytotherapy Research*, **24**, 2010, p. 1 – 5.
- Chen W., Lu Y., Chen G. *et al.*, Molecular evidence of cryptotanshinone for treatment and prevention of human cancer, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **13**, 2013, p. 979 - 987.
- Hoffmann P., Na frekvenci čínské medicíny, Euromedia Group, Praha, 2002, p. 13- 28.
- Jelínek J., Zicháček V., *Biologie pro gymnázia*, 4. rozšířené vydání, Olomouc, 2000, p. 113-123.
- Ji X., Tan B., Zhu Y., *Salvia miltiorrhiza* and ischemic diseases, *Acta Pharmacologica Sinica*, **21**, 2000, p. 1089-1094.
- Kantorek J., Řehoř F., Sobotkova V.(překlad), *Tajemství přírody*, BLESK, Ostrava, 1993, p. 123.

Lavens P., Sorgeloos P., Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper No. 361, Rome, 1996, p. 79-101.

Lee E. J., Hong J. K., Whang W. K., Simultaneous determination of bioactive marker compounds from *Gardeniae fructus* by high performance liquid chromatography, *Archives of Pharmacal Research*, **37**, 2013, p. 992 – 1000.

Lee S. E., Lee M. H., Choi H. Y. *et al.*, *Nelumbinis Folium* methanol extract regulates inducible nitric oxide synthase signaling pathways in mouse peritoneal macrophages, *The Korea Journal of Herbology*, **27**, 2012, p. 65 – 71.

Leung P., Ko E. C., Siu W. *et al.*, Selected Topical Agents Used in Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Minor Injuries- A Review, *Frontiers in Pharmacology*, **7**, 2016, p. 2 – 5.

Li Q. G., Duke C. C., The quality and safety of traditional traditional Chinese medicines, *Australian Prescriber*, **26**, 2003, p. 128 – 130.

Li Wu, *Kniha čínského umění léčby*, překlad Hubáček M., nakladatelství Anag, 2013, p. 10 - 30.

Li X., Yang G., Li X., Traditional Chinese Medicine in Cancer Care: A Review of Controlled Clinical Studies Published in Chinese, *Public Library of Science*, **4**, 2013, p. 8 - 10.

Lin T. H., Hsieh Ch. L., Pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) on cerebral infarction, *Chinese Medicine*, **5**, 2010, p. 1-6.

Liu H., Chen Y. F., Li F. *et al.*, *Fructus Gardenia* (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development, *Journal of Asian Natural Products Research*, **15**, 2013, p. 94 – 110.

Liu Z. B., Yang J. P., Xu L. R., Effectiveness and safety of traditional Chinese medicine in treating acquired immune deficiency syndrome: 2004–2014, *Infectious Diseases of Poverty*, **4**, 2015, p. 59.

- Liu J., Kuang P., Wu W. *et al.*, *Radix Salviae miltiorrhizae* protects rat hippocampal neuron in culture from anoxic damage, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, **18**, 1998, p. 49-54.
- Mayorga P., Pérez K. R., Cruz S. M. *et al.*, Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**, 2010, p. 897-903.
- McGavin G. C., *Spiders and other terrestrial arthropods*, Dorling Kindersley, London, 2000, p. 10 – 29.
- Míčová M., Mostýn V., Škoda V. *et al.*, Encyklopedie zvířat od A do Z, BLESK, Ostrava, 1993, p. 533.
- Navrátilová Z., Patočka J., Bioaktivní látky šalvěže červenokořenné (*Salvia miltiorrhiza Bunge*) a jejich využití v medicíně, *Prevence úrazů, otrav a násilí*, **9**, 2013, p. 181-189.
- Ni H. Y., Zhang Z. H., Fu H. Z., Research and development of fructus gardeniae, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **31**, 2006, p. 538 - 541.
- Parra A. L., Yhebra R. S., Sardiñas G. *et al.*, Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, *Phytomedicine*. **8**, 2001, p. 395-400.
- Peng C. H., Huang C. N., Wang C. J., The anti-tumor effect and mechanisms of action of penta-acetyl geniposide, *Curr Cancer Drug Targets*, **5**, 2005, p. 299 – 305.
- Raja T., Zelenka J., Kraft P. *et al.*, Velká ilustrovaná všeobecná encyklopedie, 2. vydání, Ikar, Praha, 2000, p. 84-88.
- RenHui L., Xue K., LiPing X. *et al.*, Effect of the combined extracts of *Herba Epimedii* and *Fructus Ligustri Lucidi* on sex hormone functional levels in osteoporosis rats, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, 2015, p. 13.
- Ruppert E., Fox R., Barnes R., *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*, 7th ed., Belmont CA: Brooks/Cole, 2004, p. 963.
- Shen-Miller J., Schopf J. W., Harbottle G. *et al.*, Long-living lotus: Germination and soil-irradiation of centuries-old fruits, and cultivation, growth, and phenotypic abnormalities of offspring, *American Journal of Botany*, **89**, 2002, p. 236 – 247.

Sze S. C. W., Tong Y., Cheng, C. L. Y. *et al.*, *Herba Epimedii*: Anti-Oxidative Properties and Its Medical Implications, *Molecules*, **15**, 2010, p. 7861-7870.

Tsai-Hui L., Ching-Liang H., Pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) on cerebral infarction, *Chinese Medicine*, **5**, 2010, p. 1-6.

Xie X., Pei F., Wang H. *et al.*, Icariin: A promising osteoinductive compound for repairing bone defect and osteonecrosis, *Journal of Biomaterials Applications*, **30**, 2015, p. 290 – 299.

Yan F. F., Liu Y., Zhao Y. X., *Herba Epimedii* water extract elevates estrogen level and improves lipid metabolism in postmenopausal women, *Phytotherapy Research*, **22**, 2008, p. 1224–1228.

Yang L., Yang C., Li C. *et al.*, Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants, *Science Bulletin*, **61**, 2016, p. 3-17.

Zhang D., Yuan C., Zhu Z. *et al.*, Influence of the mixture of *Epimedii Herba* and *Ginkgo Folium* extracts on the coronary flow of isolated hearts in rats, *Pharmacognosy Magazine*, **9**, 2013, p. 290 – 293.

Zhang M., Shen Y., Zhu Z. *et al.*, Pharmacological studies on warming the middle-jiao to alleviate pain by *Pericarpium Zanthoxyli*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **16**, 1991, p. 493-497.

Zhang X. P., Li Z. J., Liu D. R., Progress in research into the mechanism of *Radix salviae miltiorrhizae* in treatment of acute pancreatitis, *Hepatobiliary Pancreat Diseases International*, **5**, 2006, p. 501-504.

Zhou L., Zuo Z., Chow MSS: Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use, *The Journal of Clinical Pharmacology*, **45**, 2005, p. 1345-1359.

양 윤희, 권 재원, 이 장천, 이 부균, Study on a Herb pair of *Pericarpium Zanthoxyli* (*Zanthoxyli Fructus*) in Donguibogam, *Herbal Formula Science*, **22**, 2014, p. 1-11.

[http://www.herbal-store.cz/skornice-sipolista-drcene-listy\\_z5597/](http://www.herbal-store.cz/skornice-sipolista-drcene-listy_z5597/) staženo 2.2.2016

<http://www.shen-nong.com/eng/herbal/xianlingpi.html> staženo 2.2.2016

<http://www.zivebylinky.cz/cz-detail-9009518182538-secuansky-pepr-zanthoxylum-piperitum.html> staženo 4.2.2016

<http://www.dia-potraviny.cz/pepr-secuansky.html> staženo 4.2.2016

<http://eol.org/pages/596454/details> staženo 11.2.2016

<http://www.chineseherbshealing.com/lotus-leaves/> staženo 11.2.2016

<http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=618> staženo 16.2.2016

<http://www.wudang.cz/cinska-cviceni/5-prvku.php> staženo 18.2.2016

<http://www.artemiaworld.com/home/index.php?lng=cz> staženo 11.3.2016

<http://www.webmd.com/balance/guide/chinese-medicine-topic-overview> staženo  
18.4.2016

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Mgr. Radka Kvapilová

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název rigorózní práce:

### HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY POMOCÍ *ARTEMIA SALINA*

Tradiční čínská medicína vznikla ve staré Číně a vyvinula se v průběhu tisíce let. TCM používá bylinné léky a tělové postupy. V dnešní době se čínská medicína i nadále vyvíjí a využívají ji miliony lidí po celém světě. Cílem této práce bylo zhodnotit toxicitu následujících rostlin - *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Nelumbinis folium* a *Gardeniae fructus*. Pokus byl prováděn na organismu *Artemia salina*. Testy byly vyhodnocovány po 24 hodinách a z výsledků byla vypočtena hodnota LC<sub>50</sub>. Toxicita klesala v pořadí *Zanthoxyli fructus pericarpium* > *Gardeniae fructus* > *Nelumbinis folium* > *Epimedii herba* > *Salviae miltiorrhizae radix*.

Klíčová slova: *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Gardeniae fructus*, *Nelumbinis folium*, *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Artemia salina*.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Mgr. Radka Kvapilová

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of rigorous thesis:

### EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY USING *ARTEMIA SALINA*

Traditional Chinese medicine originated in ancient China and has evolved over thousands of years. TCM therapist use herbal medicines and body practices. Nowadays, Chinese medicine continues to develop and is used by millions of people around the world. The aim of this study was to evaluate the toxicity of these products - *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Nelumbinis folium* a *Gardeniae fructus*. The experiment was conducted on organism *Artemia salina*. These experiments were evaluated after the 24 hours and the LC<sub>50</sub> values were calculated. Toxicity declined in order: *Zanthoxyli fructus pericarpium* > *Gardeniae fructus* > *Nelumbinis folium* > *Epimedii herba* > *Salviae miltiorrhizae radix*.

Key words: *Zanthoxyli fructus pericarpium*, *Gardeniae fructus*, *Nelumbinis folium*, *Epimedii herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Artemia salina*.