

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

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Mikroskopie listů různých druhů rodu *Bergenia*.**

**Vypracovala: Kateřina Rulfová**

**Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.**

**Oponent diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2015**

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za její vedení, odbornou pomoc a trpělivost.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Heleně Hendrychové za pomoc při práci se zdroji.

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

V Hradci Králové, 2015

Kateřina Rulfová

## Abstrakt

Rostliny rodu *Bergenia* jsou součástí léčebných prostředků užívaných v ajurvédské medicíně. Důležitou roli hrají i v tradiční lidové medicíně na území Číny, Indie, Mongolska a Ruska.

Teoretická část této práce shrnuje nejnovější poznatky a výsledky výzkumů týkajících se tří zástupců rodu *Bergenia*: *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch a *Bergenia ornata* Stein. V tomto souhrnu se práce zaměřuje převážně na jejich stávající a potenciální využití v medicíně a farmacii. Extrakt z bergenie je tradičně využíván například k rozpouštění ledvinných kaménků, k léčbě onemocnění respiračního traktu a k zastavení krvácení.

Uvedeny jsou i nejdůležitější obsahové látky přítomné v těchto rostlinách, jejich charakteristika a účinky. Bergenie jsou významným zdrojem arbutinu a bergeninu. Bergenin má antitusické, gastroprotektivní a protizánětlivé účinky. Arbutin je využíván při léčbě onemocnění močových cest a v kosmetologii k zesvětlování pleti.

Experimentální část práce zahrnuje metodiku přípravy trvalých mikroskopických preparátů z listů vybraných zástupců rodu *Bergenia*. Z trvalých i nativních preparátů byla zhotovena obrazová dokumentace. Byla popsána příčná stavba listu a stavba pokožky listu, včetně stomatálního indexu. Zdokumentována je také přítomnost krystalů šťavelanu vápenatého v podobě drúz. Základní anatomické znaky listu byly vyhodnoceny s důrazem na možnost nalezení znaků jednoznačně identifikujících daný druh.

## Abstract

Plants of the genus *Bergenia* are part of remedies used in Ayurveda medicine. They also play an important part in traditional healing practice in China, India, Mongolia and Russia.

Theoretical part of this thesis sums the newest findings and research results concerning three *Bergenia* species: *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch a *Bergenia ornata* Stein. The thesis mainly focuses on their current and potential use in medicine and pharmacy. *Bergenia* extract is traditionally used for dissolving kidney stones, treating respiratory tract illnesses and to stop bleeding.

The most important active substances of these plants, their characteristics and main effects are also noted. *Bergenia* is an important source of arbutin and bergenin. Bergenin has antitussive, antiflogistic and gastroprotective effects. Arbutin is used to treat urinary tract diseases and in cosmetology to lighten the skin.

The experimental part of this thesis includes methods of preparation of permanent microscope slides from leaves of chosen *Bergenia* species. Photographs have been taken from both permanent and native slides. Anatomy of the leaf and leaf epidermis is described including stomatal index. Presence of calcium oxalate crystals in form of druses is also documented. Basic anatomical features were described and evaluated, with the possibility of finding identifying characteristics in mind.

# Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce .....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	<i>Bergenia ciliata</i> .....	11
3.2	<i>Bergenia crassifolia</i> .....	12
3.3	<i>Bergenia ornata</i> .....	14
3.4	Obsahové látky .....	14
3.4.1	Afzelechin.....	15
3.4.2	Arbutin .....	16
3.4.3	Bergenan.....	18
3.4.4	Bergenin .....	18
3.4.5	Kyselina ellagová.....	20
3.4.6	Kyselina gallová.....	21
3.4.7	Paashaanolakton.....	22
4	Experimentální část .....	23
4.1	Materiál, chemikálie, pomůcky .....	23
4.1.1	Materiál.....	23
4.1.2	Chemikálie.....	23
4.1.3	Pomůcky.....	23
4.1.4	Přístroje.....	24
4.2	Postup přípravy preparátů .....	24
4.2.1	Nativní preparát.....	24
4.2.2	Trvalý preparát.....	24
4.3	Vyhodnocení preparátů .....	28
5	Výsledky.....	29
5.1	<i>Bergenia ciliata</i> .....	29
5.1.1	Trvalé preparáty <i>Bergenia ciliata</i> .....	29
5.1.2	Nativní preparáty <i>Bergenia ciliata</i> .....	31
5.1.3	Hodnocení.....	34

5.2	<i>Bergenia crassifolia</i> .....	37
5.2.1	Trvalé preparáty <i>Bergenia crassifolia</i> .....	37
5.2.2	Nativní preparáty <i>Bergenia crassifolia</i> .....	38
5.2.3	Hodnocení.....	41
5.3	<i>Bergenia ornata</i> .....	44
5.3.1	Trvalé preparáty <i>Bergenia ornata</i> .....	44
5.3.2	Nativní preparáty <i>Bergenia ornata</i> .....	46
5.3.3	Hodnocení.....	48
6	Diskuze.....	52
6.1	Celková stavba listu.....	53
6.2	Pokožka .....	53
6.3	Průduchy .....	54
6.4	Drúzy šťavelanu vápenatého.....	54
6.5	Srovnání.....	54
7	Závěr .....	55
8	Citovaná literatura.....	56
9	Seznam obrázků.....	60
10	Seznam tabulek.....	61

# 1 Úvod

Rostliny rodu *Bergenia*, bergenie, (Saxifragaceae) se přirozeně vyskytují v jižní, východní a centrální Asii. Patří mezi rostliny používané v ajurvédské medicíně a významnou úlohu zastávají i v tradičním lidovém léčení na území Číny, Mongolska a Ruska. Léčivé přípravky připravené z celé rostliny, jejího oddenku nebo listu se používají k léčbě nejrůznějších onemocnění. Nejčastěji bývají aplikovány při léčbě infekčních i neinfekčních nemocí dýchací soustavy a pro rozpouštění ledvinných a močových kaménků. (1; 2)

Bergenie nachází uplatnění také v kosmetologii. Zde je využívána jako prostředek zesvětlující pleť. (1)

Široké možnosti využití bergenie vedou hlavně v posledních letech k podrobnějšímu vědeckému zkoumání. Výzkum se nezaměřuje pouze na zjištění účinků rostlinné drogy a jejich jednotlivých obsahových látek, ale i na popis anatomie či ochranu před vyhynutím. (3; 4)

Jednotlivé druhy bergenií se mohou výrazně lišit obsahem účinných látek. (5) Pro studium rostlinného materiálu je tedy třeba ověřit totožnost rostlinné drogy. Kromě makroskopického vzhledu je další možností kontroly mikroskopické hodnocení.



## 2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zvládnout techniku přípravy trvalých mikroskopických preparátů z listů a následné zhotovení trvalých i nativních preparátů z listů rostlin čeledi Saxifragaceae: *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch a *Bergenia ornata* Stein. Hlavním cílem bylo vyhodnocení anatomických znaků, vyhodnocení identifikačních znaků a zhotovení obrazové dokumentace těchto preparátů.

### 3 Teoretická část

Rod *Bergenia* (bergenie) je pojmenován na památku německého lékaře a botanika Karla Augusta z Bergenu. (2; 6)

Rod patří do čeledi Saxifragaceae. Zhang ve své práci uvádí, že podle ipni.org (International plant name index - Mezinárodní index rostlinných jmen) zahrnuje rod *Bergenia* 32 druhů. (1; 7)

Bergenie roste volně převážně v jižní, východní a centrální Asii. Nachází se především v chladném podnebí ve vyšších nadmořských výškách (až do 4800 m. nad mořem). Dobře snáší nepříznivé podmínky v podobě nízkých teplot, nedostatku slunečního světla a suchého kamenitého podkladu. (1; 8)

Bergenie jsou stálezelené vytrvalé rostliny vysoké 10 – 80 cm. Listy vyrůstající z přízemní růžice jsou řapíkaté, oválné, lesklé, až 25 cm dlouhé. Internodia jsou krátká. Po stranách jsou listy zubaté, vroubkované či zvlněné. V zimě listy červenají, hnědnou, až černají. Lodyha nesoucí květy je bezlistá, přímá. Pětčetné květy v květenství jsou drobné, s oválnými korunními plátky 10 – 12 mm velkými. Barva květu se různí, od bílé, přes světle růžovou, po tmavě růžovou a nafialovělou. Kvete na jaře. Rostlina se rozrůstá pomocí podzemních oddenků. (1; 6; 9)

Bergenie je již po staletí součástí ajurvédských léčebných prostředků používaných na území Bhútánu, Indie, Nepálu, Pákistánu a dalších. Bergenie zde slouží k léčbě plicních onemocnění, k rozpouštění ledvinných a močových kaménků, k léčbě hemoroidů a vaginálního výtoku. Tradiční čínská medicína využívá bergenie k zastavení krvácení a hemoptýzy, k tišení kašle a zmírnění astmatického záchvatu. V Mongolsku jsou kořeny a oddenky bergenie oficiální drogou. Lidově jsou využívány ke snížení horečky, ke zmírnění žaludečních a střevních obtíží, k léčbě průjmu a zánětů plic. V Rusku se bergenie používá v lidovém léčitelství k ošetření zánětlivých procesů v ústní dutině, k léčbě nachlazení, horečky a bolesti hlavy, k léčbě průjmu a žaludečních potíží. (1; 2; 10)

Divoce rostoucí bergenie se v posledních letech staly vzácnými až ohroženými. Podíl na tom nesou nejen rozsáhlé ničivé zásahy do životního prostředí, ale i jejich nadměrný sběr. (1; 4)

V České Republice jsou bergenie pěstovány jako okrasné rostliny a nejsou obsaženy v léčivých přípravcích. (6; 9)

### **3.1 *Bergenia ciliata***

*B. ciliata* roste převážně ve středním Himálaji. Lidově se nazývá zimní bergenie, v jazyce hindí „Pakhanbhed“, což znamená „rozpustit kámen“. Tento název vychází patrně z léčebného využití k rozpouštění ledvinných a močových kaménků. Jméno „Pakhanbhed“ může označovat i *B. ligulata*. (10; 11; 12)

*B. ciliata* obsahuje značné množství bergeninu. Z oddenku v suchém stavu bylo extrahováno 5,68 - 5,73 % bergeninu. (12; 13)

V lidovém léčitelství je používán čerstvý nebo sušený oddenek. Jeho žvýkání se doporučuje pro zastavení průjmu nebo zvracení. V západní Indii se šťáva z oddenku používá k tišení kašle. Antitusické působení bylo u extraktu z oddenku testováno na myších. Methanolvý extrakt prokázal ve vyšších koncentracích antitusickou aktivitu téměř srovnatelnou s kodeinem. (11)

Oddenek je dále používán pro léčbu horečky a plicních neduhů. Studie prokazující antibakteriální a antivirové vlastnosti *B. ciliata* opodstatňují lidové užití této rostliny v léčbě onemocnění dýchacího systému. Antibakteriální aktivita methanolového extraktu z oddenku byla testována pomocí difuzní diskové metody. Extrakt vykazoval širokou antibakteriální aktivitu, zejména proti *Staphylococcus aureus*. V inhibici růstu *Staphylococcus aureus* byl účinek 1000 µg extraktu z bergenie na disk srovnatelný s účinkem 10 µg chloramfenikolu na disk. Extrakt projevil inhibiční účinek na množení chřipkového viru A. Zároveň byl prokázán účinek na inhibici růstu viru Herpes simplex 1. (14; 15)

V Pákistánu je *B. ciliata* vyhledávána jako prostředek podporující hojení ran. Užívána je k aplikaci do oka při zánětech, v gynekologii k zastavení nadměrného krvácení, k léčbě vředů a jako anthelmintikum. V těchto indikacích je využíváno především antiseptických a adstringentních účinkům extraktu z oddenku, podpořených antibakteriálním působením. (15; 16)

V Nepálu je *B. ciliata* používána k léčbě diabetu. Výzkumem *in vitro* byl prokázán značný účinek methanolového extraktu na inhibici enzymů štěpících sacharidy

( $\alpha$ -glukosidáza a  $\alpha$ -amyláza). V oblastech s nedostatečnou lékařskou péčí se může často jednat o jediný způsob léčby diabetu. (17)

*B. ciliata* vykazuje také antioxidační aktivitu, která spočívá především v redukčních vlastnostech, inhibici lipidové peroxidace, ochraně DNA před oxidativním poškozením a vychytávání volných radikálů. Tyto účinky byly *in vitro* prokázány u vodného i methanolového extraktu z oddenku. Za hlavní nositele antioxidačního působení jsou v rostlinách považovány fenolické sloučeniny, i zde byla pozorována korelace mezi mírou antioxidačního působení a množstvím fenolických látek v extraktu. (10)

### **3.2 *Bergenia crassifolia***

Obrázek 1: *Bergenia crassifolia* (18)



*B. crassifolia* se lidově nazývá badan, kožená bergenie, „sibiřský čaj“ nebo „sloní ucho“. Synonymní název je *Saxifraga crassifolia* L. (2; 19)

Volně rostoucí se vyskytuje především ve střední Asii a na Sibiři. V některých oblastech tvoří souvislé porosty o rozloze stovek hektarů. (2; 9)

*B. crassifolia* je důležitá součást ruské a mongolské medicíny, jako jediná z rodu *Bergenia* byla uvedena v lékopise SSSR (1990). Jako oficiální droga je uvedena rhizomata *Bergeniae* s adstringentním, hemostatickým a protizánětlivým účinkem. (2)

Z rostliny jsou nejčastěji využívány listy a oddenky. Listy *B. crassifolia* obsahují přibližně dvojnásobné množství tříslovin než oddenky. Oddenky mohou být až 1 m dlouhé a 3,5 cm široké. (2)

Zelené listy *B. crassifolia* příchodem zimy zhnědnou, po druhé zimě zčernají. Množství obsahových látek se značně liší v závislosti na typu listu. Obsah tříslovin s časem klesá. Zelené listy mohou obsahovat až 22% arbutinu, jeho množství v hnědých listech klesá a černé listy už neobsahují téměř žádný arbutin. Pokles arbutinu ve starších listech je způsoben pravděpodobně jeho metabolizací na polyfenoly. (19) V hnědých listech se zvyšuje podíl kyseliny gallové a ellagové, ve zčernalých je koncentrace kyseliny gallové nejvyšší. (2; 20)

V silici získané destilací bylo v *B. crassifolia* identifikováno 58 složek. Celkové množství silice bylo 0,05 % a nejvíce byl zastoupen 3-methyl-2-buten-1-ol, hexadekanová kyselina, dodekanová kyselina a linalool. Přítomnost 3-methyl-2-buten-1-olu pravděpodobně způsobuje sýrové aroma rostliny. (8)

Oblíbený nápoj Burjatů a Mongolů je čaj připravený z listů *B. crassifolia*. K přípravě čaje jsou vybírány především zčernalé listy s menším množstvím tříslovin. (2)

Odvar z oddenku je v Rusku používán k léčbě horečky a zažívacích potíží. Žvýkání oddenku je doporučováno při zánětu dásní a onemocnění periodontu. (2)

V Tibetu je pasta z rozmačkaných listů nanášena na kůži jako ochrana před slunečním zářením. (2)

Shikov (21) dokázal, že po podání extraktu z *B. crassifolia* laboratorním krysám došlo ke zlepšení snášenlivosti chladu a krysy zlepšily svoji výkonnost v testech plavání a běhání. Tím byla podpořena teorie o nesespecifickém adaptogenním účinku tohoto extraktu. Extrakt navíc u krys zlepšil získávání energie z tukových zásob a oddálil hromadění laktátu v plazmě. (2; 21)

Pozorovaný účinek zlepšující zisk energie z tukových buněk vedl k pokusům ověřujícím možnost využití extraktu jako prostředku podporujícího hubnutí. Při pokusech na krysách bylo zjištěno, že při příjmu extraktu z fermentovaných listů došlo po týdnu ke snížení chuti k jídlu a značnému snížení příjmu potravy. Přestože u pokusných zvířat nedošlo ke změně hladiny cholesterolu, došlo k podstatnému snížení hladiny sérových triglyceridů a zlepšení glukózové tolerance. (20)

Ethanolový extrakt z listů i z oddenků navíc ke svým adaptogenním vlastnostem prokázal i protinádorový účinek. (2)

### **3.3 *Bergenia ornata***

*B. ornata* je pěstována jako zahradní rostlina a není na ní zaměřen hlavní vědecký zájem. (5)

Studie Hendrychové (5) nicméně poukazuje na vysoký obsah arbutinu v zelených listech *B. ornata* (35.8 - 51.0 mg/g). Obsah arbutinu byl nejvyšší ze tří porovnávaných druhů (*B. ciliata*, *B. crassifolia* a *B. ornata*). Tato studie také přinesla informace o poměrně vysokém obsahu tříslovin celkově (28,6 – 36,9 mg/g) a antioxidačních účincích. (5)

### **3.4 Obsahové látky**

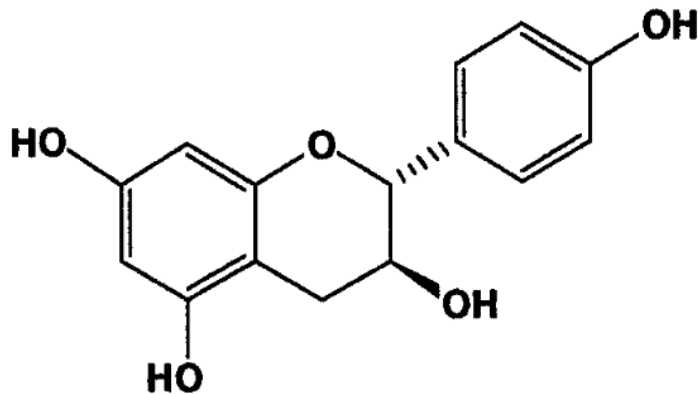
Rostliny rodu *Bergenia* obsahují množství polyfenolických látek, flavonoidů a chinonů. (1) K nejdůležitějším polyfenolům patří arbutin, afzelechin, bergenin a jeho derivát norbergenin,  $\beta$ -sitosterol-D-glukosid, katechin, kyselina ellagová, kyselina gallová, methylgallát, třísloviny a paashaanolakton, izolovaný z *B. ligulata*. Z flavonoidů jsou nejčastěji zastoupeny mono- a diglykosidy kempferolu a kvercetinu. Mezi ostatní obsahové látky patří polysacharid bergenan, aminokyseliny, silice, organické kyseliny, karotenoidy, vitamíny A a E a další. (1; 2; 5; 9; 13)

Shikov (2) uvádí, že z *B. crassifolia* bylo izolováno přes 100 různých látek.

Ke stanovení obsahu účinných látek se nejčastěji využívá HPLC a TLC. Tyto metody jsou užitečné při odlišování jednotlivých druhů nebo ke kontrole kvality rostlinné drogy. (22)

### 3.4.1 Afzelechin

Obrázek 2: Chemická struktura afzelechinu (23)



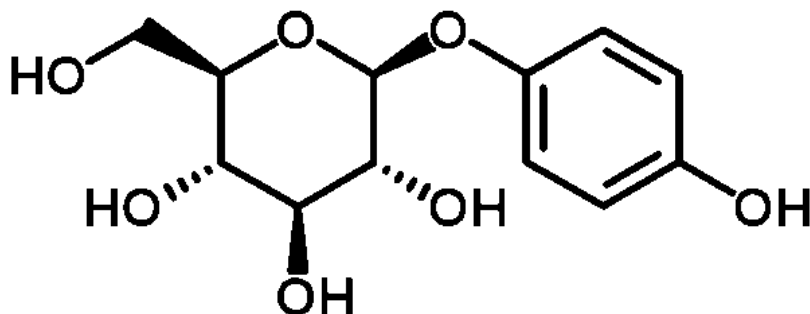
(+)-afzelechin je flavan-3-ol. Pokusy *in vitro* prokázaly účinky využitelné v léčbě diabetu. Afzelechin inhibuje enzym štěpící sacharidy  $\alpha$ -glukosidázu. Při 0,25 mM koncentraci dochází až k 57% inhibici enzymu. (24)

Afzelechin také prokázal stimulační účinek na sekreci inzulínu z  $\beta$  – buněk pankreatu u myší. Uvolňování inzulínu bylo afzelechinem zvýšeno v přítomnosti glukózy a došlo i k navýšení bazální sekrece. (25)

Afzelechin není komerčně dostupný a jeho výskyt není v rostlinách častý. Z tohoto důvodu byly podniknuty kroky k zajištění této látky pomocí rekombinantních kmenů *E. coli*. (25)

### 3.4.2 Arbutin

Obrázek 3: Chemická struktura arbutinu (26)



Arbutin je 4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid. Poprvé byl izolován z listů *Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae. Od té doby bylo izolováno 173 derivátů arbutinu ve 109 rostlinných druzích. (27)

Z *B. crassifolia* byl arbutin izolován v roce 1930. Jeho množství je v *B. crassifolia* vysoké, uvádí se až 22% obsah arbutinu v listech. Další práce dokazují i značný obsah arbutinu v oddenku (17 – 23 %). Zároveň byly v *B. crassifolia* objeveny tři estery arbutinu: 2-O-caffeoylarbutin, 6-O-galloylarbutin a p-galloyloxyphenyl  $\beta$ -D-glukosid. (2; 5)

Hladina arbutinu v rostlině během roku narůstá. Nejnižší obsah je možné pozorovat na jaře, na podzim je jeho obsah nejvyšší. Arbutin v rostlinách plní ochrannou a adaptogenní funkci. Změnami v koncentraci arbutinu rostlina patrně reaguje na nepříznivé podmínky v podobě sucha a chladu. Vysoké hladiny arbutinu by mohly vysvětlovat, proč bergenie prospívají i v nehostinných podmínkách Himálaje a Sibiře. (5; 18)

Arbutinu jsou připisovány antioxidační, antimikrobiální, antimalarické, cytotoxické, diuretické a hepatoprotektivní účinky. Byly provedeny testy prokazující protizánětlivý účinek arbutinu, který spočívá ve snížení vzniku prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . (2; 19; 27)



Antibakteriálních vlastností arbutinu se využívá pro léčbu infekčních onemocnění urogenitálního traktu, jako je například zánět močového měchýře, zánět ledvin nebo kapavka. (18)

Na pokusných zvířatech byly také testovány antitusické vlastnosti. U myší byla dávka 200 mg/kg arbutinu svou účinností srovnatelná s dávkou 30 mg/kg kodeinu, ale bez analgetického efektu. Arbutin také snižoval četnost i délku záchvatů kašle u pokusných koček a psů a zatím nebyla prokázána toxicita ani po dvoutýdenním podávání vysokých dávek (8000 mg/kg, intraperitoneálně). (2)

Důležité je využití arbutinu v dermatologii a kosmetologii. *In vivo* je z arbutinu odštěpován farmakologicky aktivní aglykon hydrochinon. Ten je považován za jeden z nejúčinnějších inhibitorů melanogeneze *in vitro* a *in vivo*. Působí inhibičně na enzym tyrosinázu. Tento enzym zahajuje tvorbu melaninu v těle oxidací aminokyseliny tyrosinu. Aktivita tyrosinázy může být po podání hydrochinonu snížena až o 90 %. (18; 28)

Tvorba melaninu v buňkách epidermis je přirozená, protože melanin hraje důležitou roli v absorpci volných radikálů vytvořených po vystavení pokožky UV záření. Nadměrná produkce melaninu však může znamenat zdravotní nebo estetický problém. Hyperpigmentace způsobená zvýšenou produkcí melaninu se může projevit v podobě pigmentových skvrn nebo jako pozánětlivá pigmentace. Způsobená může být nejen přemírou UV záření dopadajícího na pokožku, ale může se projevit i jako následek onemocnění nebo po kontaktu s některými chemikáliemi. (2; 18; 28)

Použití hydrochinonu pro bělení pleti, odstraňování pigmentových skvrn nebo léčbu nádorových onemocnění spojených s produkcí melaninu je považováno za převážně bezpečné. Nežádoucí účinky po topické aplikaci zahrnují podráždění a kontaktní dermatitidu, obojí léčitelné lokálním podáním kortikoidů. Vzácným nežádoucím účinkem je možnost vzniku exogenní ochronosis, projevující se zčernalou pigmentací v oblasti aplikace. Ochronosis se vyskytuje především u lidí tmavé pleti po dlouhodobé aplikaci vysokých koncentrací hydrochinonu. Pigmentové změny vzniklé na podkladě exogenní ochronosis nemusí být vratné, proto se aplikace přípravků s hydrochinonem nedoporučuje pro dlouhodobé užití. (28)

### 3.4.3 Bergenan

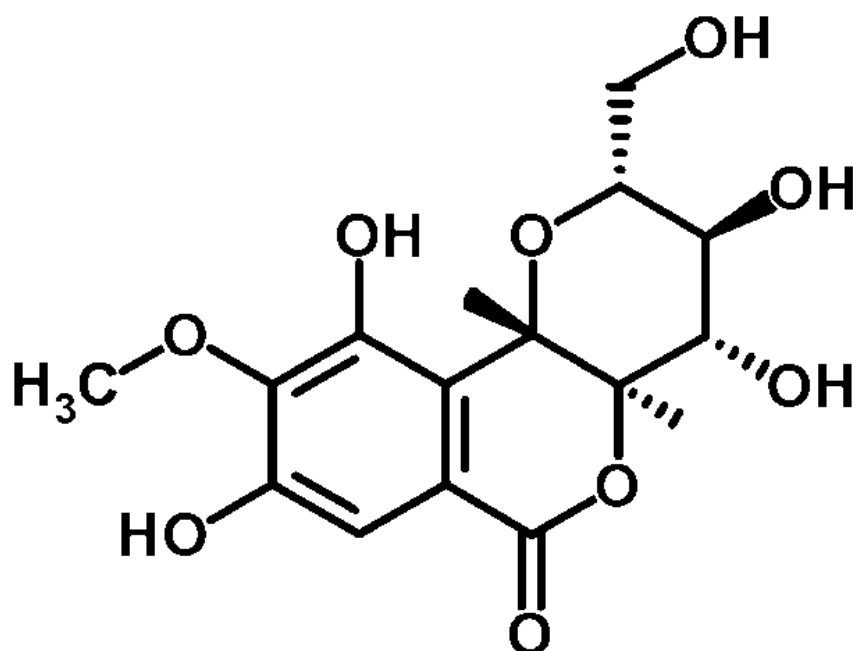
Bergenan je pektinový polysacharid získaný z *B. crassifolia*. Je složený převážně z galakturonové kyseliny (82 %). Ta tvoří lineární část polysacharidu. Dalšími složkami jsou především arabinóza, glukóza, rhamnóza a galaktóza. (29; 30)

Pektinové polysacharidy mají široké spektrum účinků. Mezi nejdůležitější patří imunomodulační účinek. Ten byl u bergenanu prokázán *in vitro* a *in vivo*. *In vitro* došlo ke zvýšení produkce kyslíkových radikálů makrofágy a k zintenzivnění fagocytózy. Předpokládá se, že fagocytóza je ovlivněna zvýšením buněčné adheze. (30)

*In vivo* byl u pokusných myší zaznamenán stimulační efekt na T – lymfocyty po perorálním podání bergenanu. Po týdenním perorálním podávání bergenanu (ve vodě, *ad libitum*) nebyly zaznamenány žádné projevy toxicity. Bergenan neprojevil toxické účinky ani u buněk *in vitro*. (19; 30)

### 3.4.4 Bergenin

Obrázek 4: Chemická struktura bergeninu (31)



Bergenin je také známý pod názvy kyselina ardisová B, bergenit a bergenitol. Poprvé byl extrahován z oddenku *Bergenia siberica* v roce 1881. Hlavními zdroji bergeninu jsou

*Ardisia creanata*, *Bergenia crassifolia*, *Bergenia purpurascens*, *Bergenia stracheyi*, *Peltophorum africanum* a *Rodgersia sambucifolia*. (32)

Jedná se o C-glukosid 4-O-methylgallové kyseliny, patřící mezi isokumariny. (33; 34)

Bergenin je látka ve vodě těžce rozpustná. Vodný roztok vykazuje vlastnosti slabé kyseliny. Krystalická forma není hygroskopická. Bergenin je ve vlhkém prostředí stabilní. Při 75% vlhkosti a teplotě 40°C nedošlo po čtyřech týdnech k vizuální změně ani změně obsahu. (35)

V kyselém prostředí je bergenin stabilní, v neutrálním začíná docházet k rozkladu a rychlost degradace se zvyšuje s rostoucím pH. Při výzkumu je možné zvýšit stabilitu bergenuinu přidáním kyseliny askorbové. (35; 36)

Vlastnosti bergenuinu mohou vysvětlovat nízkou biologickou dostupnost po perorálním podání. K degradaci bude patrně docházet ve střevě vlivem vyššího pH. Nízká hydrofilita i lipofilita znemožňují snadnou prostupnost membránami. (35)

Farmakologické studie provedené na krysách prokázaly po intravenózním podání širokou distribuci bergenuinu, po perorálním podání se bergenin nepodařilo v krvi detekovat. (37)

Výzkum farmakokinetiky bergenuinu v lidském těle ukázal, že po perorálním podání dávky 250 mg bylo po 1,1 – 2,9 hod dosaženo maximální koncentrace  $c_{max} = 66,6 \pm 22,1$  ng/ml. Eliminační poločas byl stanoven na  $3,7 \pm 2,4$  hod. Z uvedených dat vyplývá předpoklad značně individuální rychlosti metabolizace. (36) Wang oproti tomu dosáhl po podání 250 mg bergenuinu perorálně jednotnějších výsledků (maximální koncentrace  $c_{max} = 15,915$  ng/ml dosaženo po 1,125 hod, eliminační poločas 4,198 hod). Nicméně byla potvrzena nízká biologická dostupnost bergenuinu po p. o. podání. (38)

U bergenuinu byl zjištěn účinek antitusický, protizánětlivý, antiarytmický, neuroprotektivní a trypanocidní. Působí proti průjmům, zácpě a jako hypolipidemikum. (32; 33; 34; 35; 37)

Pokusem na laboratorních krysách byl prokázán hepatoprotektivní účinek. Jako hepatotoxická látka byl použit  $CCl_4$ . Poškození jaterních buněk se projevilo a bylo dokumentováno zvýšením sérových transamináz. Při současném podání bergenuinu byly hodnoty sérových transamináz poloviční ve srovnání s kontrolní skupinou bez bergenuinu. (34)

Pokusem na laboratorních krysách a morčatech byl prokázán gastroprotektivní účinek.

Tento účinek je způsoben zvýšenou produkcí prostaglandinů. (33)

Bergenin se také podílí na inhibici produkce Th1 cytokinázy, interleukinu IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . Inhibicí dochází ke zmírnění zánětlivé reakce organismu, na které se tyto látky podílí.

Tato vlastnost bergeninu byla ověřena na laboratorních krysách. (32)

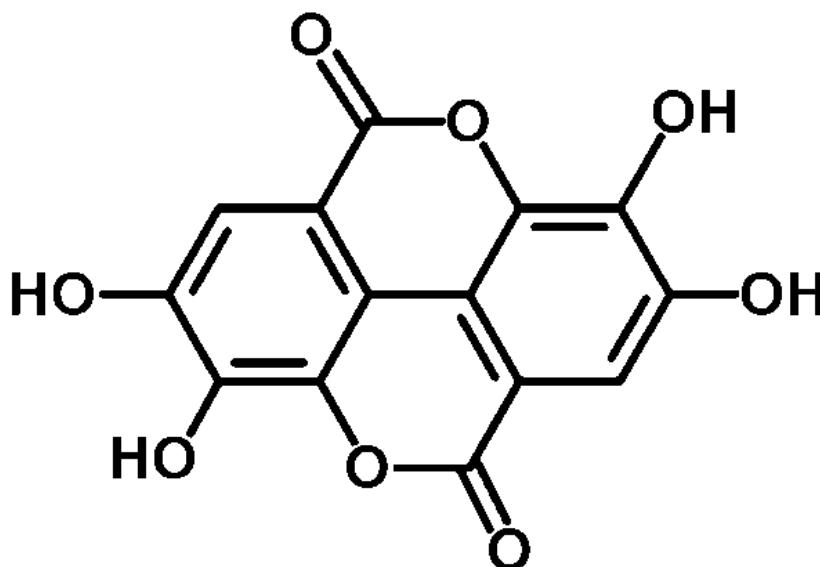
Bergenin také prokázal slabý antimykotický a antivirový účinek. Slabá aktivita proti viru HIV se jevila jako perspektivní, ale bergenin neprokázal žádné účinky na inhibici HIV-1 integrázy nebo reverzní transkriptázy. (32)

Nízká biologická dostupnost bergeninu po p. o. podání ovšem minimalizuje jeho pozitivní účinky a znemožňuje jeho širší využití v léčbě. Jedním z možných způsobů jak zlepšit absorpci bergeninu se jeví jeho současné podání s borneolem Borneol je netoxický a často využívaný ke zvýšení absorpce. Další studie byly zaměřeny na strukturální modifikace, přípravu proléčiva nebo použití různých lékových forem pro zlepšení biologické dostupnosti. (39)

Derivát bergeninu norbergenin má antioxidační, gastroprotektivní a protivirové účinky. (32)

### 3.4.5 Kyselina ellagová

Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny ellagové (40)



Kyselina ellagová je chemicky 2,3,7,8-tetrahydroxy-chromeno[5,4,3-cde]chromen-5,10-dion. Molekula kyseliny ellagové má lipofilní i hydrofilní části. Je vysoce termostabilní, s teplotou tání 350°C. (41)

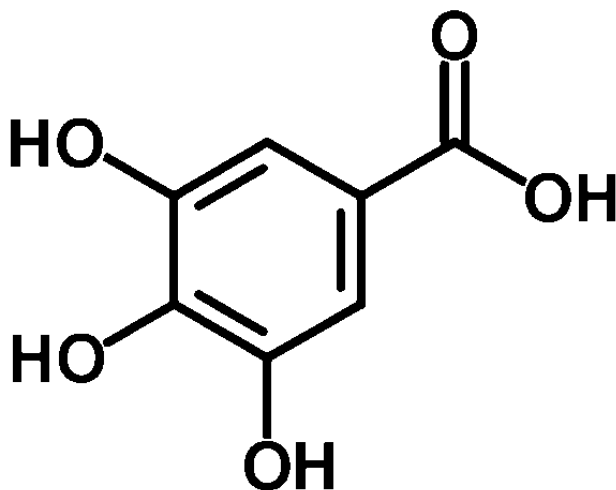
Kyselina ellagová má antioxidační a chemoprotektivní vlastnosti. Antivirové působení bylo pozorováno *in vitro* na viru HIV. Došlo k zastavení růstu a šíření viru, patrně interakcí kyseliny ellagové s virovým proteinem. Dalším předpokládaným mechanismem účinku je inhibiční působení na virovou integrázu, které způsobí zastavení replikace viru. Antimikrobní vlastnosti jsou vysvětlovány antigyrázovou aktivitou. Při pokusech *in vitro* bylo zjištěno inhibiční působení i na MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*). (41)

Perspektivní využití nabízí kyselina ellagová i v léčbě rakoviny. Zatím nepopsaným způsobem zabraňuje růstu tumorů. Po *in vitro* pokusech s lidskými buňkami plic, prsní tkáň, prostaty a střeva se předpokládá, že ellagová kyselina zabraňuje růstu nádorových buněk, inhibuje jejich migraci a tím i vznik metastáz a u nádorových buněk spouští proces apoptózy. (41)

Léčebné účinky kyseliny ellagové byly testovány *in vitro* a je potřeba jejich potvrzení v živých organismech. Zatím byly podniknuty kroky k zajištění jejího zisku pomocí fermentace. (41)

### 3.4.6 Kyselina gallová

Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny gallové (42)



Kyselina gallová je 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina. Je hojně zatoupená v čaji, víně, bobulích a ovoci, a to volně nebo ve formě gallotaninů. (43; 44)

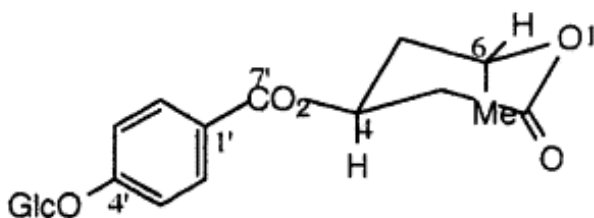
Má antimutagenní, antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální a antivirové vlastnosti. Protizánětlivý účinek je způsoben inhibicí enzymu cyklooxygenázy. Inhibicí enzymu tyrosinázy působí proti melanogenezi. Mezi nejdůležitější vlastnosti kyseliny gallové ale patří schopnost působit proti mutagenezi, preventivně proti vzniku rakovinného bujení a vlastní protinádorový účinek. (44)

Protinádorové působení bylo zatím prokázáno *in vitro* proti buňkám nádoru jícnu, prostaty a buňkám postiženým leukémií. Výhoda užití kyseliny gallové spočívá v selektivní cytotoxicitě, pro zdravé buňky je jen málo toxická. Mechanismy účinku kyseliny gallové v protinádorovém působení jsou různé. Spočívají mimo jiné v inhibici ribonukleotidové reduktázy, enzymu, který je ve zdravých buňkách téměř neaktivní, jeho aktivita je však posílena právě v nádorově pozměněných buňkách. Inhibice tohoto enzymu vede k postupné inhibici DNA syntézy v tumoru. Dále se na protinádorovém působení podílí různé mechanismy vedoucí k indukci apoptózy, inhibice angiogeneze a redukce buněčné migrace a metastázování. (43; 44; 45)

Alkylestery kyseliny gallové *in vitro* prokázaly v indukci apoptózy nádorových buněk vyšší účinnost než samotná kyselina gallová. (45)

### 3.4.7 Paashaanolakton

Obrázek 7: Chemická struktura paashaanolaktonu (46)



Paashaanolakton je chemicky 4(4'-β-D-glukopyranosyloxy-1'-benzoyloxy)-6-methyltetrahydropyran-2-on. Byl izolován z oddenků *B. ligulata*. (46)

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál, chemikálie, pomůcky

#### 4.1.1 Materiál

Rostlinný materiál pochází z rostlin pěstovaných v Lednici na pozemcích Zahradnické fakulty Mendlovy univerzity v Brně. Odběr vzorků proběhl v září 2014. Vybrány byly tři plně vyvinuté listy z každé rostliny.

Z listů uchovaných v 10% formaldehydu byly zhotoveny trvalé preparáty.

Z čerstvých listů uchovaných pouze krátkou dobu v lednici byly připraveny trvalé i nativní preparáty.

#### 4.1.2 Chemikálie

- Ethanol denat. methanolem 96 %. Penta Chrudim, ČR  
použité koncentrace 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 99 %
- N-butanol p. a., Penta Chrudim, ČR
- Roztok N-butanol – parafín (roztok parafínu v N-butanolu nasycený při 40°C)
- Parafín (čistý parafín s teplotou tání 52 – 54°C) Lachema, ČR
- Xylen p. a., Penta Chrudim, ČR
- Chloralhydrát Ph. Eur., Sigma-Aldrich, Belgie
- Hematoxylin, Lachema ČR
- Histofluid, Marienfeld Německo
- Formaldehyd, Lachema ČR

#### 4.1.3 Pomůcky

- pinzeta anatomická, pinzeta na mikroskopická skla, preparační jehla, skalpel, žiletka, nůžky, štětec, kapátko, mikroskopické nádobí, lázeň na mikroskopická skla
- podložní a krycí skla

#### **4.1.4 Pístroje**

- sáňkový mikrotom, FOM-Gyem, typ OE 908/1, Rakousko
- stereo mikroskop Olympus SZ-CTV
- fotoaparát Olympus Camedia C-7070
- počítačový program Quick PHOTO MICRO 2.3
- Mikroskop Olympus model BX41, okulár 10x/22, objektivy: Plan 4x/0,10, 10x/0,25, 20x/0,40, 40x/0,65
- Termostat Binder, Německo

### **4.2 Postup přípravy preparátů**

#### **4.2.1 Nativní preparát**

Vzorek listu byl nejdříve prosvětlen několikaminutovým zahříváním v chloralhydrátu na vodní lázni. Poté byl zhotoven nativní preparát.

Příčný řez listu byl zhotoven ručně žiletkou. Pokožka listu byla stažena žiletkou po změkčení listu ve vodě po dobu minimálně 15 minut.

Pro přípravu nativního preparátu byla použita místo vody kapka glycerinu, čímž došlo k prodloužení životnosti preparátu. (47)

#### **4.2.2 Trvalý preparát**

Preparáty byly připravovány postupem dle Řezáčové (47). Tento postup byl podle potřeby upraven s ohledem na chování rostlinného materiálu.

##### **4.2.2.1 Příprava vzorku pro krájení**

Vzorek vybraný pro tvorbu trvalého preparátu bylo nutné nejdříve odvodnit. Vzorek postupně prošel ethanolovou řadou se zvyšující se koncentrací, až k bezvodému ethanolu. (Použitý ethanol nebyl zcela bezvodý, ale pro histologické účely dostačující.)

(Tabulka 1)



Tabulka 1: Odvodnění – ethanolová řada

koncentrace ethanolu [%]	čas [min]
50	30
60	30
70	30
80	15
90	15
96	15
100	15

Následně bylo nutné převést vzorek do vhodného rozpouštědla, které rozpouští zároveň ethanol i parafín. Vybraným rozpouštědlem byl v tomto případě butanol. Butanol splňuje obě podmínky a v laboratoři byla k dispozici připravená směs butanol-parafín nutná pro práci v dalším kroku. Převedení vzorku do butanolu viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Nasycení butanolem - projasnění

rozpouštědlo	čas [min]
butanol I	10
butanol II	10
butanol III	10

Vzorek byl poté přes směs butanolu a parafínu přenesen do čistého parafínu. (Tabulka 3) Převedení vzorku do parafínu se odehrávalo v termostatu při teplotě 52°- 54°C.

Tabulka 3: Nasycení parafínem

	čas
směs butanol - parafín	5 dní
parafín	2 dny

Vzorek prosycený parafínem byl zalit čistým parafínem do bločku. Předmět byl umístěn do krabičky zhotovené z bílého kancelářského papíru a zalit roztopeným parafínem. Tento parafínový bloček byl poté ponechán chladnout při pokojové teplotě několik dní. Zchladlý parafínový bloček byl po okrajích ořezáním zbaven přebytečného parafínu a upraven do tvaru kvádrů. Následně byl pomocí nahřáté špachtle přitmělen k dřevěnému bločku. Po vychladnutí byl výsledný blok připraven ke krájení.

#### 4.2.2.2 Krájení a lepení řezů

Ze vzorků byly na sáňkovém mikrotomu zhotoveny řezy o šířce 27  $\mu\text{m}$ . Po nakrájení byly řezy vyrovnány na vodní hladině o teplotě 35 – 40°C. Vyrovnané řezy byly lepeny na připravená podložní sklíčka. Tato sklíčka byla předem potřena směsí vaječného bílku a glycerolu a rychle zahřáta krátkým protažením nad plamenem.

Sklíčka s řezy byla uložena do termostatu při teplotě 35°C na minimálně 24 hod.

#### 4.2.2.3 Barvení řezů

Barvení řezů bylo provedeno pouze u některých vzorků, jednotlivě.

Pro obarvení řezů bylo nutné zbavit vzorek parafínu. Jako vhodné rozpouštědlo byl vybrán xylen, který z podložních sklíček odstraňoval parafín poměrně rychle a beze zbytků. Xylen byl ze vzorku následně odstraněn ethanolem. (Tabulka 4)

Tabulka 4: Odstranění parafínu

rozpouštědlo	čas [min]
xylén I	10
xylén II	10
ethanol 96%	10
ethanol 70%	10
destilovaná voda	10 minut

Pro obarvení byl použit hematoxylin. Barvivo na vzorky působilo 4 minuty, poté byl řez opláchnut 96% ethanolém.

#### 4.2.2.4 Uzavírání řezů

Po prvním mikroskopickém prohlédnutí byly k uzavření vybrány pouze řezy odpovídající kvality. Pokud byly řezy barveny, muselo pro uzavření řezů dojít k odvodnění, protože uzavírací médium není mísitelné s vodou. Odvodnění proběhlo v 96 % ethanolu a následně byl řez prosycen xylenem, se kterým se médium mísí. (Tabulka 5) Řezy prosycené xylenem byly uzavřeny pomocí média Histofluid.

Tabulka 5: Nasycení xylenem

rozpouštědlo	čas [min]
ethanol 96%	5
ethanol 96%	5
xylén I	10
xylén II	10

### 4.3 Vyhodnocení preparátů

Nativní i trvalé preparáty byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX41. Fotografie byly zhotoveny pomocí počítačového programu Quick PHOTO MICRO pomocí fotoaparátu Olympus Camedia C-7070. Program umožnil i měření či označování struktur na pořízených fotografiích. Fotografie byly dále upraveny pomocí programu Microsoft Office Picture Manager.

Fotografie mikroskopovaných objektů jsou na obr 8 – 16 (*B. ciliata*), obr. 17 – 25 (*B. crassifolia*) a obr. 26 - 34 (*B. ornata*).

U preparátů zhotovených z pokožky listu byl určen typ průduchů a stomatální index podle ČL 2009 (48):

„Stomatální index se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100 \cdot S}{E + S}$$

v němž značí: S - počet průduchů na dané ploše listu

E - počet pokožkových buněk, včetně chlupů, na téže listové ploše.“

Stanovení bylo provedeno pro vzorek listu desetkrát a byla vypočítána průměrná hodnota. Výsledky viz Tabulka 8, Tabulka 11 a Tabulka 14.

Zjištěna byla velikost 30 drůz (*B. ciliata* a *B. crassifolia*) a 50 drůz (*B. ornata*) v průměru i v obvodu. Měřeno bylo v 6 preparátech (*B. ciliata*), v 10 preparátech (*B. crassifolia*) a v 6 preparátech (*B. ornata*). Výsledky viz Tabulka 7, Tabulka 10 a Tabulka 13.

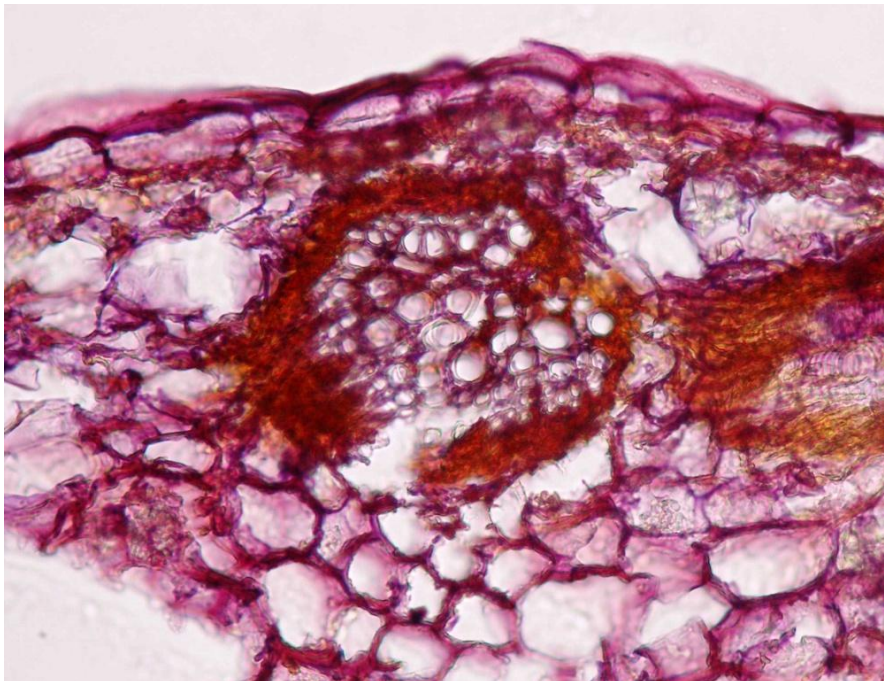
## 5 Výsledky

Trvalé preparáty umožnily pozorování anatomických struktur na příčném řezu listem – cévní svazek příčně i podélně, houbový parenchym, pokožkové buňky, drúzy. Stavba listu byla studována i na nativních preparátech. Preparáty zhotovené stažením pokožky listu umožnily pozorování průduchů a pokožkových buněk.

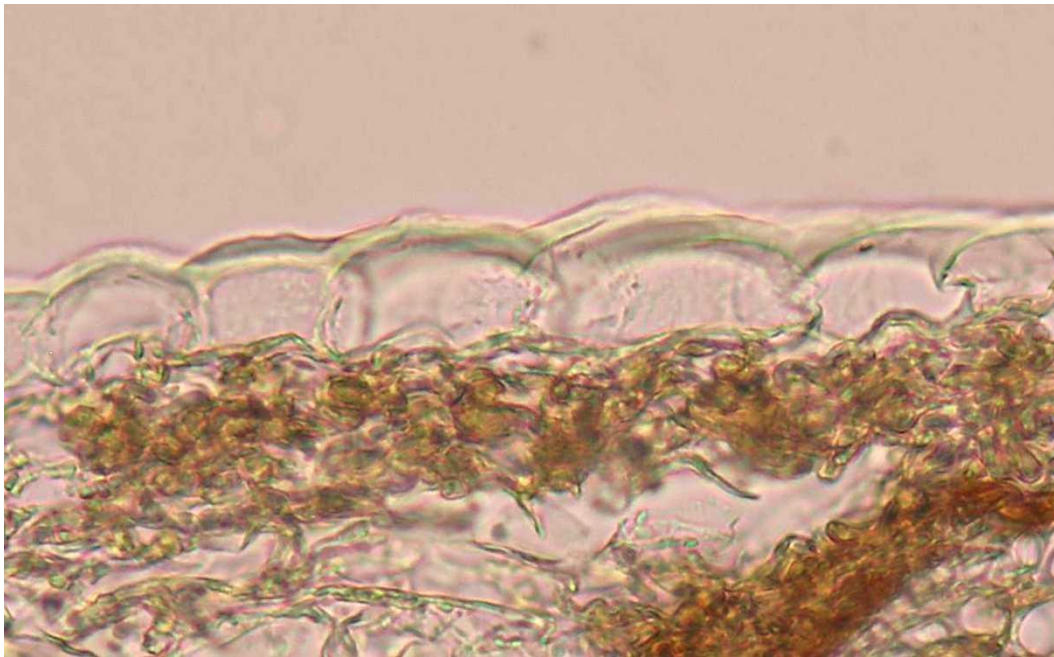
### 5.1 *Bergenia ciliata*

#### 5.1.1 Trvalé preparáty *Bergenia ciliata*

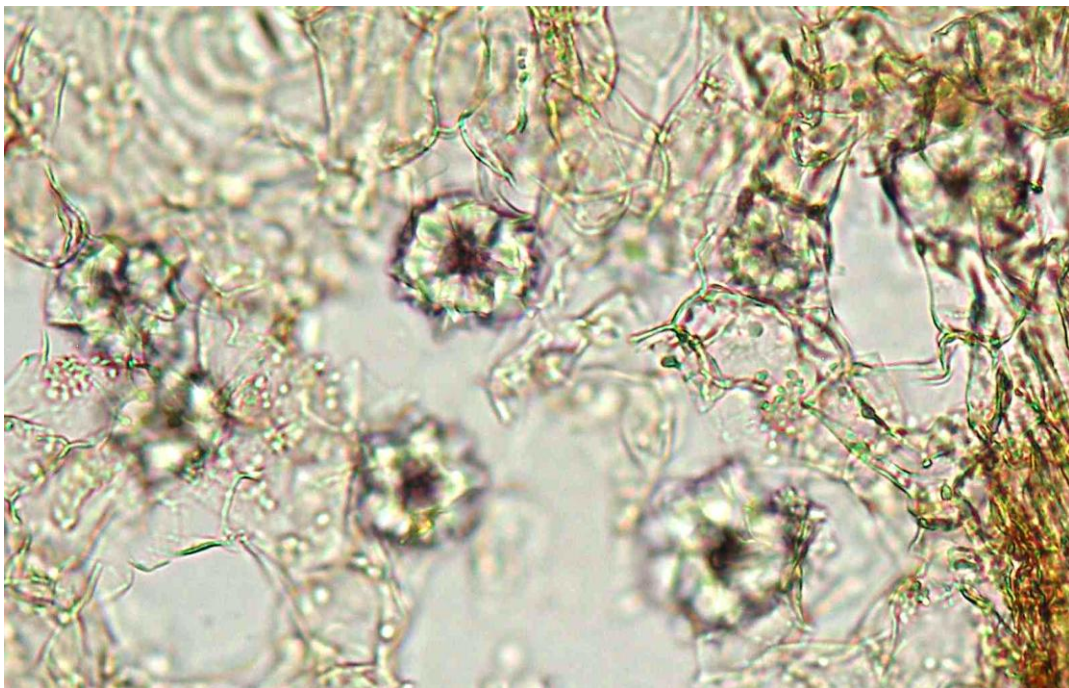
Obrázek 8: *B. ciliata* - příčný řez cévním svazkem, pokožkové buňky, barveno hematoxylinem, zvětšení 200x



Obrázek 9: *B. ciliata* - detail pokožkových buněk, nebarveno, zvětšení 200x



Obrázek 10: *B. ciliata* - drúzy, nebarveno, zvětšení 200x



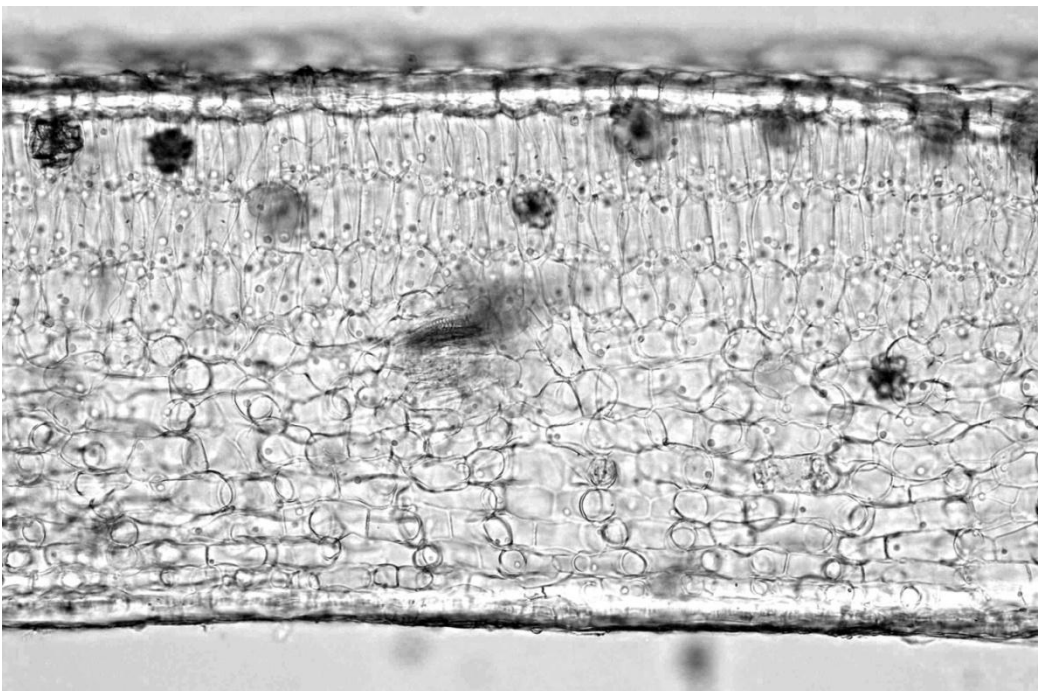


Obrázek 11: *B. ciliata* - podélný řez cévním svazkem, nebarveno, zvětšení 200x



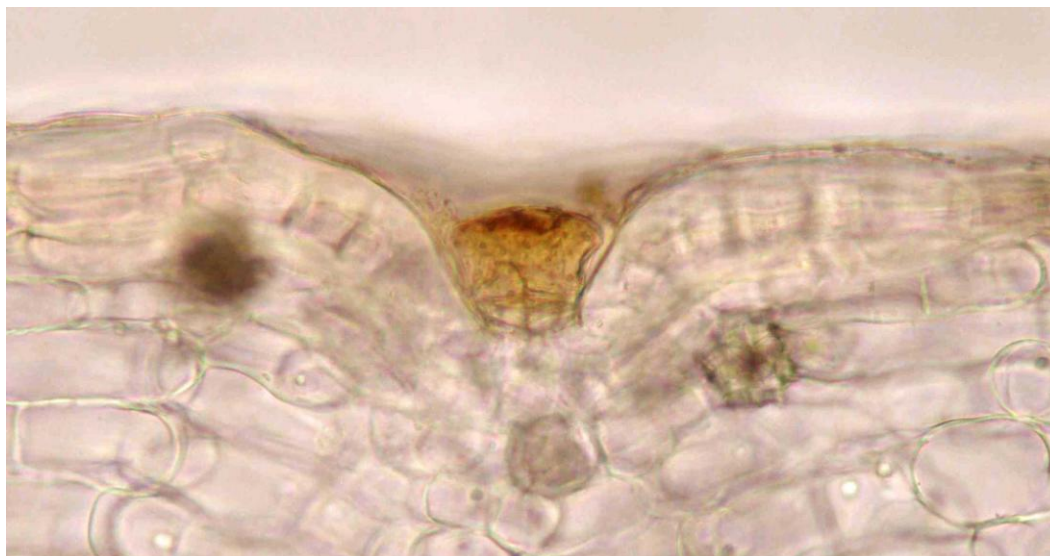
### 5.1.2 Nativní preparáty *Bergenia ciliata*

Obrázek 12: *B. ciliata* - příčný řez, palisádový a houbový parenchym, zvětšení 100x





Obrázek 13: *B. ciliata* - žláзка, zvětšení 200x



Obrázek 14: *B. ciliata* - pokožka s průduchy, zvětšení 200x

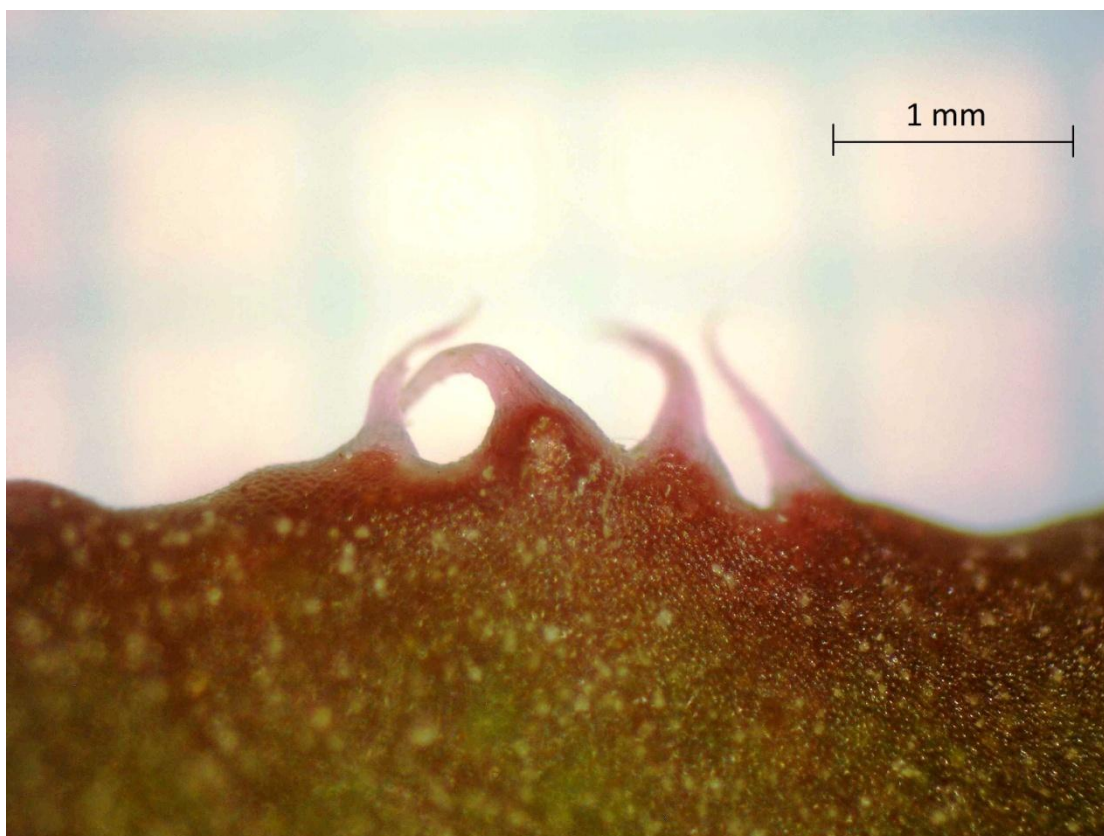




Obrázek 15: *B. ciliata* - detail průduchu, zvětšení 400x



Obrázek 16: *B. ciliata* - detail okraje listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x



### 5.1.3 Hodnocení

List má bifaciální stavbu (Obrázek 12). Palisádový parenchym je tvořen třemi řadami nad sebou (Obrázek 12). V listovém parenchymu se nacházejí drúzy šťavelanu vápenatého. Drúzy se vyskytují volně i ve shlucích (Obrázek 10, Obrázek 12). Na spodní pokožce listu se vyskytují žlázky, které jsou rozmístěné nepravidelně (Obrázek 13). Velikost 30 drúz je zaznamenána v tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6: Velikosti drúz B. ciliata

drúza č.	průměr [ $\mu\text{m}$ ]	obvod [ $\mu\text{m}$ ]	plocha [ $\mu\text{m}^2$ ]
1	14	48	185
2	15	51	202
3	16	62	286
4	16	51	210
5	33	92	673
6	17	54	228
7	29	92	678
8	20	68	364
9	15	49	179
10	22	74	432
11	21	63	312
12	26	84	562
13	21	56	252
14	29	87	595
15	21	71	402
16	32	99	774
17	17	58	269
18	21	71	403
19	19	55	240
20	18	54	232
21	20	56	245
22	21	67	358
23	16	48	186
24	13	42	136
25	23	66	347
26	18	55	240

Tabulka 6: Velikosti drúz *B. ciliata* - pokračování

drúza č.	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
27	23	79	502
28	26	93	680
29	17	61	300
30	16	48	176

Z naměřených dat byly vypočteny průměrné hodnoty, modus a medián.

Tabulka 7: Vyhodnocení velikosti drúz *B. ciliata*

	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
průměrná hodnota	20,5	65	355
modus	21	48	240
medián	20	61,5	293

Preparáty zhotovené stažením pokožky listu umožnily pozorování průduchů a pokožkových buněk. Při pozorování z plochy mají pokožkové buňky různý tvar, častý je tvar pěti a šestiúhelníku.

Průduchy jsou anomocytycké. Byl stanoven stomatální index (Tabulka 8). Průměr z deseti měření stomatálního indexu je 7,94.

Tabulka 8: Stomatální index *B. ciliata*

číslo měření	počet průduchů na jednotce plochy	počet pokožkových buněk na jednotce plochy	stomatální index
1	2	29	6,45
2	3	35	7,89
3	1	16	5,88
4	3	31	8,82
5	3	33	8,33
6	4	35	10,26
7	2	28	6,67
8	5	44	10,20
9	1	17	5,56
10	4	39	9,30

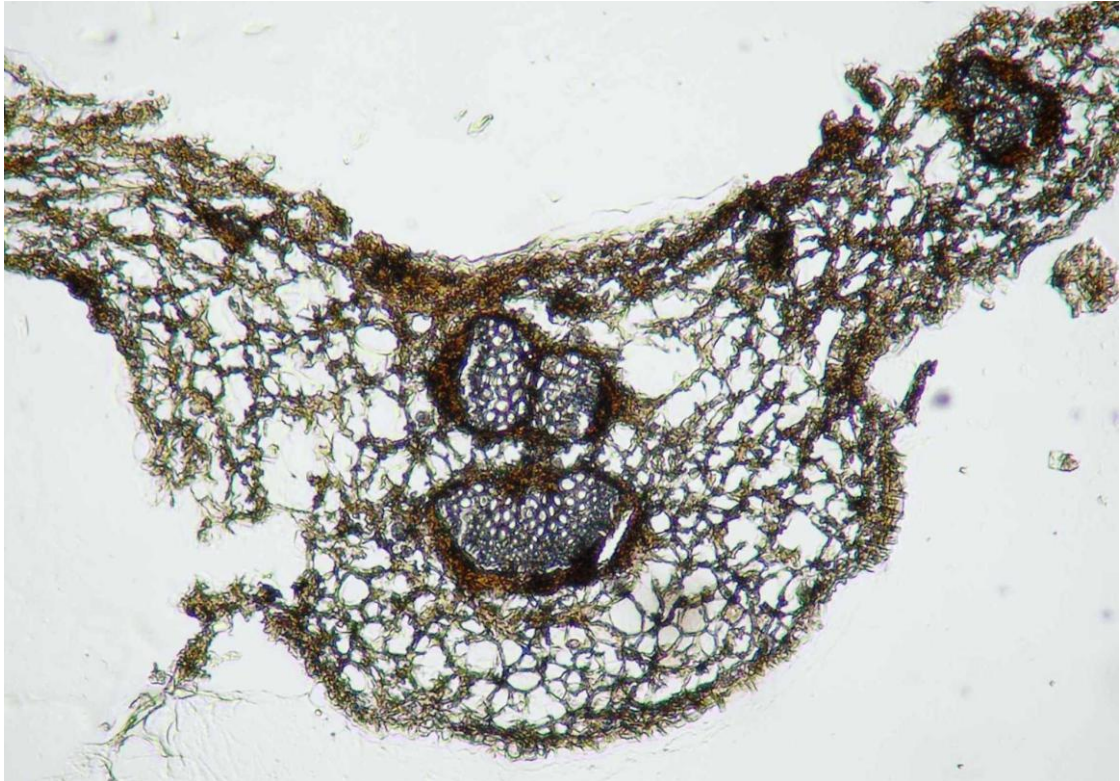
Stereomikroskop umožnil detailní pozorování okraje listu. Okraj listu je zvlněný. V nepravidelných intervalech se vyskytují špičaté dlouhé zoubky, často ve skupině několika vedle sebe (Obrázek 16)



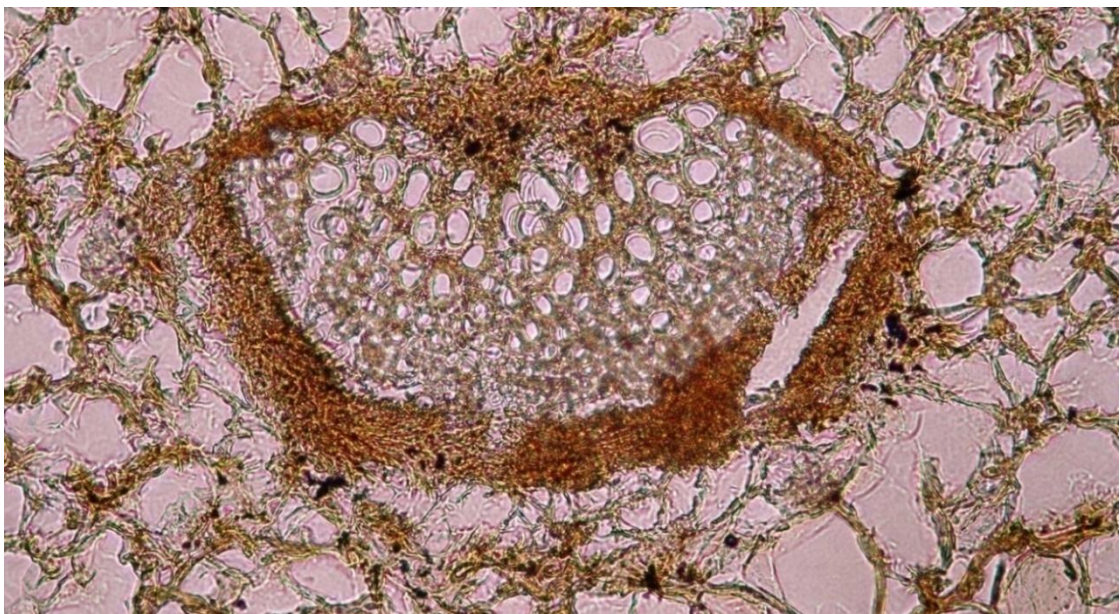
## 5.2 *Bergenia crassifolia*

### 5.2.1 Trvalé preparáty *Bergenia crassifolia*

Obrázek 17: *B. crassifolia* - příčný řez, cévní svazky, houbový parenchym, nebarveno, zvětšení 40x

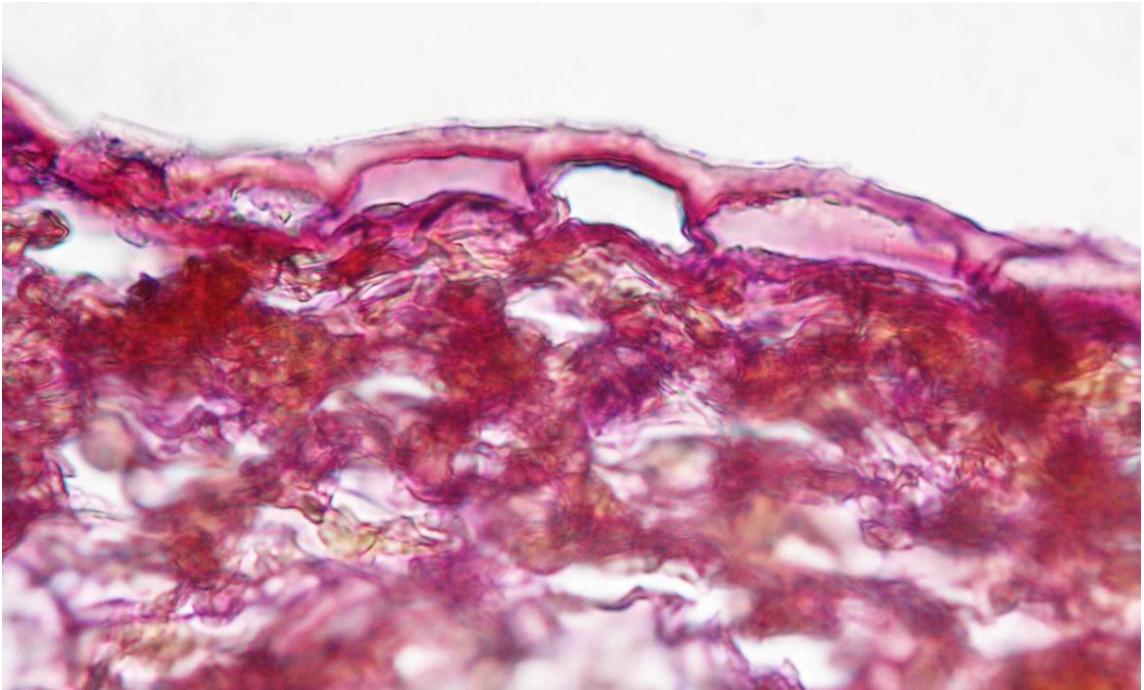


Obrázek 18: *B. crassifolia* - detail cévního svazku, nebarveno, zvětšení 200x



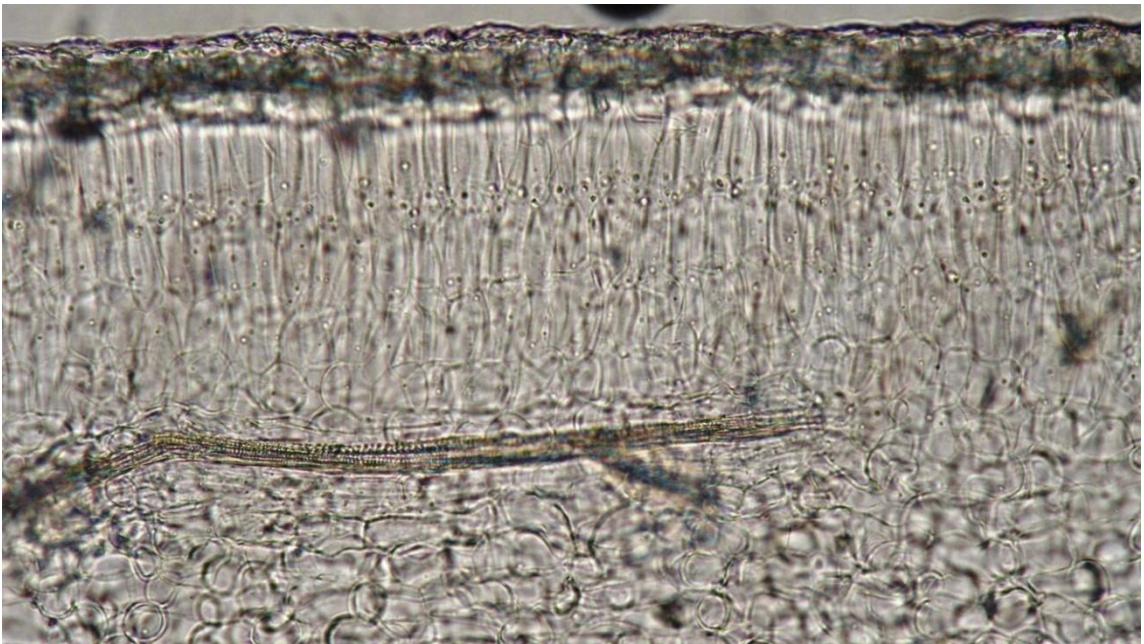


Obrázek 19: *B. crassifolia* - detail pokožkových buněk, barveno hematoxylinem, zvětšení 400x



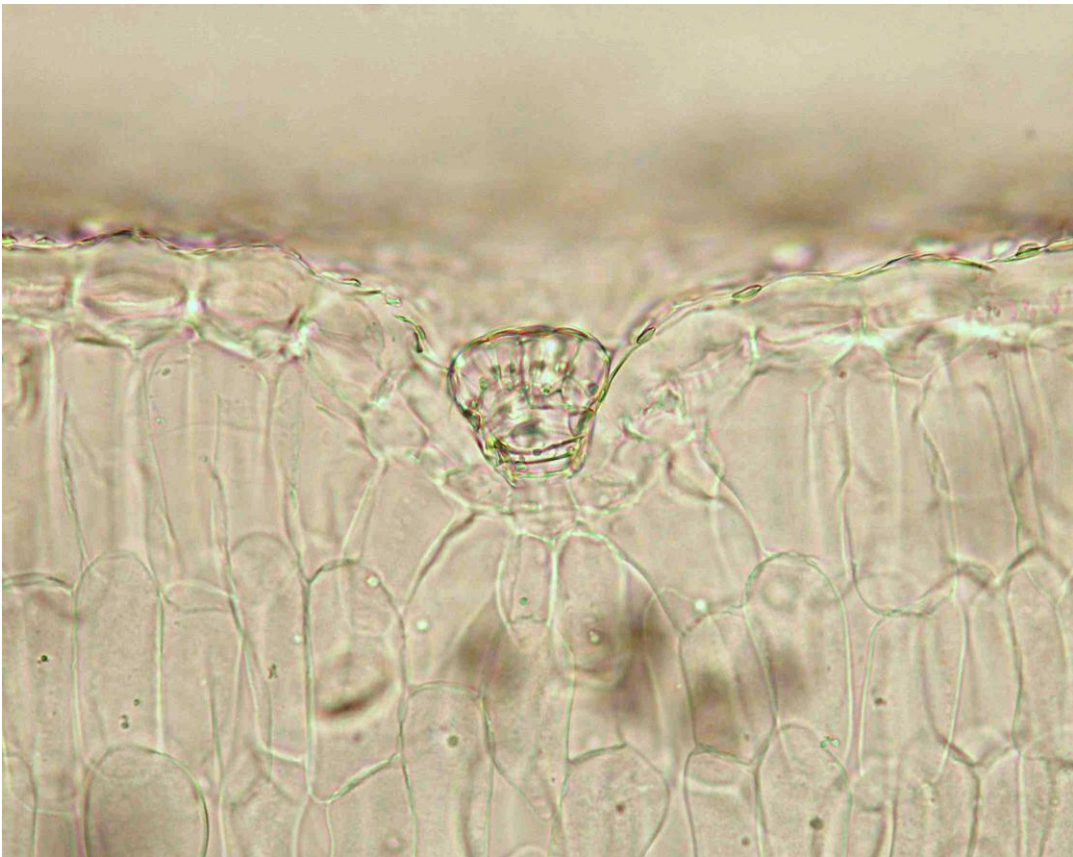
### 5.2.2 Nativní preparáty *Bergenia crassifolia*

Obrázek 20: *B. crassifolia* - příčný řez listem, příčný cévní svazek, zvětšení 100x

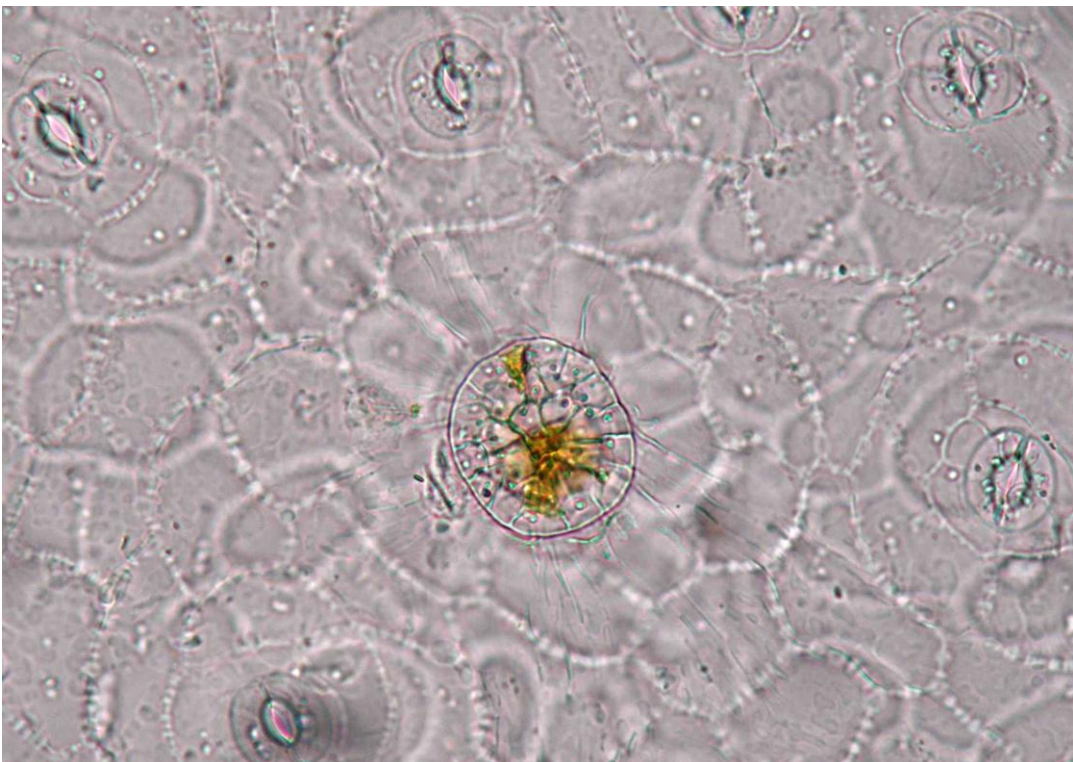




Obrázek 21: *B. crassifolia* - detail žlázy, zvětšení 200x

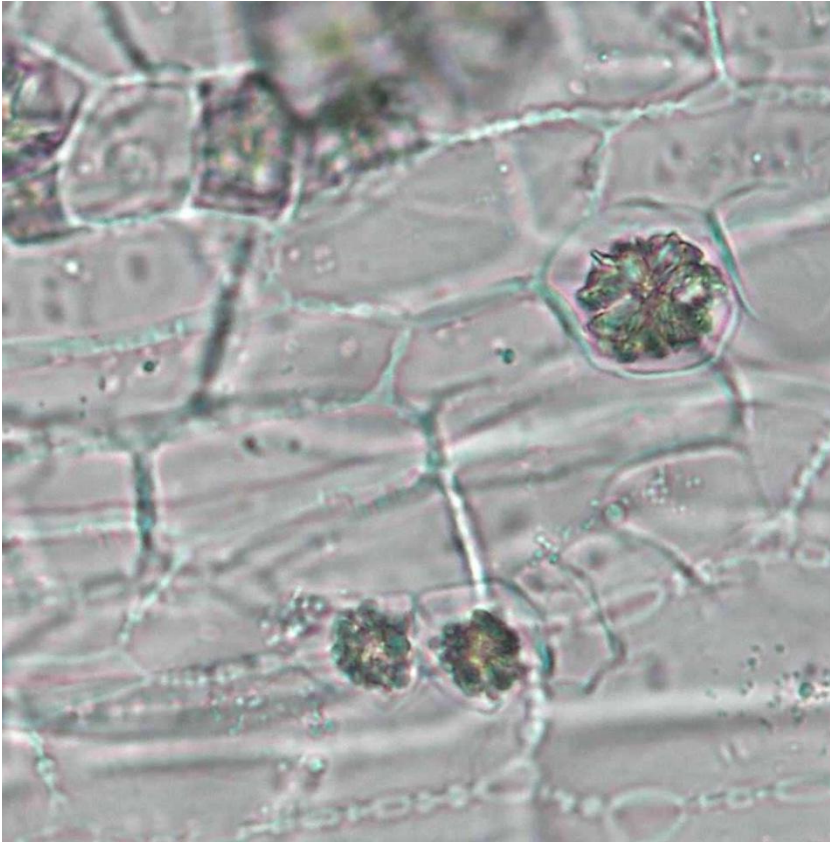


Obrázek 22: *B. crassifolia* - detail žlázy, průduchy, pokožkový preparát, zvětšení 200x

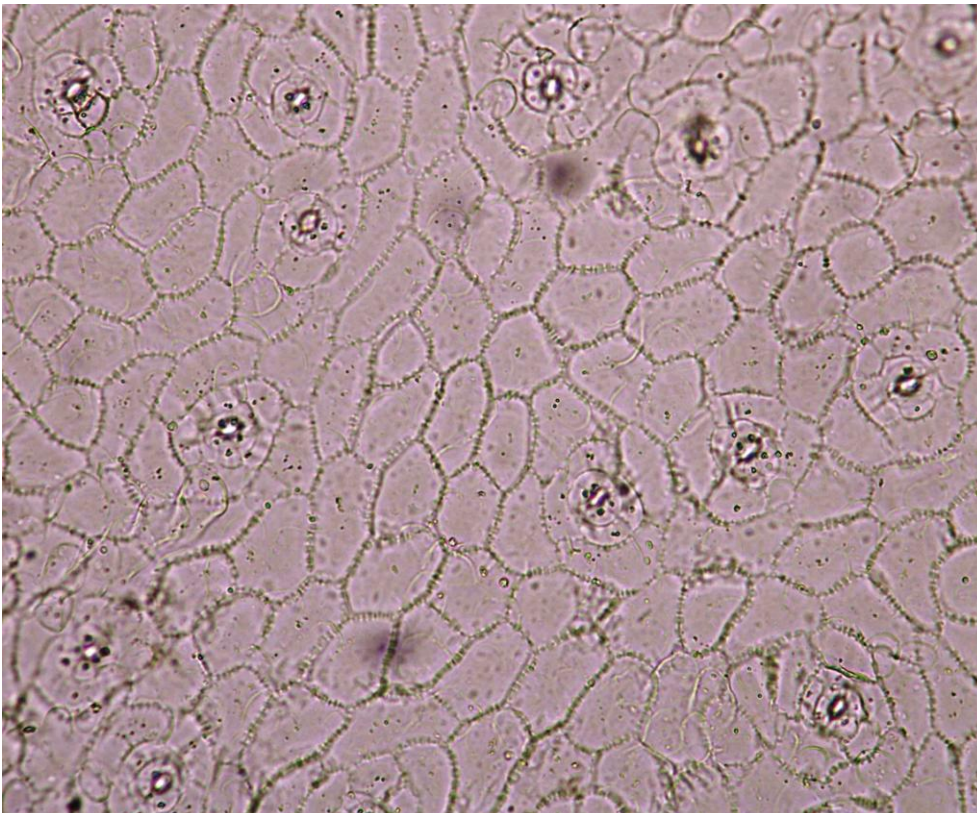




Obrázek 23: *B. crassifolia* - pokožka, drúzy, zvětšeno 200x

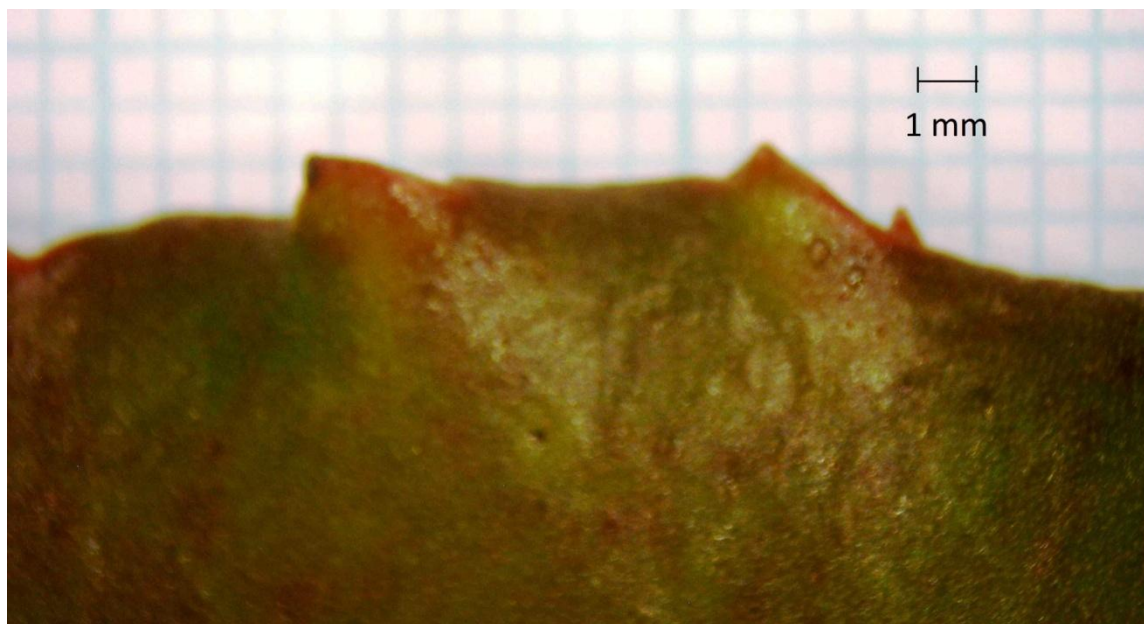


Obrázek 24: *B. crassifolia* - pokožka, průduchy, zvětšení 100x





Obrázek 25: *B. crassifolia* - okraj listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x



### 5.2.3 Hodnocení

List je bifaciální. Na trvalých preparátech bylo možno pozorovat houbový a palisádový parenchym (Obrázek 17, Obrázek 20). Palisádový parenchym je tvořen třemi řadami buněk nad sebou. Dále bylo možné pozorovat pokožku (Obrázek 19) a cévní svazky (Obrázek 17, Obrázek 18).

V listovém parenchymu se nacházejí drúzy šťavelanu vápenatého (Obrázek 23). Drúzy se vyskytovaly jednotlivě i ve shlucích.

Velikost 30 drúz byla změřena a zanesena do tabulky (Tabulka 9).

Tabulka 9: Velikosti drúz *B. crassifolia*

drúza č.	průměr [ $\mu\text{m}$ ]	obvod [ $\mu\text{m}$ ]	plocha [ $\mu\text{m}^2$ ]
1	17	50	195
2	15	44	151
3	17	47	176
4	18	56	248
5	22	61	292
6	21	60	283
7	16	49	185

Tabulka 9: Velikosti drúz *B. crassifolia* - pokračování

drúza č.	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
8	15	45	162
9	14	50	188
10	17	54	236
11	12	41	110
12	11	45	148
13	11	43	143
14	14	50	200
15	16	52	216
16	14	53	219
17	14	49	193
18	11	37	110
19	10	38	115
20	12	39	116
21	12	47	170
22	11	43	150
23	11	36	99
24	14	53	215
25	16	46	167
26	12	44	156
27	14	47	174
28	12	42	137
29	17	54	223
30	18	58	266

Naměřené velikosti byly dále zpracovány a byly vypočítány průměrné hodnoty, modus a medián (Tabulka 10).

Tabulka 10: Vyhodnocení velikosti drúz *B. crassifolia*

	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
průměrná hodnota	14,5	48	181
modus	14	50	110
medián	14	47	175

Pokožkové buňky mají při pohledu z plochy různý tvar, častý je tvar pěti a šestiúhelníku (Obrázek 24). Na spodní pokožce listu se nacházejí nepravidelně rozmístěné žlázy (Obrázek 21, Obrázek 22).

Průduchy jsou anomocytické. Stomatální index byl stanoven na 7,78. Hodnota byla získána z deseti měření (Tabulka 11).

Tabulka 11: Stomatální index *B. crassifolia*

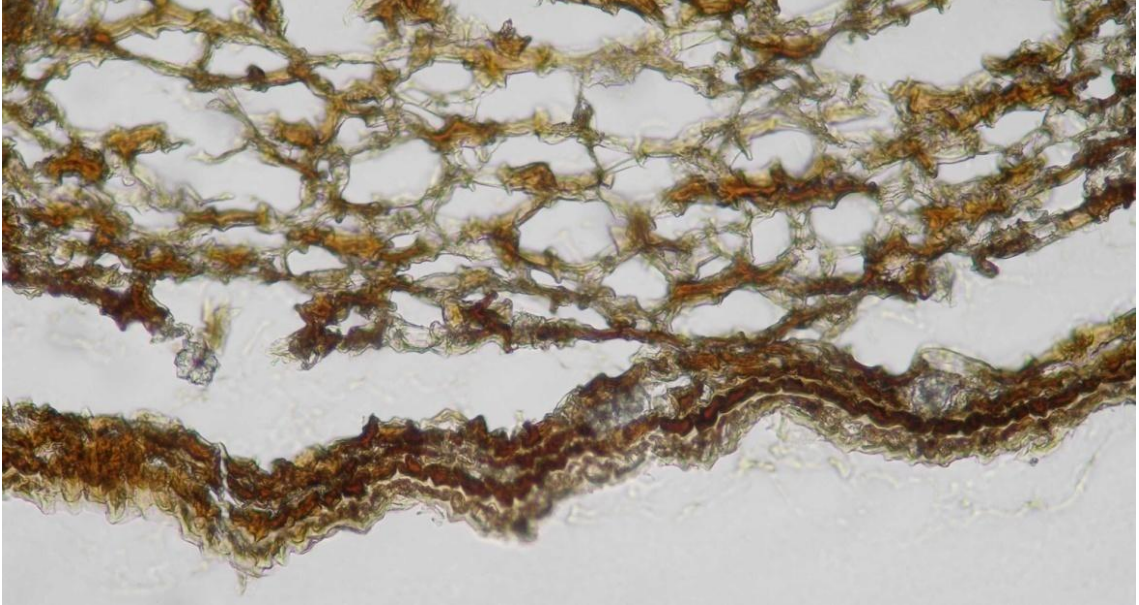
číslo měření	počet průduchů na jednotce plochy	počet pokožkových buněk na jednotce plochy	stomatální index
1	3	24	11,11
2	3	25	10,71
3	2	28	6,67
4	3	39	7,14
5	2	21	8,70
6	2	34	5,56
7	4	42	8,70
8	3	37	7,50
9	1	19	5,00
10	1	14	6,67

Stereomikroskop umožnil detailní pozorování makroskopické stavby listu. Okraj listu je ostře pilovitý, místy dvojitě pilovitý (Obrázek 25).

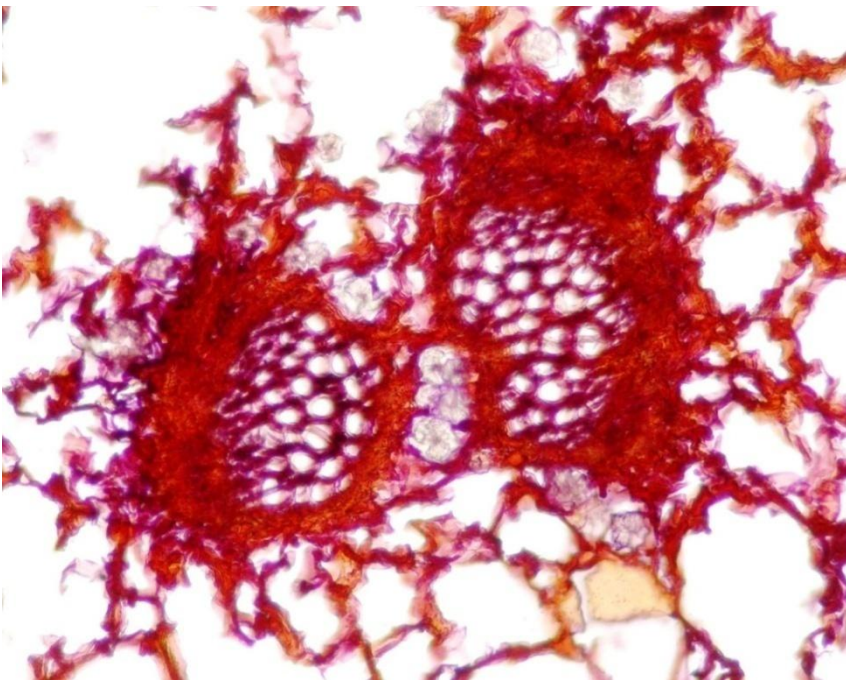
## 5.3 *Bergenia ornata*

### 5.3.1 Trvalé preparáty *Bergenia ornata*

Obrázek 26: *B. ornata* - palisádový a houbový parenchym, drúzy, nebarveno, zvětšení 100x

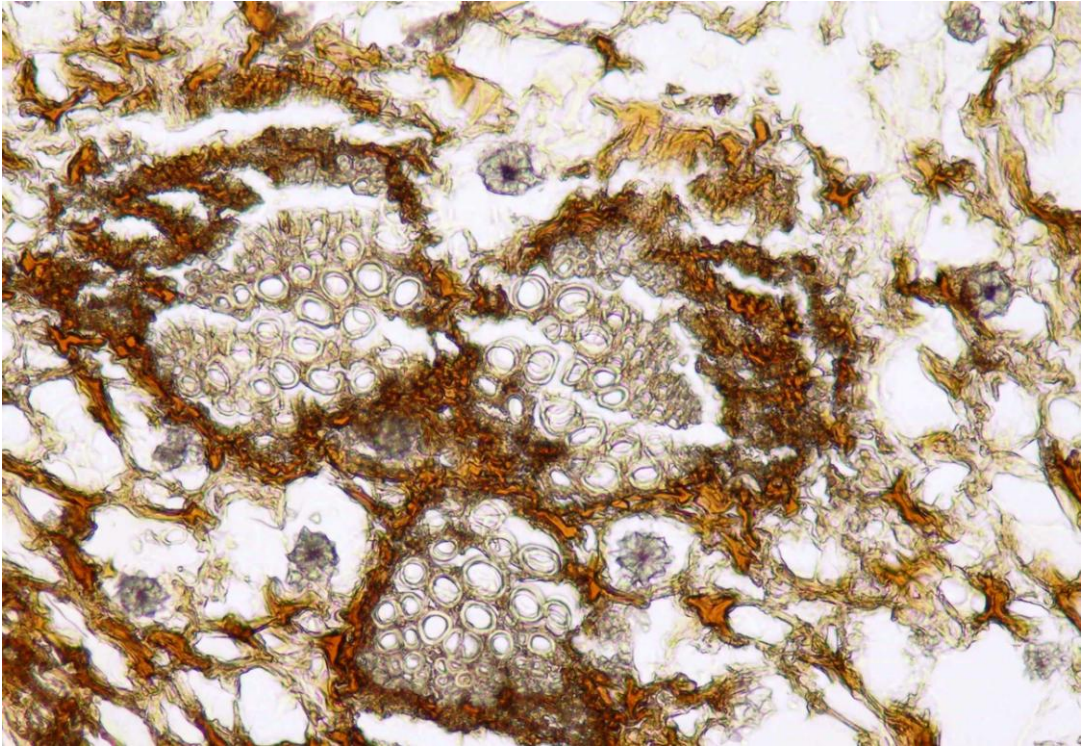


Obrázek 27: *B. ornata* - cévní svazek se shlukem drúz, obarveno hematoxylinem, zvětšení 100x

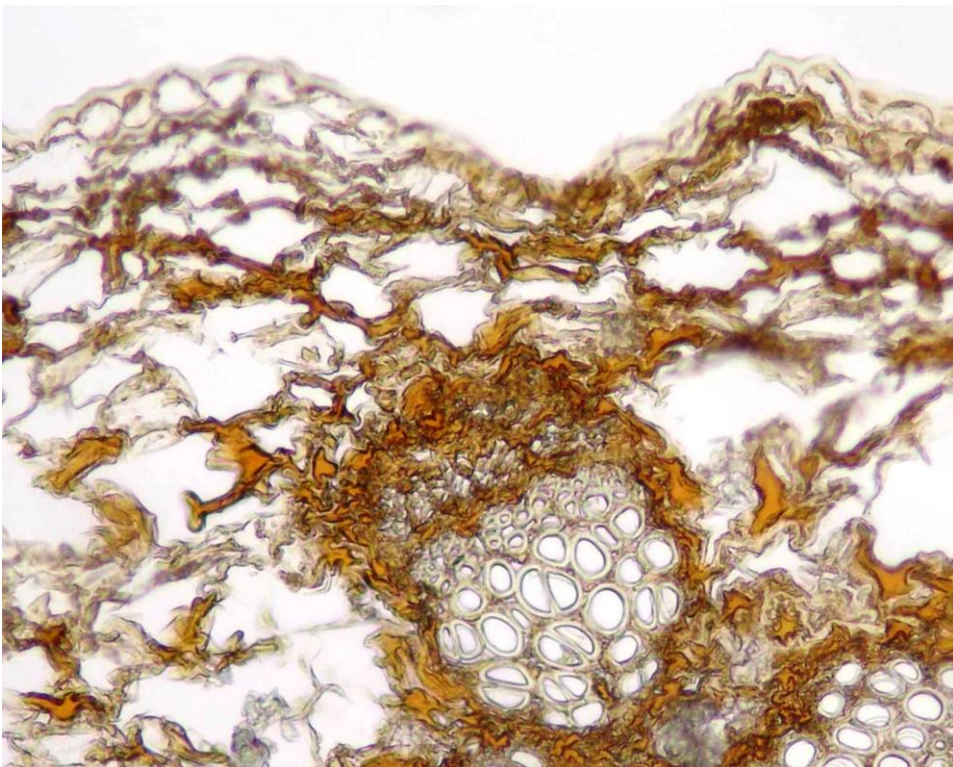




Obrázek 28: *B. ornata* - - cévní svazek obklopený drúzami, nebarveno, zvětšení 100x



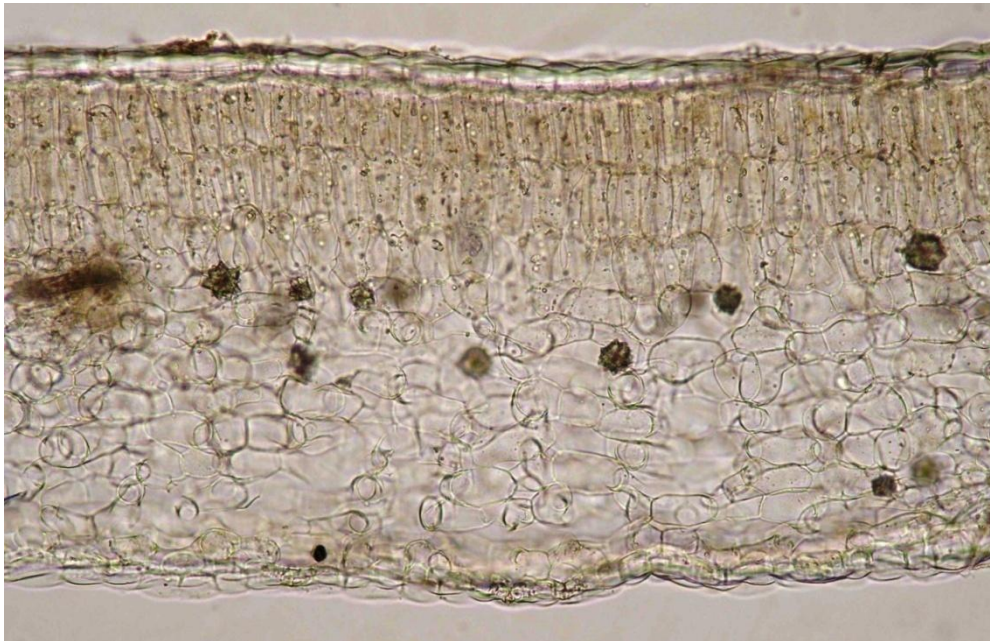
Obrázek 29: *B. ornata* - cévní svazek, buňky pokožky, nebarveno, zvětšení 100x



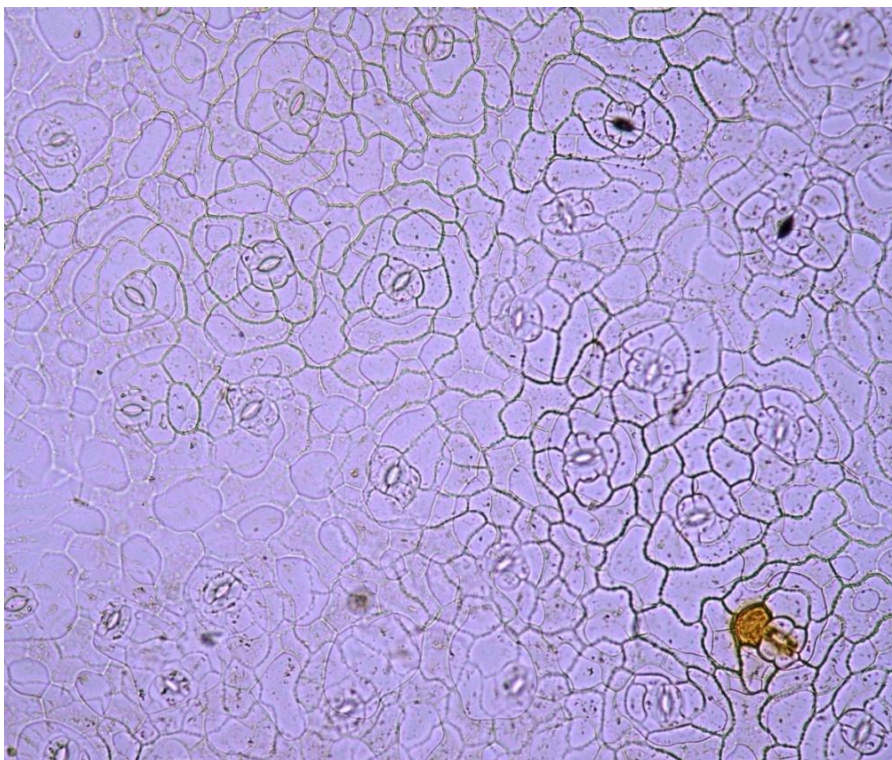


### 5.3.2 Nativní preparáty *Bergenia ornata*

Obrázek 30: *B. ornata* - příčný řez, viditelné drúzy, zvětšení 100x



Obrázek 31: *B. ornata* - spodní pokožka listu, průduchy, zvětšení 100x

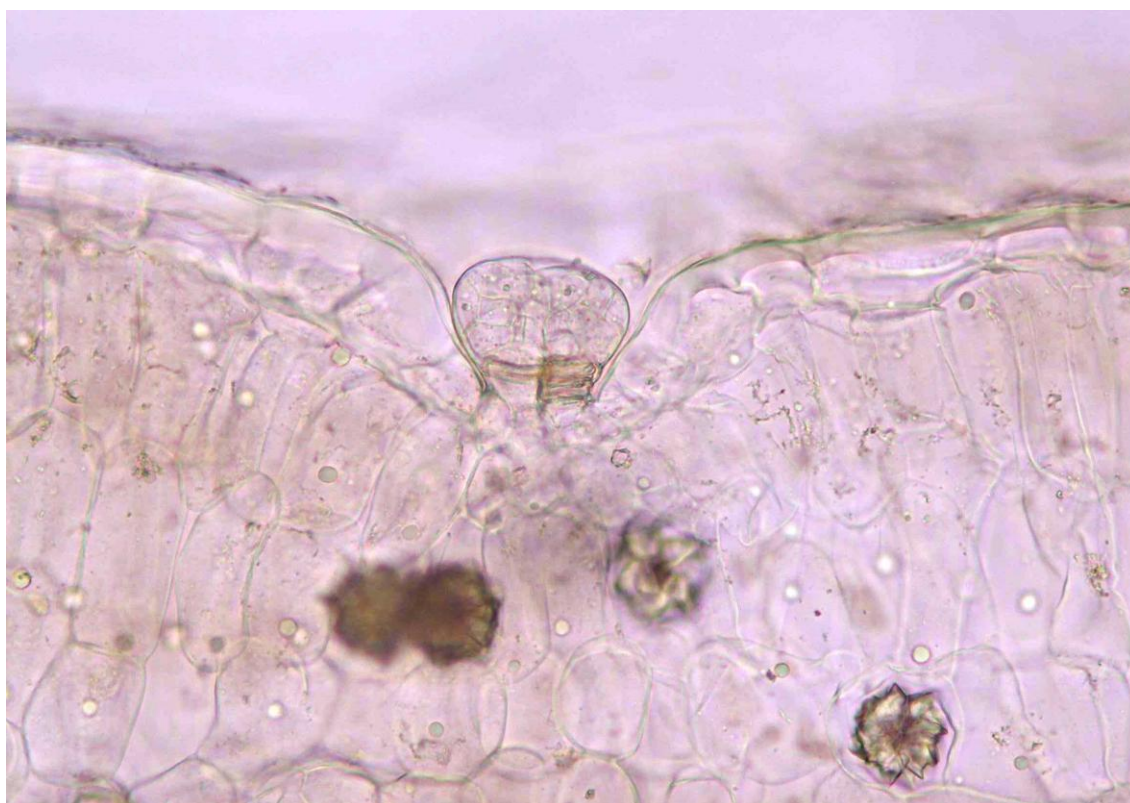




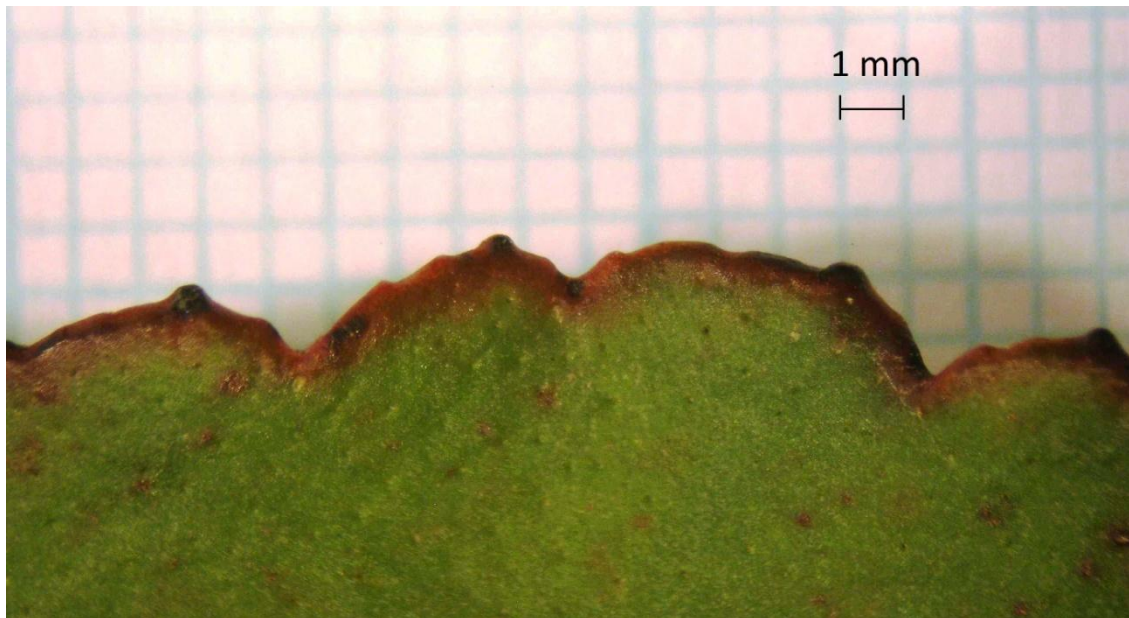
Obrázek 32: *B. ornata* - detail průduchu, zvětšení 400x



Obrázek 33: *B. ornata* - detail žlázy, drúzy, zvětšení 200x



Obrázek 34: *B. ornata* - okraj listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x



### 5.3.3 Hodnocení

Trvalé preparáty umožnily detailně pozorovat jednotlivé anatomické struktury – příčný řez cévním svazkem (Obrázek 27, Obrázek 28, Obrázek 29), houbový i palisádový parenchym (Obrázek 26, Obrázek 30). List je bifaciální a palisádový parenchym je třířadý.

V listovém parenchymu se vyskytovaly drúzy šťavelanu vápenatého. Drúzy se vyskytovaly volně i v okolí cévních svazků, jednotlivě i ve shlucích (Obrázek 26, Obrázek 27, Obrázek 28).

Velikost 50 drúz byla zaznamenána v tabulce (Tabulka 12).



Tabulka 12: Velikost drúz *B. ornata*

drúza č.	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
1	18	62	307
2	26	90	644
3	33	100	795
4	34	93	679
5	27	93	685
6	37	126	1261
7	25	102	813
8	22	66	343
9	34	105	869
10	28	94	699
11	32	99	774
12	18	68	368
13	29	92	671
14	22	84	547
15	19	70	392
16	20	88	613
17	30	89	625
18	21	71	402
19	37	101	808
20	24	94	691
21	29	81	516
22	22	80	508
23	37	95	706
24	27	97	753
25	27	87	600
26	29	86	581
27	35	109	914
28	32	98	762
29	34	93	685
30	18	65	332
31	25	84	558
32	26	80	508
33	17	69	382
34	19	65	332
35	22	76	449

Tabulka 12: Velikost drúz *B. ornata* - pokračování

drúza č.	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
36	27	77	465
37	20	77	466
38	15	72	409
39	21	72	411
40	24	80	506
41	18	77	466
42	19	73	423
43	21	75	417
44	19	68	373
45	26	73	423
46	11	54	232
47	20	90	644
48	19	71	396
49	28	79	496
50	25	76	461

Z naměřených hodnot byly vypočítány průměry, zaznamenán je také modus a medián (Tabulka 13)

Tabulka 13: Vyhodnocení velikosti drúz *B. ornata*

	průměr [μm]	obvod [μm]	plocha [μm <sup>2</sup> ]
průměrná hodnota	25	83	563
modus	19	93	644
medián	25	81	512

Preparáty zhotovené z pokožkové vrstvy umožnily detailní pozorování tvaru a velikosti průduchů a pokožkových buněk. Pokožkové buňky mají v ploše různý tvar, časté jsou buňky ve tvaru pěti a šestiúhelníku. Na spodní pokožce listu se nepravidelně vyskytovaly žlásky (Obrázek 33).

Průduchy jsou anomocytické.

Stomatální index byl vypočítán jako průměr z deseti měření (Tabulka 14) a byl stanoven na 6, 796.

Tabulka 14: Stomatální index *B. ornata*

číslo měření	počet průduchů na jednotce plochy	počet pokožkových buněk na jednotce plochy	stomatální index
1	2	34	5,56
2	2	30	6,25
3	1	17	5,56
4	2	24	7,69
5	4	39	9,30
6	1	20	4,76
7	1	18	5,26
8	3	33	8,33
9	4	47	7,84
10	2	25	7,41

Makroskopicky je okraj listu zvlňný, zubatý, místy dvojité zubatý (Obrázek 34).

## 6 Diskuze

Listy rodu *Bergenia* jsou významným zdrojem mnoha farmakologicky aktivních látek, především arbutinu a bergeninu. Bergenie jsou kvůli obsahu bergeninu využívány pro své antimikrobiální, antitusické a gastroprotektivní účinky. Arbutin v rostlinách přispívá k antibakteriálnímu působení a nachází využití v kosmetologii, kde slouží jako prostředek k zesvětlení pleti nebo odstranění pigmentových skvrn. Terapeuticky se bergenie také využívají k rozpouštění močových kamenů a působí adstringentně díky přítomnosti tříslovin. (2)

Široké možnosti využití rodu *Bergenia* a obliba těchto rostlin v lidové medicíně vedou k podrobnějšímu zkoumání. Některé z připisovaných účinků byly potvrzeny *in vitro*, jiné i na laboratorních zvířatech. Předmětem fytochemického výzkumu jsou převážně druhy *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia himalaica* Boriss, *Bergenia ligulata* (Wall.) a *Bergenia stracheyi* Engl. (9; 12)

Pro fytochemickou analýzu je důležitá správná identifikace materiálu. Mezi druhy téhož rodu mohou být rozdíly v obsahových látkách. (5; 12)

V návaznosti na fytochemické analýzy listů *B. ciliata*, *B. crassifolia* a *B. ornata* (5) byla studována anatomická stavba listů těchto rodů.

Trvalé preparáty umožnily pozorování anatomických struktur na příčném řezu listem – cévní svazek příčně i podélně, houbový parenchym, pokožkové buňky, drúzy šťavelanu vápenatého. Stavba listu byla studována i na nativních preparátech. Ty umožnily pozorovat stavbu listu a anatomické struktury neporušené a neovlivněné chemickými činidly a mechanickým namáháním. Preparáty zhotovené stažením pokožky listu umožnily pozorování průduchů a pokožkových buněk.

Fotografie preparátů sloužily nejen k dokumentování jednotlivých anatomických znaků, ale také pomohly při jejich kvantifikaci.

Balkrishna et al. (3) se ve své práci zabývá anatomií tří druhů rodu *Bergenia*. U *B. ciliata* se pozorované anatomické znaky ve většině shodují. Jediným rozdílem je nepřítomnost škrobových zrn. Ta nebyla v mých preparátech pozorována. Nepřítomnost škrobu mohlo způsobit nejspíš jeho vyplavení do rozpouštědel při přípravě preparátů.

## 6.1 Celková stavba listu

Listy jsou bifaciální.

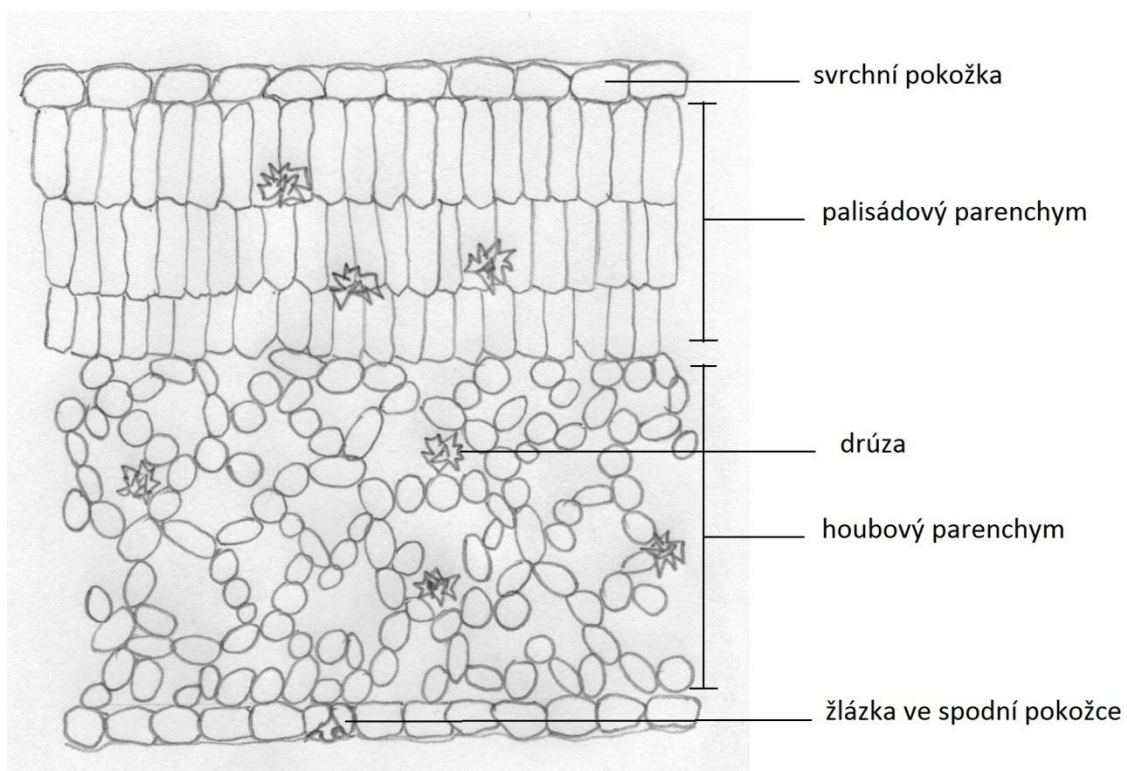
Vrstva palisádového parenchymu je tvořena třemi řadami buněk nad sebou. Buňky palisád jsou protáhlé, obdélníkové. Výška palisád se snižuje směrem ke středu listu.

Vrstva houbového parenchymu je zhruba stejně vysoká jako vrstva palisád. Buňky houbového parenchymu mají často oválný tvar (Obrázek 12, 20, a 30).

Cévní svazky jsou kolaterální. Poměrně často jsou ve tvaru písmene C. (Obrázek 18, Obrázek 27)

Obecnou stavbu listu na příčném průřezu ukazuje Obrázek 35.

Obrázek 35: Schématický náčrt průřezu listem bergenie - pokožka, palisádový a houbový parenchym, drúzy



## 6.2 Pokožka

Pokožkové buňky mají na příčném řezu soudkovitý tvar a jsou svrchu kryty kutikulou. V ploše mají pokožkové buňky různý tvar, jsou často protáhlé, laločnaté, ve tvaru pěti a šestiúhelníku.

Pokožka spodní strany listu obsahuje nepravidelně rozmístěné žlázky.

### 6.3 Průduchy

Průduchy se vyskytují na obou stranách pokožky a jsou anomocytické. Svěrací buňky jsou úzké a protáhlé. (Obrázek 15, Obrázek 32)

Výpočet stomatálního indexu byl proveden pro spodní pokožku listu, kde byly průduchy častější.

Stomatální index byl nejvyšší u *B. ciliata* (7,94), nejnižší u *B. ornata* (6,796). U *B. crassifolia* byl stanoven na 7,78. Vypočtené hodnoty jsou si poměrně blízké a tento znak není vhodný k rozlišení studovaných druhů.

### 6.4 Drúzy šťavelanu vápenatého

Drúzy se vyskytovaly v poměrně hojném počtu u všech tří zástupců.

Umístění drúz bylo různé. Vyskytovaly se jednotlivě i ve shlucích, volně i v okolí cévních svazků. Nebylo zaznamenáno žádné charakteristické umístění nebo seskupení drúz, které by mohlo sloužit jako rozlišovací znak mezi jednotlivými druhy.

Změřením velikosti drúz bylo vypočteno, že v průměru největší drúzy se vyskytují u druhu *Bergenia ornata* (Tabulka 13) a nejmenší drúzy u druhu *Bergenia crassifolia* (Tabulka 10). Naměřený rozdíl je však nepatrný a nemůže sloužit k rozlišení druhů.

### 6.5 Srovnání

Jednotlivé druhy bergenií se liší tvarem okraje listové čepele (Obrázek 16, Obrázek 25, Obrázek 34). Makroskopicky tedy lze tyto tři druhy odlišit.

Anatomická stavba listů sledovaných druhů je shodná.

## 7 Závěr

Z listů *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch a *Bergenia ornata* Stein byly zhotoveny trvalé a nativní preparáty příčného řezu listem a nativní preparáty listové pokožky.

Byla pozorována anatomická stavba listu – palisádový a houbový parenchym, cévní svazky, pokožka se žlázkami a drúzy šťavelanu vápenatého. Tyto struktury jsou fotograficky zdokumentovány.

Drúzy byly změřeny a z hodnoty jejich velikosti a obvodu byl vypočten průměr. Průměrné velikosti drúz byly od 14,5  $\mu\text{g}$  do 25  $\mu\text{g}$ . Žádný z druhů se velikostí drúz významně neliší.

Na preparátech pokožky byl pozorován tvar buněk pokožky v ploše a také tvar a počet průduchů.

Průduchy jsou anomocytické a u všech tří druhů byl stanoven stomatální index. Hodnoty indexu jsou si příliš blízké (od 6,796 do 7,94) a nelze je použít jako znak odlišující druhy.

Nebyl nalezen žádný mikroskopicky hodnotitelný znak, podle kterého by bylo možné tyto tři druhy odlišit. Makroskopicky je možné tyto druhy odlišit podle okraje listové čepele.

## 8 Citovaná literatura

1. **Zhang, Yongsu.** A review on resource status, bioactive ingredients, clinical applications and biological progress in *Bergenia*. *Journal of medicinal plant research (online)*. 2011, 5(18), 4396 - 4399.
2. **Shikov, Alexander et al.** *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch - Pharmacology and phytochemistry. *Phytomedicine [online]*. 2014, 21(12), 1534 - 1542.
3. **Balkrishna, Ghimire.** Anatomy of vegetative parts of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. (Saxifragaceae): A potential medicinal herb. *International Journal of Botany*. 2012, 8(3), 136-144.
4. **Verma, Priyanka et al.** In vitro conservation of twenty overexploited medicinal plants belonging to the Indian subcontinent. *The Scientific World Journal [online]*. 2012, 2012, 1 - 10.
5. **Hendrychová, Helena et al.** Antioxidant activity and phenolic content of *Bergenia crassifolia*, *B. x ornata* and *B. ciliata*. *NPC Natural Product Communications*. 2014, 9(4), 519-522.
6. **Dostál, Josef.** *Nová květena ČSSR 1*. Praha : Academia Praha, 1989. 396. 80-200-0095-X.
7. ipni.org. *The International Plant Names Index*. [Online] [Citace: 15. 3 2015.] [http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find\\_family=&find\\_genus=bergenia&find\\_species=&find\\_infrafamily=&find\\_infragenus=&find\\_infraspecies=&find\\_author\\_abbrev=&find\\_includePublicationAuthors=on&find\\_includePublicationAuthors=off&find\\_includeBasionym](http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find_family=&find_genus=bergenia&find_species=&find_infrafamily=&find_infragenus=&find_infraspecies=&find_author_abbrev=&find_includePublicationAuthors=on&find_includePublicationAuthors=off&find_includeBasionym).
8. **Zhao, Jiayuan et al.** Chemical composition of the volatiles of three wild *Bergenia* species from western China. *Flavour and Fragrance Journal [online]*. 2006, 21(3), 431 - 434.
9. **Hendrychová, Helena, Tůmová, Lenka.** Rod *Bergenia* - obsahové látky a biologická aktivita. *Čes. slov. Farm.* 2012, Sv. 61, 203-208.
10. **Rajkumar, Venkatadri et al.** Evaluation of antioxidant activities of *Bergenia ciliata* rhizome. *Records of Natural Products [online]*. 2010, 4(1), 38 - 48.
11. **Sinha, Sanghamitra et al.** Evaluation of anti-tussive activity of *Bergenia Ciliata* Sternb. rhizome extract in mice. *Phytomedicine [online]*. 2001, 8(4), 298 - 301.
12. **Srivastava, Sharad et al.** Simultaneous determination of bergenin and gallic acid in different *Bergenia* species. *JPC. Journal of planar chromatography, modern TLC*. 2007, 20(4), 275 - 277.



13. **Srivastava, Sharad.** Botanical and phytochemical comparison of three *Bergenia* species. *Journal of scientific and industrial research*. 2008, 67(1), 65 - 72.
14. **Rajbhandari, M. et al.** Antiviral Activity of Some Plants Used in Nepalese Traditional Medicine. *Antiviral Activity of Some Plants Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine [online]*. 2009, 6(4), 517 - 522.
15. **Sinha, Sanghamitra et al.** Antibacterial activity of *Bergenia ciliata* rhizome. *Fitoterapia [online]*. 2001, 72(5), 550 - 552.
16. **Abbasi, Arshad et al.** Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology [online]*. 2010, 128(2), 322-335.
17. **Bhandari, Megh Raj et al.** A-Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry [online]*. 2008, 106(1), 247-252.
18. **Pop, Carmen et al.** Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch acclimated in Romania. *Notulae botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2009, 37(1), 129 -132.
19. **Pozharitskaya, Olga et al.** Separation and evaluation of free radical-scavenging activity of phenol components of green, brown, and black leaves of *Bergenia crassifolia* by using HPTLC-DPPH method. 2007, 30(15), 2447 - 2451.
20. **Shikov, Alexander et al.** Effect of *Bergenia crassifolia* L. extracts on weight gain and feeding behavior of rats with high-caloric diet-induced obesity. *Phytomedicine*. 2012, 19(14), 1250 – 1255.
21. **Shikov, Alexander et al.** Adaptogenic effect of black and fermented leaves of *Bergenia crassifolia* L. in mice. 2010, 2(1), 71 – 76.
22. **Dhalwal, K et al.** Simultaneous quantification of bergenin, catechin, and gallic acid from *Bergenia ciliata* and *Bergenia ligulata* by using thin-layer chromatography. *Journal of food composition and analysis*. 2008, 21(6), 496 -500.
23. **Reddy, U. et al.** High pressure liquid chromatographic determination of bergenin and (+)-afzelechin from different parts of Paashaanbhed (*Bergenia ligulata* yeo). *Phytochemical analysis*. 1999, 10(1), 44 - 47.
24. **Saijyo, Junichi et al.**  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Bergenia ligulata*. *Journal of oleo science*. 2008, 57(8), 431 - 435.

25. **Chemler, Joseph A. et al.** Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2007, 77(4), 797 - 807.
26. www.chemspider.com. [Online] [Citace: 9. duben 2015.]  
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.389765.html>.
27. **Xu, Wen-Hui et al.** Naturally Occurring Arbutin Derivatives and Their Bioactivities. *Chemistry & biodiversity*. 2015, 12(1), 54 - 81.
28. **Parvez, Shoukat et al.** Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *PTR. Phytotherapy research*. 2006, 20(11), 921 - 934.
29. **Golovchenko, V. et al.** Structural study of bergenan, a pectin from *Bergenia crassifolia*. *Russian journal of bioorganic chemistry*. 2007, 33(1), 47 -56.
30. **Popov, S. et al.** Immunostimulating activity of pectic polysaccharide from *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. *PTR. Phytotherapy research*. 2005, 19(12), 1052 - 1056.
31. www.chemspider.com. [Online] [Citace: 9. duben 2015.]  
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.59455.html>.
32. **Bajracharya, Gan B.** Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. *Fitoterapia*. 2015, 101, stránky 133-152.
33. **Zhang, Yong-He et al.** In vitro inhibitory effects of bergenin and norbergenin on bovine adrenal tyrosine hydroxylase. *PTR. Phytotherapy research*. 2003, 17(8), 967 - 969.
34. **Lim, Hwa-Kyung et al.** Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus* on carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 72, 469 – 474.
35. **Zhou, Dan et al.** Physicochemical properties of bergenin. *Die Pharmazie*. 2008, 63(5), 366 - 371.
36. **Yu, Weisong et al.** Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B*. 2009, 887(1-2), 33 - 36.
37. **Shi, Yan-Bin et al.** Determination and pharmacokinetic study of bergenin in rat plasma by RP-HPLC method. *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*. 2006, 20(10), 1065 – 1070.

38. **Wang, Jin et al.** Determination of bergenin in human plasma after oral administration by HPLC-MS/MS method and its pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography*. 2009, 23(2), 199 - 203.
39. **Qin, Xuan et al.** Oral characteristics of bergenin and the effect of absorption enhancers in situ, in vitro and in vivo. *Arzneimittel-Forschung*. 2010, 60(4), 198 - 204.
40. www.chemspider.com. [Online] [Citace: 9. duben 2015.]  
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4445149.html>.
41. **Sepulveda, Leonardo et al.** Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African journal of biotechnology*. 2011, 10(22), 4518 - 4523.
42. www.chemspider.com. [Online] [Citace: 9. duben 2015.]  
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html>.
43. **Lall, Rahul et al.** Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015, 16(2), 3350 - 3376.
44. **Verma, Sharad et al.** Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013, 35(3), 473 -485 .
45. **Locatelli, Claudriana et al.** Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2013, 60, 233 - 239.
46. **Chandrareddy, Umashankar et al.** Paashaanolactone from *Bergenia ligulata*. *Phytochemistry*. 1998, 47(5), 907 - 909.
47. **Řezáčová, Alena.** *Praktická cvičení z farmakognosie. Makroskopie a mikroskopie drog - I. Obecná část*. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1976. 7-30.
48. Český lékopis 2009. Praha : GRADA Publishing, a. s., 2009, Sv. I, 2.8.3, 310.

## 9 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Bergenia crassifolia</i> (18) .....	12
Obrázek 2: Chemická struktura afzelechinu (23).....	15
Obrázek 3: Chemická struktura arbutinu (26) .....	16
Obrázek 4: Chemická struktura bergeninu (31).....	18
Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny ellagové (40).....	20
Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny gallové (42).....	21
Obrázek 7: Chemická struktura paashaanolaktonu (46) .....	22
Obrázek 8: <i>B. ciliata</i> - příčný řez cévním svazkem, pokožkové buňky, barveno hematoxylinem, zvětšení 200x .....	29
Obrázek 9: <i>B. ciliata</i> - detail pokožkových buněk, nebarveno, zvětšení 200x.....	30
Obrázek 10: <i>B. ciliata</i> - drúzy, nebarveno, zvětšení 200x.....	30
Obrázek 11: <i>B. ciliata</i> - podélný řez cévním svazkem, nebarveno, zvětšení 200x .....	31
Obrázek 12: <i>B. ciliata</i> - příčný řez, palisádový a houbový parenchym, zvětšení 100x ...	31
Obrázek 13: <i>B. ciliata</i> - žláзка, zvětšení 200x .....	32
Obrázek 14: <i>B. ciliata</i> - pokožka s průduchy, zvětšení 200x.....	32
Obrázek 15: <i>B. ciliata</i> - detail průduchu, zvětšení 400x .....	33
Obrázek 16: <i>B. ciliata</i> - detail okraje listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x.....	33
Obrázek 17: <i>B. crassifolia</i> - příčný řez, cévní svazky, houbový parenchym, nebarveno, zvětšení 40x .....	37
Obrázek 18: <i>B. crassifolia</i> - detail cévního svazku, nebarveno, zvětšení 200x.....	37
Obrázek 19: <i>B. crassifolia</i> - detail pokožkových buněk, barveno hematoxylinem, zvětšení 400x .....	38
Obrázek 20: <i>B. crassifolia</i> - příčný řez listem, příčný cévní svazek, zvětšení 100x .....	38
Obrázek 21: <i>B. crassifolia</i> - detail žlázky, zvětšení 200x .....	39
Obrázek 22: <i>B. crassifolia</i> - detail žlázky, průduchy, pokožkový preparát, zvětšení 200x .....	39
Obrázek 23: <i>B. crassifolia</i> - pokožka, drúzy, zvětšeno 200x .....	40
Obrázek 24: <i>B. crassifolia</i> - pokožka, průduchy, zvětšení 100x .....	40
Obrázek 25: <i>B. crassifolia</i> - okraj listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x .....	41
Obrázek 26: <i>B. ornata</i> - palisádový a houbový parenchym, drúzy, nebarveno, zvětšení 100x.....	44
Obrázek 27: <i>B. ornata</i> - cévní svazek se shlukem drúz, obarveno hematoxylinem, zvětšení 100x .....	44
Obrázek 28: <i>B. ornata</i> - - cévní svazek obklopený drúzami, nebarveno, zvětšení 100x	45
Obrázek 29: <i>B. ornata</i> - cévní svazek, buňky pokožky, nebarveno, zvětšení 100x.....	45
Obrázek 30: <i>B. ornata</i> - příčný řez, viditelné drúzy, zvětšení 100x .....	46
Obrázek 31: <i>B. ornata</i> - spodní pokožka listu, průduchy, zvětšení 100x.....	46
Obrázek 32: <i>B. ornata</i> - detail průduchu, zvětšení 400x .....	47
Obrázek 33: <i>B. ornata</i> - detail žlázky, drúzy, zvětšení 200x.....	47

Obrázek 34: <i>B. ornata</i> - okraj listu, zvětšeno stereomikroskopem 10x.....	48
Obrázek 35: Schématický nákres průřezu listem bergenie - pokožka, palisádový a houbový parenchym, drúzy .....	53

## 10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Odvodnění – ethanolová řada.....	25
Tabulka 2: Nasycení butanolem - projasnění .....	25
Tabulka 3: Nasycení parafínem.....	26
Tabulka 4: Odstranění parafínu .....	27
Tabulka 5: Nasycení xylenem.....	27
Tabulka 6: Velikosti drúz <i>B. ciliata</i> .....	34
Tabulka 7: Vyhodnocení velikosti drúz <i>B. ciliata</i> .....	35
Tabulka 8: Stomatální index <i>B. ciliata</i> .....	36
Tabulka 9: Velikosti drúz <i>B. crassifolia</i> .....	41
Tabulka 10: Vyhodnocení velikosti drúz <i>B. crassifolia</i> .....	42
Tabulka 11: Stomatální index <i>B. crassifolia</i> .....	43
Tabulka 12: Velikost drúz <i>B. ornata</i> .....	49
Tabulka 13: Vyhodnocení velikosti drúz <i>B. ornata</i> .....	50
Tabulka 14: Stomatální index <i>B. ornata</i> .....	51