

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Hodnocení přírodních látek pomocí *in vivo* testů
s *Artemia salina***

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

Vedoucí katedry: doc. ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen, 2017

Vendula Ježková

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

DIPLOMA THESIS

**Evaluation of natural substances using *in vivo*
tests with *Artemia salina***

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Head of Department: doc. ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May, 2017

Vendula Ježková

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

V Hradci Králové, květen, 2017

Vendula Ježková

Děkuji RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za pomoc, věnovaný čas, cenné rady a připomínky při praktickém i písemném vypracování diplomové práce. Zároveň děkuji své rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV 260 412.

Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Biologická aktivita	8
1.2	Tradiční čínská medicína	8
1.3	Alzheimerova choroba	9
2	Cíl práce.....	10
3	<i>Testující organismus</i>	11
3.1	Taxonomické zařazení	11
3.2	Stavba těla.....	11
3.3	Orgánové soustavy	11
3.4	Rozmnožování.....	12
3.4.1	Nepohlavní rozmnožování.....	12
3.4.2	Pohlavní rozmnožování	12
3.5	Vývojová stadia	13
3.5.1	Cysty	13
3.5.2	Nauplius	13
3.5.3	Zoea.....	14
3.6	Využití.....	14
4	Použité rostliny.....	17
4.1	<i>Salvia officinalis</i> L.....	17
4.1.1	Taxonomické zařazení.....	17
4.1.2	Morfologický popis a obsahové látky	17
4.1.3	Účinky a užití.....	18
4.2	<i>Apium graveolens</i> L.....	20
4.2.1	Taxonomické zařazení.....	20
4.2.2	Morfologický popis a obsahové látky	20
4.2.3	Účinky a užití.....	21

4.3	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	23
4.3.1	Taxonomické zařazení.....	23
4.3.2	Morfologický popis a obsahové látky	23
4.3.3	Účinky a užití.....	25
4.4	<i>Evodia rutaecarpa</i> Benth.....	26
4.4.1	Taxonomické zařazení.....	26
4.4.2	Morfologický popis a obsahové látky	26
4.4.3	Účinky a užití.....	27
4.5	<i>Zanthoxylum nitidum</i> Roxb.....	28
4.5.1	Taxonomické zařazení.....	28
4.5.2	Morfologický popis a obsahové látky	28
4.5.3	Účinky a užití.....	29
4.6	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.....	31
4.6.1	Taxonomické zařazení.....	31
4.6.2	Morfologický popis a obsahové látky	31
4.6.3	Účinky a užití.....	33
5	Testované alkaloidy	35
5.1	Galanthamin	35
5.1.1	Popis	35
5.1.2	Účinky a užití.....	35
5.2	Huperzin A.....	37
5.2.1	Popis	37
5.2.2	Účinky a užití.....	37
6	Praktická část	39
6.1	Použitý materiál	39
6.1.1	Testovaný organismus	39
6.1.2	Látky	39

6.1.3	Pomůcky a přístroje	39
6.2	Pracovní postup.....	40
6.2.1	Příprava vodných extraktů.....	40
6.2.2	Příprava mořské vody	41
6.2.3	Líhnutí artemií.....	41
6.2.4	Test toxicity přírodních látek a vyhodnocení.....	41
7	Výsledky	43
7.1	Toxicita vodného extraktu <i>Salviae folium</i>	43
7.2	Toxicita vodného extraktu <i>Apii semen</i>	44
7.3	Toxicita vodného extraktu <i>Coptidis rhizoma</i>	45
7.4	Toxicita vodného extraktu <i>Evodiae fructus</i>	46
7.5	Toxicita vodného extraktu <i>Zanthoxyli radix</i>	47
7.6	Toxicita vodného extraktu <i>Ziziphi fructus</i>	48
7.7	Toxicita galantaminu a huperzinu A.....	48
7.8	Toxicita standardu MnCl ₂ (pro ověření správného průběhu testu)....	49
8	Závěr	50
9	Diskuse.....	51
10	Citovaná literatura	55
11	Seznam zkratk.....	61
	Abstrakt.....	62
	Abstract.....	63

1 Úvod

1.1 Biologická aktivita

Biologická aktivita je schopnost látek, změnit jednu nebo více chemických nebo fyziologických funkcí buňky, tkáně, orgánu nebo celého organismu. Biologická aktivita není určena pouze fyzikální a chemickou strukturou látek, ale také jejich koncentrací a délkou trvání expozice. Může mít také tzv. dominový efekt, to znamená, že změna jedné funkce naruší normální aktivitu jedné nebo více dalších funkcí. [1] V případě této diplomové práce rostlinných extraktů vybraných drog používaných v tradiční čínské medicíně a izolovaných alkaloidů, které mají schopnost inhibovat enzym acetylcholinesterázu.

Biotesty s žábřonožkami jako testujícím organismem jsou snadnou metodou pro testování toxicity přírodních látek, kromě toho mohou být také indikátory pro potenciální protinádorovou, antifugální a insekticidní aktivitu látek. Mechanismus toxického působení není přesně známý, ale výsledky korelují s mnohem specifitějšími testy biologické aktivity. Testy s žábřonožkami patří mezi atraktivní metody pre-screeningového hodnocení tohoto působení přírodních látek. Díky své nenáročnosti a nízkým nákladům může být testováno velké množství látek v relativně krátkém čase. [2]

1.2 Tradiční čínská medicína

Pro hodnocení biologické aktivity přírodních látek byly v případě této diplomové práce použity vodné extrakty rostlin, které nachází své uplatnění v tradiční čínské medicíně.

Tradiční čínská medicína je celostní léčebný systém známý téměř 5000 let. Mezi její hlavní pilíře patří teorie jinu a jangu a teorie pěti prvků, které vychází ze starodávné čínské filozofie. Tradiční čínská medicína klade důraz na podrobnou individuální diagnostiku. Pak se podle činnosti všech vnitřních orgánů, emoční zátěže a zdravotní historie pacienta usuzuje jeho zdravotní stav. Při léčení se zaměřuje nejen na nemoc, ale i na pacientovu konstituci. Díky těmto poznatkům je pak možné připravit každému pacientovi léčbu na míru. [3] [4]

Mezi jednu z oblastí tradiční čínské medicíny patří fytotherapie. Léčivé směsi bývají připravovány z 5 – 20 drog. Nejčastěji se používají ve formě odvarů. Dále je

možné se setkat s práškem namletým z drog, se sirupy, tabletami nebo pokroutkami, tzv. wan. Fytoterapie v tradiční čínské medicíně nepředstavuje alternativní metodu léčby, ale jedná se o plnohodnotnou alternativu západní terapie. [3] [4]

1.3 Alzheimerova choroba

Izolované alkaloidy, které byly v této práci testovány, mají schopnost inhibovat enzym acetylcholinesterázu. Látky s tímto mechanismem účinku se využívají při terapii Alzheimerovy demence.

Alzheimerova choroba je typ demence, která způsobuje problémy s myšlením, pamětí a chováním. Jedná se o nejčastější typ demence, vyskytuje se v 60 – 80% případů všech demencí. Postihuje hlavně lidi starší 65-ti let. Symptomy se obvykle rozvíjí pozvolna a postupně se zhoršují, až zasahují do běžných denních činností. Mezi časné symptomy patří obtížné vzpomínání na nedávno získané informace, postupně se přidává desorientace, změny chování a nálady, zmatek v čase i prostoru, neopodstatněná nedůvěra ve vlastní rodinu a přátele a potíže s mluvením, polykáním a chůzí. [5] Příčina onemocnění není přesně známá, zřejmě se jedná o kombinaci genetických faktorů, životního stylu a životního prostředí. Účinky na mozek jsou ale jasné, nemoc poškozuje a zabíjí mozkové buňky. V mozkové tkáni je pak možné pozorovat dva typy abnormalit – plaky β -amyloidu a shluky proteinu tau. [6]

V současné době neexistuje žádná léčba, která by dokázala Alzheimerovu demenci vyléčit, pouze zpomaluje progresi onemocnění. Používají se inhibitory acetylcholinesterázy a to donepezil, galanthamin a rivastigmin. Ty zvyšují hladinu neurotransmiteru acetylcholinu, kterého je v mozku při Alzheimerově chorobě nedostatek a zlepšují tak kognitivní symptomy onemocnění. [6] Dalším léčivem s rozdílným mechanismem účinku je memantin. Působí jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. [7]

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možnou akutní toxicitu vodných extraktů vybraných rostlinných drog naší flóry a rostlin, které se využívají v tradiční čínské medicíně a dvou izolovaných alkaloidů a u těchto látek stanovit LC₅₀. Mezi vybranými rostlinami byly *Salvia officinalis*, *Apium graveolens*, *Coptis chinensis*, *Evodia rutaecarpa*, *Zanthoxylum nitidum* a *Ziziphus jujuba*, z alkaloidů byly testovány galantamin a huperzin A. Pro testování byl použit mořský korýš *Artemia salina*, protože je snadno komerčně dostupný, je dostatečně citlivý a z těchto důvodů má potenciál pro využití ve screeningovém testování toxicity.

3 Testující organismus

3.1 Taxonomické zařazení

říše: *Animalia* (živočichové)

kmen: *Arthropoda* (členovci)

třída: *Crustacea* (korýši)

řád: *Anostraca* (žábřonožky)

čeleď: *Artemiidae* (žábřonožkovití)

rod: *Artemia* (žábřonožky)

druh: *Artemia salina* (žábřonožka solná) [8]

3.2 Stavba těla

Artemia je typický primitivní korýš s článkovaným tělem. Délka těla dospělých samců je obvykle 8 - 10 mm, u dospělých samic pak 10 - 12 mm. Šířka těla obou pohlaví včetně končetin je asi 4 mm. Tělo je rozdělené na hlavu, hrud' a zadeček. [9]

Hlavovou část tvoří 6 článků a představuje nejvíce specializovanou část těla. Jsou zde umístěny končetiny se specializovanou funkcí, smyslová a nervová tkáň. Žábřonožky mají 2 složené oči s fotoreceptory. Mezi očima se nachází *labrum*, ústní část, která je relativně velká, pružná a svalnatá. V hlavové části je lokalizován pár tykadel, těmi se odlišují dospělí samci od samic. [9]

Hrud' je tvořena 11 segmenty. Ke každému článku je klouby připojen pár končetin. Končetiny jsou využívány při pohybu, osmoregulaci, dýchání a příjmu potravy.

Na hrudní část navazuje zadeček, který je složen z 8 článků. První článek je přeměněn na gonopody, u samců jde o párový penis, u samic pak o vaječný vak. [9] [10]

3.3 Orgánové soustavy

Trávicí soustava je jednoduchá trubice vedoucí po celé délce těla. Ústa jsou lokalizována uprostřed hlavové části. Střevo je obklopeno hemocelem, do kterého přechází živiny přes tenkou stěnu střeva. Je ukončena konečníkem v zadečkové části těla. [11]

Potravou pro artemie ve volné přírodě jsou mikořasy, bakterie, prvoci a detrit. V domácích chovech je možné žábřonožky přikrmovat pekařským droždím nebo mikrořasami. [12]

Oběhová soustava je, typicky pro koryše, otevřená, to znamená, že se krevní buňky rozlévají volně po těle a omývají orgány. Krevní buňky artemií se nazývají hemocyty, mají améboidní tvar, obsahují relativně malé jádro a cytoplasma je vyplněna granulemi. [9]

Osmoregulace je zajišťována dýchacím a vylučovacím systémem. Dýchací plyny jsou vyměňovány přes propustnou plochu phylopod, končetin se specializovanou funkcí. Dusík je vylučován jako amoniak přes plochu phylopod. [11]

Nervová soustava je tvořena mozkiem uloženým v zádové části hlavy, párovými kruhovými nervy a párovými ganglii.

Naupliové oko je součástí smyslové soustavy. Objevuje se v časných larválních stádiích, je zachováno po celou dobu života žábřonožky a je důležité pro orientaci podle světla. *Artemia* má dvě složené oči tvořené mnoha *ommatidii*. [9] [11]

Gonády u obou pohlaví jsou trubicovité a párové, jsou lokalizovány v hrudní a zadečkové části. Samičí rozmnožovací soustava je tvořena párem vaječníků a vejcovodů vedoucích do vaječného vaku. Samčí pohlavní soustava je složena z páru varlat, chámovodů a penisu. [9] [11]

3.4 Rozmnožování

Artemie se mohou rozmnožovat dvěma způsoby: pohlavně, nebo nepohlavně, to znamená partenogenezi.

3.4.1 Nepohlavní rozmnožování

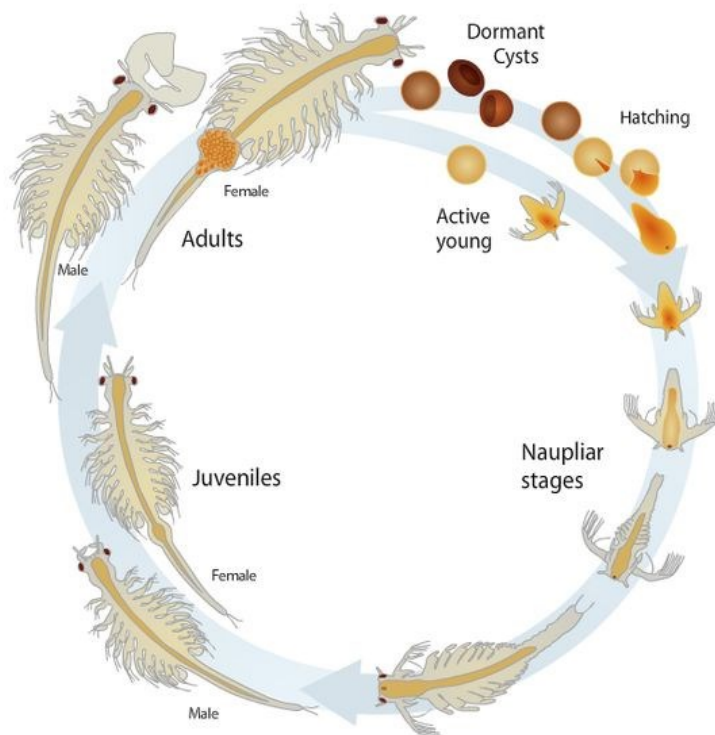
Partenogeneze je způsob nepohlavního rozmnožování, kdy není potřebné oplodnění vajíčka samčími pohlavními buňkami. Tento jev se vyskytuje tam, kde jsou podmínky pro život stálé a neměnné. Při partenogenetickém rozmnožování je produkován větší počet samiček než samců. [13]

3.4.2 Pohlavní rozmnožování

Při pohlavním rozmnožování klade samička vajíčka do vaječných vaků. Pokud jsou podmínky pro rozmnožování nepříznivé, dochází k pozastavení vývoje vajíčka

a vznikají cysty. Cysty jsou tvořené tvrdou skořápkou, mají mimořádnou životaschopnost a značnou odolnost vůči vnějším vlivům. [12]

Pokud jsou podmínky příznivé, z cyst se vylíhnou larvy, nazývané nauplie. Během vývoje projdou artemie 14 až 17 různými stádii. Každé stadium je od následujícího odděleno svlékáním exoskeletu a růstem nového většího. Když jsou podmínky pro vývoj ideální, může žábřonožka dosáhnout dospělého stavu za pouhých 8 dní, běžná doba vývoje je ale 3 až 6 týdnů. [14]



Obr. 1 Životní cyklus *Artemia salina* ©[15]

3.5 Vývojová stadia

3.5.1 Cysty

Cysty se nachází ve vývojovém stadiu gastruly. Tak mohou přežít i několik let. Cysty jsou velmi malé, v průměru 0,2 – 0,25 mm. Po zlepšení životních podmínek absorbují cysty snadno a rychle vodu a začíná vývoj a růst jedince. Za jeden až dva dny se z cysty prasknutím vylíhne larva žábřonožky. [14]

3.5.2 Nauplius

Nově vylíhnutá larva nevypadá jako dospělá žábřonožka. Je to v podstatě hlava schopná plavat s malým nevyvinutým trupem. Mladý nauplius je živěn žloutkem

uloženým v buňkách těla. Během několika dní se vyvine trávicí systém a larva začíná přijímat potravu. Naupliové oko zajišťuje pohyb za světlem. Během dalšího vývoje začínají naupliím vyrůstat pádlovité končetiny nazývané *thoracopoda*. Je započat vývoj složených očí umožňujících vidění. [14]

3.5.3 Zoea

Stadium zoey je nazýváno také jako post-larvální stadium. Jedinci vypadají jako malí dospělci. Thoracopody se stávají plně funkčními, to znamená, že zajišťují přísun potravy, dýchání a plavání. V pozdějších stupních vývoje jsou již patrné rozdíly mezi pohlavími. [14]

3.6 Využití

Nejvýznamnější využití artemií je v akvaristice a chovu ryb jako jejich potrava. Výhodou je, že mohou být použity jako krmivo již po jednodenní inkubaci. Jsou bohaté na živiny a díky malé velikosti je s nimi snadná manipulace.

Další uplatnění žábřonožek je jako modelový organismus při toxikologických zkouškách, díky své poměrně vysoké citlivosti. [16] Při testování se používají i z toho důvodu, že jejich odchov je jednoduchý a levný, nejsou náročné na živiny a dokážou se přizpůsobit změnám teploty a salinity. Artemie se mohou používat samostatně, jako jediný druh v testu, nebo v kombinovaných studiích společně s jinými druhy organismů. [17]

Různé obměny biotestů s žábřonožkami se používají pro hodnocení akutní a někdy také chronické toxicity mnohých anorganických a organických látek, včetně rostlinných extraktů. [18]

Dnes se ke stanovování toxicity často využívají komerčně vyráběné sety. Pro testování toxicity na artemiích je dostupný ARTOXKIT M. Set obsahuje všechny potřebný materiál potřebný pro testování včetně cyst artemií. Mezi další výhody setu patří jednoduchost, rychlost, citlivost a cenová přijatelnost. Destička s 24 jamkami se naplní roztoky ve stanovené koncentrační řadě od nejnižší koncentrace po nejvyšší, přičemž první sloupec jsou jamky kontrolní naplněné pouze vodou. Poté se do každé jamky napipetuje 10 cyst a destička se vloží do inkubátoru. Vyhodnocení testu se provádí po 24 hodinách. Hodnotí se LC₅₀. [19]

Rajabi a kolektiv provedli test toxicity nanočástic. Běžně se pro stanovení toxicity nanočástic používá MTT test, ale je to zdlouhavá a drahá metoda.

Výsledkem studie bylo porovnání MTT testu a testu s artemií. Několik nanočástic bylo testováno oběma metodami. Po porovnání výsledků testů nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi testy. Studie tak prokázala, že test s žábřonožkami může být použit pro hodnocení toxicity nanočástic. [20]

V jiné práci byly testovány nanočástice nevalného železa (Fe^0). Nanočástice byly připraveny chemickou a biologickou syntézou. Akutní toxicita byla hodnocena ve čtyřech intervalech, po 24, 48, 72 a 96 hodinách expozice, a ve třech různých koncentracích nanočástic, 1, 10 a 100 mg/l. Výsledky studie neukázaly významné rozdíly v toxicitě mezi chemicky a biologicky připravenými nanočásticemi železa. Nejtoxikálněji na žábřonožky působily nanočástice v koncentraci 100 mg/l po 96 hodinách expozice. Životaschopnost artemií zde byla $10 \pm 0,58\%$. Koncentrace nanočástic 1 mg/l po 24 hodinách expozice pro artemie naopak toxická nebyla. [21]

Mnoho studií bylo zaměřeno na testování toxicity extraktů rostlinných drog v různých částech světa. V jedné z prací bylo využito pro testování 211 methanolových extraktů získaných z rostlin typicky rostoucích v lesích severozápadního Pacifiku. 17 extraktů vykazovalo po 24 hodinovém působení silnou toxicitu ($\text{LC}_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$). Nejtoxikálněji působil extrakt získaný z kořene *Angelica arguta* s $\text{LC}_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$. 137 různých extraktů toxických naopak nebylo. [2] Dále byla testována cytotoxická a protinádorová aktivita methanolových extraktů získaných z rostlin endemicky rostoucích v Portoriku. Největší toxicita $\text{LC}_{50} = 23,7 \mu\text{g/ml}$ byla změřena u extraktu z listů *Simarouba tulae*. Naopak 12 testovaných extraktů toxických nebylo, jejich LC_{50} byla vyšší než 200 $\mu\text{g/ml}$. [22] Na univerzitě v Brazílii byla hodnocena biologická aktivita ethanolových extraktů rostlin používaných v lidové medicíně v severovýchodní Brazílii. Celkem jich bylo testováno 8. V této práci byl nejtoxikálnější extrakt získaný z květů *Acmella uliginosa* s $\text{LC}_{50} = 18,76 \mu\text{g/ml}$. Naopak 3 z testovaných extraktů (připravené z natí *Moringa oleifera*, *Justicia pectoralis*, *Equisetum sp.*) byly vyhodnoceny jako netoxické. Jejich LC_{50} byla vyšší než 1000 $\mu\text{g/ml}$. [23] Testy s žábřonožkami byly použity pro stanovení toxicity a antimalarického působení pěti vodných extraktů, které byly připraveny z rostlinných drog využívaných v Keni pro léčbu malárie. Nejnižší LC_{50} (285,8 $\mu\text{g/ml}$) zde měl extrakt kořene *Azadirachta indica*. To je považováno za nízkou toxicitu. Extrakty z kůry *Tamarindus indica* ($\text{LC}_{50} = 516,4 \mu\text{g/ml}$), kořene

Grewia trichocarpa ($LC_{50} = 545,8 \mu\text{g/ml}$), kořene *Acacia seyal* ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$) a kořene *Dicrostachys cinerea* ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$) byly vyhodnoceny jako téměř netoxické. Antimalarické působení těchto extraktů bylo stanovováno *in vivo* na myších infikovaných *Plasmodium berghei*. Ve srovnání extraktů s chlorochinem mají zanedbatelnou antimalarickou aktivitu. [24] U 30 vodných extraktů připravených z vybraných rostlinných drog flóry východní Nicaraguy byla testována jejich biologická aktivita. V této práci byly změřeny všechny hodnoty LC_{50} vyšší než $1000 \mu\text{g/ml}$, proto jsou považovány za netoxické. [25]

4 Použité rostliny

4.1 *Salvia officinalis* L.

4.1.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Lamiales* (hluchavkotvaré)

čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité)

rod: *Salvia* (šalvěj)

druh: *Salvia officinalis* L. (šalvěj lékařská) [26]

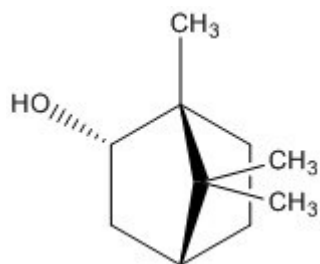


Obr. 2 *Salvia officinalis* © [27]

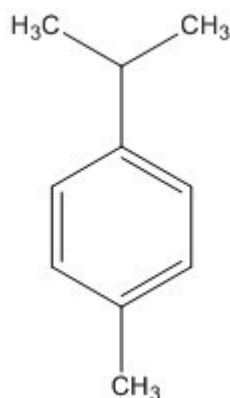
4.1.2 Morfologický popis a obsahové látky

„Šalvěj lékařská tvoří vytrvalé silně aromatické polokeře. Lodyhy jsou rovnoměrně olistěné a šedoplstnaté. Řapíkaté listy mají podlouhle vejčitou šedoplstnatou čepel. Květy mají pouze dvě tyčinky. Plodem je tvrdka.

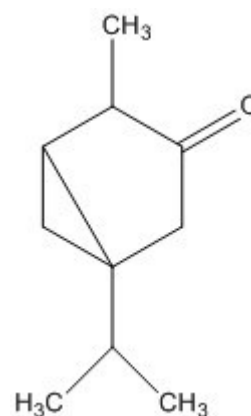
Lékopisnou surovinou je *Salviae officinalis folium* a *Salviae herba*. Rostlina obsahuje značné množství silice složené z terpenových složek – thujonu, borneolu, cymolu, také trísloviny, hořčiny a flavonoidy.“ [26]



Obr. 3 borneol



Obr. 4 cymol



Obr. 5 thujon

4.1.3 Účinky a užití

„Vnitřně se užívá při trávicích poruchách s kolikami, při nedostatečné tvorbě žaludeční šťávy, při nechutenství, infekcích zažívadel a zánětech sliznic. Další osvědčené využití je při mentálním a fyzickém vyčerpání (zklidňující účinek). Vodný a alkoholový extrakt snižuje nadměrnou potivost. Zevně se droga užívá k výplachům úst a kloktání při infekčních zánětech, při angíně nebo na hnisavé rány, nehojící se kožní defekty, záněty rtů (protizánětlivý, adstringentní a antiseptický účinek).“ [28]

S šalvějovým extraktem byla provedena dvojitě zaslepená, randomizovaná, placebem kontrolovaná klinická studie u pacientů s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou v počátečních stádiích. Výsledkem bylo změření ADAS-cog score (Alzheimer's Disease Assessment Scale, kognitivní test používaný v klinických studiích) a CDR score (Clinical Dementia Rating Scale, dotazník k určení stupně demence). Studie trvala 16 týdnů, na začátku nebyly ve výsledcích testů žádné významné rozdíly mezi skupinou užívající extrakt a skupinou užívající placebo. U pacientů užívajících extrakt bylo pozorováno významné snížení ADAS-cog již po 4 týdnech léčby, snížení CDR score se projevilo po 8 týdnech léčby. K ověření platnosti výsledků studie je nutné provést další testování. To zatím provedeno nebylo, nebo jeho výsledky nejsou dostupné. [29]

V jiné dvojitě zaslepené, randomizované, placebem kontrolované klinické studii byl testován antihyperlipidemický efekt šalvějového extraktu. Měřenými parametry zde byly celkový cholesterol, triglyceridy, VLDL, LDL a HDL cholesterol,

kreatinin a jaterní enzymy (AST, ALT). Při počátečním měření nevykazovaly hodnoty žádné významné rozdíly mezi skupinami pacientů, kromě hodnoty triglyceridů. Skupina užívající šalvějový extrakt měla před zahájením studie hodnoty triglyceridů vyšší než skupina užívající placebo. Po 2 měsících byly zjištěny nižší hodnoty celkového cholesterolu, triglyceridů, VLDL a LDL cholesterolu a vyšší hodnoty HDL cholesterolu u skupiny, která užívala extrakt. Na hodnoty ALT, AST a kreatininu nemělo užívání extraktu žádný významný vliv. [30]

Následně byla provedena randomizovaná placebem kontrolovaná klinická studie zabývající se zlepšením glykemické kontroly a lipidového spektra u pacientů s diabetem 2. typu, kteří užívají šalvějový extrakt. Sledovanými parametry zde byly glykémie, glykovaný hemoglobin, celkový cholesterol, triglyceridy, LDL a HDL cholesterol, kreatinin, ALT a AST. Studie trvala 3 měsíce. Potvrdily se výsledky předchozí studie. Hodnoty glykémie a glykovaného hemoglobinu byly u skupiny užívající extrakt naměřené nižší než u pacientů užívajících placebo. [31]

4.2 *Apium graveolens* L.

4.2.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Araliales* (aralkotvaré)

čeleď: *Apiaceae* (miříkovité)

rod: *Apium* (celer)

druh: *Apium graveolens* L. (celer vonný) [26]

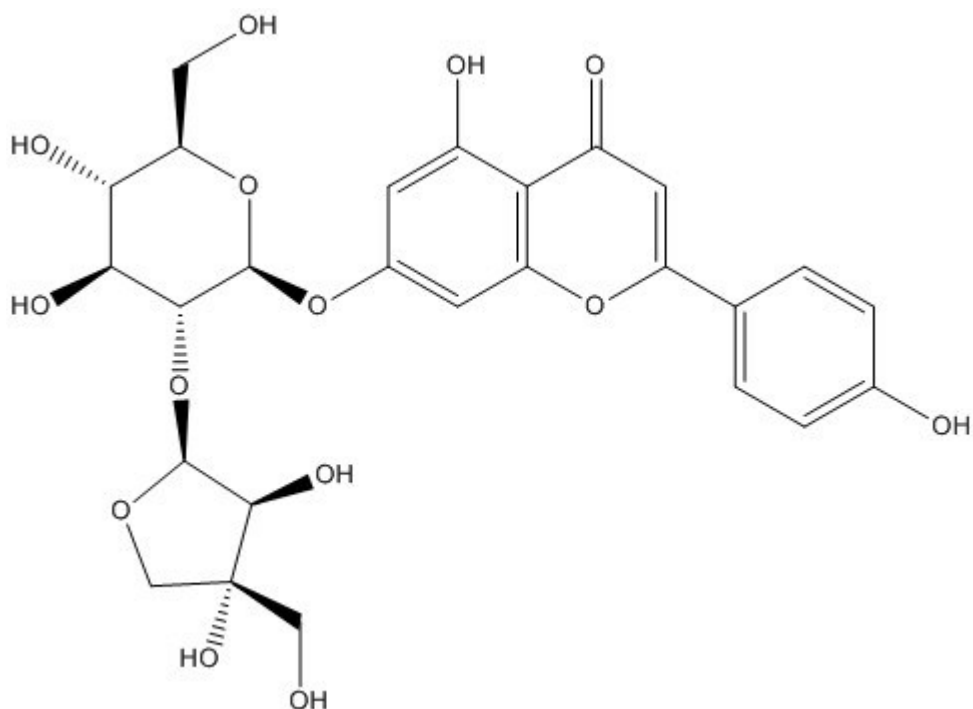


Obr. 6 *Apium graveolens* ©[32]

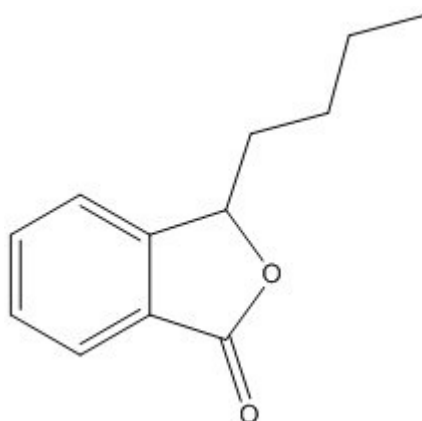
4.2.2 Morfologický popis a obsahové látky

Celer je dvouletá rostlina se sekrečními buňkami ve všech vegetativních částech a oplodí. První rok vyrůstá podzemní bulva a listy kořenité vůně. Druhý rok pak z bulvy vyrostou lodyhy nesoucí květenství. Květenství je tvořeno složeným okolíkem z okolíčků. Plodem je rozpadavá dvounažka.

Rostlina je bohatá na silice ftalidového typu (3-butyftalid), mezi další obsahové látky patří flavonoid apiin, vitamin C a minerální soli. [26] [33]



Obr. 7 apigen



Obr. 8 3-butylfthalid

4.2.3 Účinky a užití

Největší využití má celer jako zelenina. V tradiční medicíně se využívá pro svůj diuretický a antirevmatický účinek. [26]

Vodný extrakt z listů celeru byl testován na vliv na spermatogenezi u zdravých samců myši. Myši byly rozděleny do 3 skupin, 1. – kontrolní skupina - dostávala destilovanou vodu, 2. a 3. skupina dostávala 100 mg/kg/den, resp. 200 mg/kg/den extraktu po dobu 30-ti dní. Výsledky studie ukázaly zvýšení počtu semenotvorných kanálek, spermatocytů, spermatogonií a spermíí u skupiny 2 a 3, ale významný

rozdíl v počtu buněk byl pouze u třetí skupiny. Objem varlat byl značně zvětšen u obou testovaných skupin, jejich váha ale byla výrazněji zvýšena jenom u skupiny č. 3. [34]

Podle výsledků výzkumu vědců z čínské univerzity v Taianu má celerový extrakt schopnost *in vitro* inhibovat lidské nádorové BGC-823 buňky žaludku. Inhibice buněk je zprostředkována apoptózou přes mitochondrie, míra účinku apoptózy závisí na koncentraci a čase působení extraktu. [35]

4.3 *Coptis chinensis* Franch.

4.3.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Ranunculales* (pryskyřníkotvaré)

čeleď: *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)

rod: *Coptis* (koptis)

druh: *Coptis chinensis* Franch. (koptis čínský) [26]

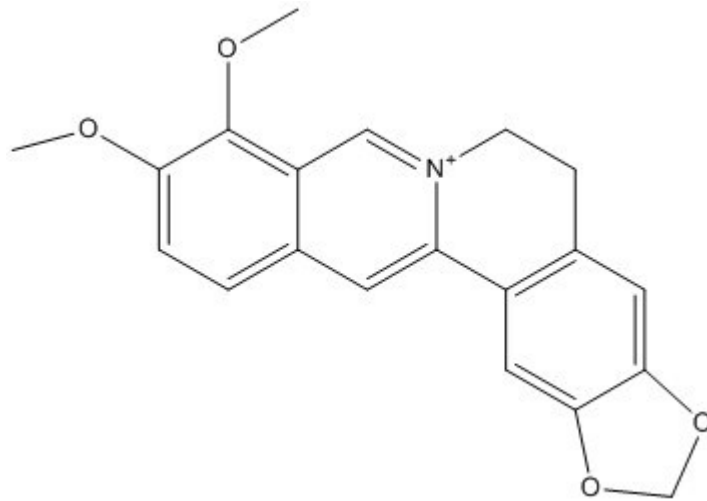


Obr. 9 *Coptis chinensis* © [36]

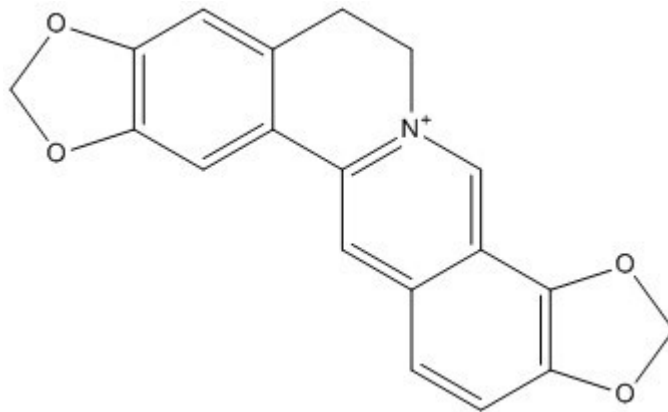
4.3.2 Morfologický popis a obsahové látky

Koptis je víceletá rostlina 20 – 50 cm vysoká. Listy mají trojhrannou čepel, květenství je vrcholík. Oddenek má na povrchu žlutohnědou barvu, uvnitř je žlutooranžový. Je pokrytý četnými uzlíky a často z něj vyrůstají malé kořínky.

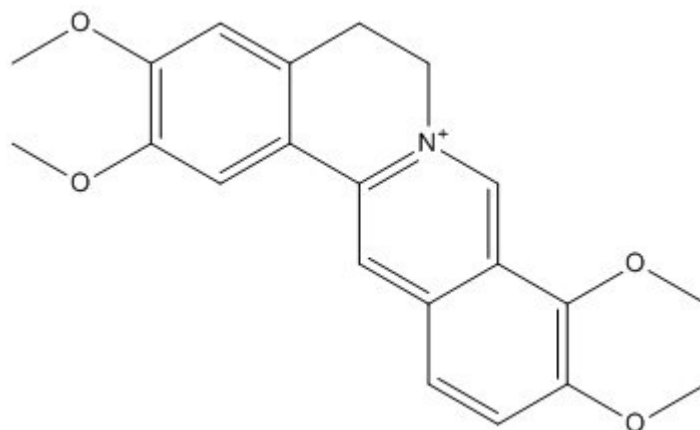
Hlavními obsahovými látkami jsou berberin a další protoberberinové alkaloidy – palmatin, coptisin a berberastin. Charakteristickou obsahovou látkou čeledi pryskyřníkovitých je lakton protoanemonin. [26] [37]



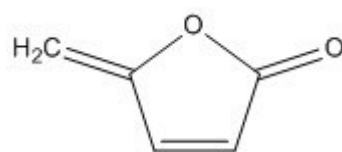
Obr. 10 berberin



Obr. 11 coptisin



Obr. 12 palmatin



Obr. 13 protoanemonin

4.3.3 Účinky a užití

Tradičně je koptis používán ke zmírnění příznaků průjmů, zvracení, úplavice, při bolestivé stolici, při krvácení do stolice a při potížích se žlučníkem. Bylinkáři bývá předepisován jako prostředek ke zlepšení trávení. Také je využíván při léčbě nespavosti a stavech podráždění. Koptis má schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Díky antioxidační a protirakovinné aktivitě je možné použití při různých typech nádorových onemocnění. Pro zlepšení stavu pokožky se používají obklady z koptisu, ve formě kloktadla pomáhá při léčbě bolesti v krku, aft a oteklých dásní. [38]

Na myších byl testován efekt vodného extraktu koptisu při poškození kůže způsobené ozařováním. Myši byly rozděleny do čtyř skupin po pěti jedincích: kontrolní skupina, skupina, která dostávala extrakt, ozářená skupina a skupina, která byla ozářena a léčena. Zvířata byla ozářena β -zářením v dávce 45 Gy. Bylo zjištěno, že při delší době podávání extraktu je ochranný efekt významnější. Pro potvrzení účinku je nutné provést další studie. [39]

Běžně se koptis používá ke zmírnění bolestí břicha a průjmu, ale dosud nebyl znám efekt koptisu na syndrom dráždivého tračníku, proto byla provedena studie na myších. Jedním ze znaků syndromu dráždivého tračníku je opakující se viscerální bolest. Touto studií bylo zjištěno, že extrakt koptisu zmenšuje viscerální bolest snížením produkce serotoninu a vylučováním cholecystokininu ve střevě. [40]

4.4 *Evodia rutaecarpa* Benth.

4.4.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Rutales* (routotvaré)

čeleď: *Rutaceae* (routovité)

rod: *Evodia* (ampák)

druh: *Evodia rutaecarpa* Benth. (ampák routoplodý) [26]

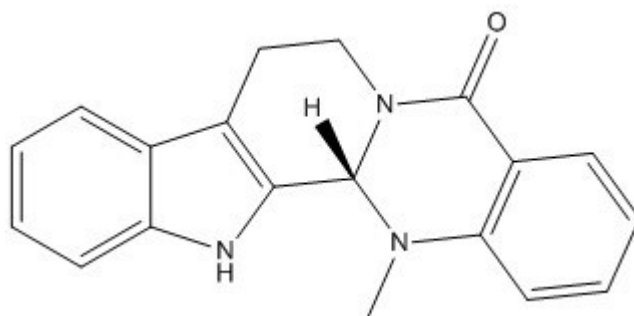


Obr. 14 *Evodia rutaecarpa* © [41]

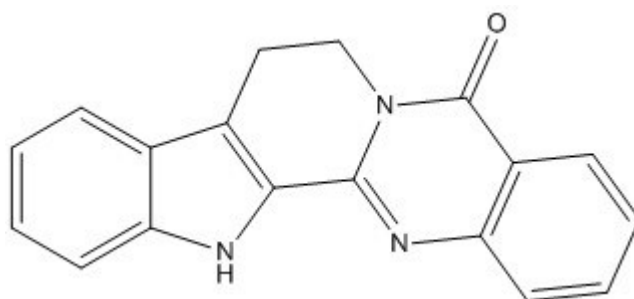
4.4.2 Morfologický popis a obsahové látky

Evodia rutaecarpa je opadavý strom s velkými lesklými listy a bílými až červenými květy. Dorůstá do výšky okolo 9-ti metrů. Plody jsou vrásčité, mají silné aroma. Sklízají se nezralé pro lékařské účely. [42]

Mezi hlavní obsahové látky evodie patří alkaloidy evodiamin a rutaecarpin. Dále plody obsahují deriváty limoninu – evodin a evodol, které jsou zodpovědné za hořkou chuť. Z plodů byly také izolovány některé flavonoidy a flavonoidní glykosidy např. diosmetin, isorhamnetin nebo 3-O-galaktosid. [43]



Obr. 15 evodiamin



Obr. 16 rutaecarpin

4.4.3 Účinky a užití

Plody ampáku se používají jako analgetikum, antiemetikum a adstringens při léčbě bolesti hlavy, břišní kolice a epigastrické bolesti. Vnější aplikace ampáku se využívá při léčbě ústních vředů a hypertenzi. [43]

Na myších byla provedena studie, která hodnotila účinnost ampákového extraktu proti průjmu. Průjem byl vyvolán podáním ricinového oleje. Výsledky studie ukázaly, že účinnost je závislá na dávce extraktu, největší protiprůjmový efekt byl po 15 minutách po podání extraktu a trval 45 minut. [44]

Vodný, methanolový a ethanolový extrakt ampáku byly testovány pro potencionální antinociceptivní aktivitu. Studie byla provedena na myších obou pohlaví. Bolestivé podněty byly myším způsobovány intraperitoneálním podáváním 1% kyseliny octové. Výsledky studie byl prokázán analgetický efekt mezi 35 a 56%, přičemž nejvyšší efekt měl ethanolový extrakt, nejnižší pak vodný extrakt. [45]

4.5 *Zanthoxylum nitidum* Roxb.

4.5.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Rutales* (routotvaré)

čeleď: *Rutaceae* (routovité)

rod: *Zanthoxylum* (žlutodřev)

druh: *Zanthoxylum nitidum* Roxb. [26]

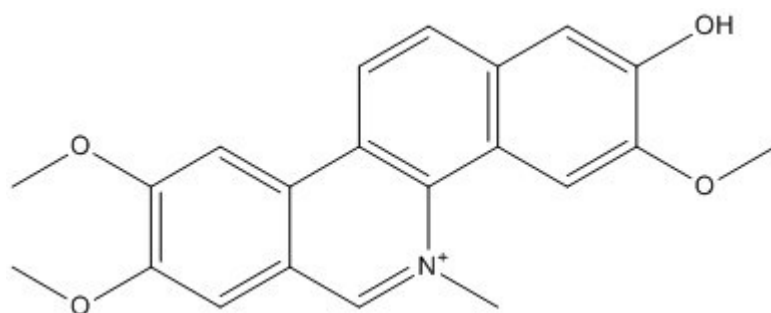


Obr. 17 *Zanthoxylum nitidum* © [46]

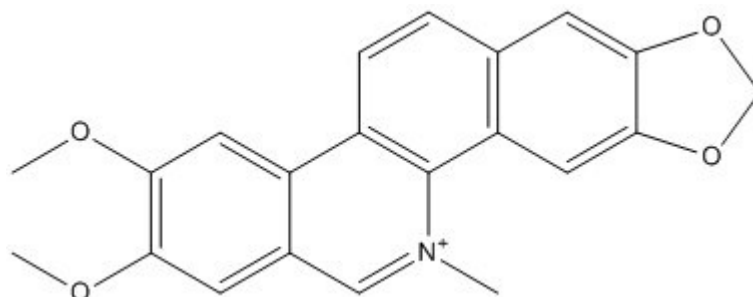
4.5.2 Morfologický popis a obsahové látky

Žlutodřev je aromatický popínavý keř volně rostoucí v deštných pralesech. Kůra je světle hnědá, hladká a tenká, dřevo má světle žlutou barvu. Stonky jsou opatřeny pevnými trny. Lichožpeřené listy vyrůstají ze stonku střídavě. Květenství tvoří 4 – 5 květů uspořádaných do laty. [47]

Hlavními obsahovými látkami jsou alkaloidy benzofenantridinového typu, a to fagaronin a nitidin. [43]



Obr. 18 fagaronin



Obr. 19 nitidin

4.5.3 Účinky a užití

Žlutodřev je využíván pro své analgetické účinky při léčbě traumatických poranění, při revmatických bolestech kloubů a při bolestech břicha a zubů. Externě je používán při léčbě popálenin. [43]

Z ethanolového extraktu kořene žlutodřevu byly izolovány benzofenanthridinové alkaloidy, které byly dále testovány na analgetické a protizánětlivé účinky. Alkaloidy byly testovány na myších. Bolestivé podněty byly indukovány kyselinou octovou, pro hodnocení protizánětlivých účinků byl použit xylenem navozený otok ucha. Výsledky studie prokázaly významný analgetický i protizánětlivý efekt testovaných benzofenanthridinových alkaloidů. [48]

Další studie se zabývala synergistickým působením kumarinů izolovaných z extraktu kořene žlutodřevu a antibakteriálních látek proti methicilin resistantnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA). Čtyři izolované kumariny byly přidávány k antibiotikům a byla stanovována minimální inhibiční koncentrace u každé kombinace. Dle výsledků studie měly nejvýznamnější synergistický účinek proti MRSA kombinace gentamicinu s kumarinem isopimpinellinem,

chloramphenicolu s phellopterinem a minocyklinu s 5-granyloxy-7-methoxykumarinem. [49]

4.6 *Ziziphus jujuba* Mill.

4.6.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (semenné rostliny)

třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné rostliny)

řád: *Rhamnales* (řešetlákotvaré)

čeleď: *Rhamnaceae* (řešetlákovité)

rod: *Ziziphus* (cicimek)

druh: *Ziziphus jujuba* Mill. (cicimek holý) [26]



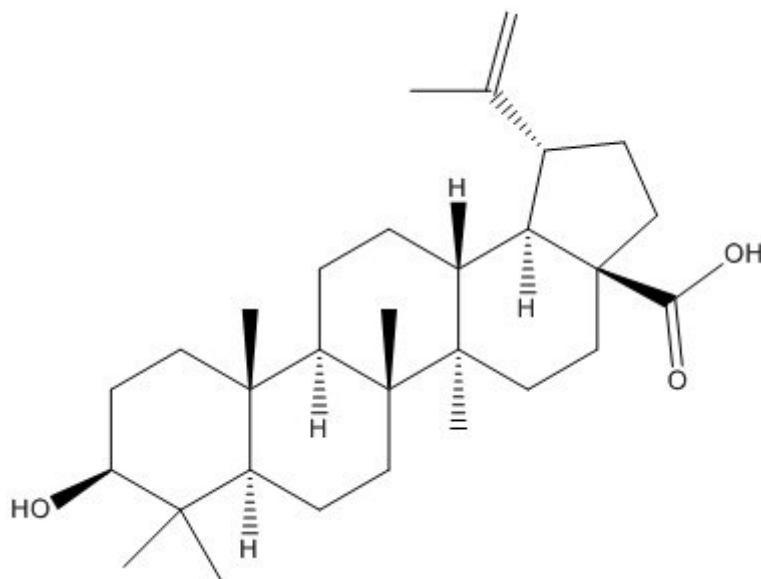
Obr. 20 *Ziziphus jujuba* ©[50]

4.6.2 Morfologický popis a obsahové látky

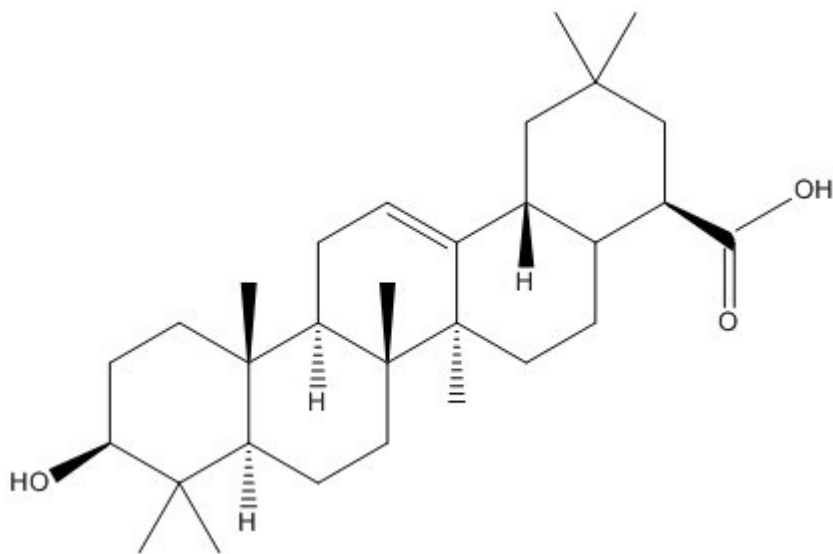
Cicimek je trnitý opadavý keř nebo malý strom dosahující výšky až 10 m. Trny vyrůstají ve skupinách po dvou, jeden z nich je rovný, druhý zahnutý. Oválně kopinaté listy jsou řapíkaté a vyrůstají střídavě. Květenstvím je vrcholík. Plody jsou masité vejčité peckovice, zralé mají červenohnědou barvu. [51]

„V plodech se vyskytují triterpenoidní kyseliny oleanolová, betulinová, ursolová, bílkoviny, sacharidy, sliz, provitamin A, vitaminy B₂ a C a flavonoidy. Semena obsahují triterpenoidní saponiny jujubosid A a B a jejich saponin

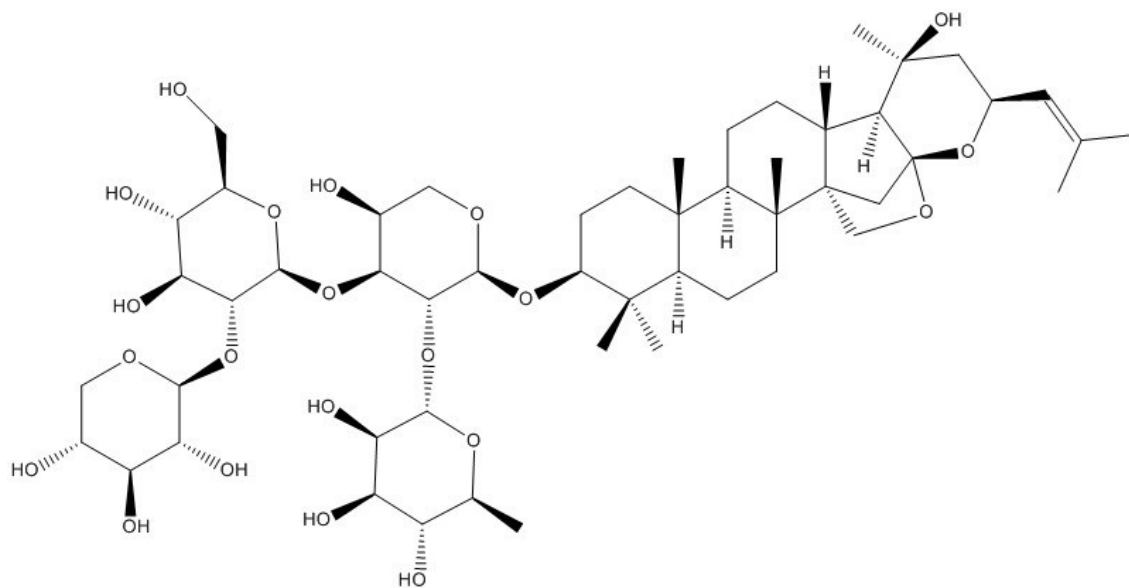
jujubogenin. Zajímavý je obsah triterpenoidního glykosidu ziziphynu, který inhibuje vnímání sladké chuti.“ [52]



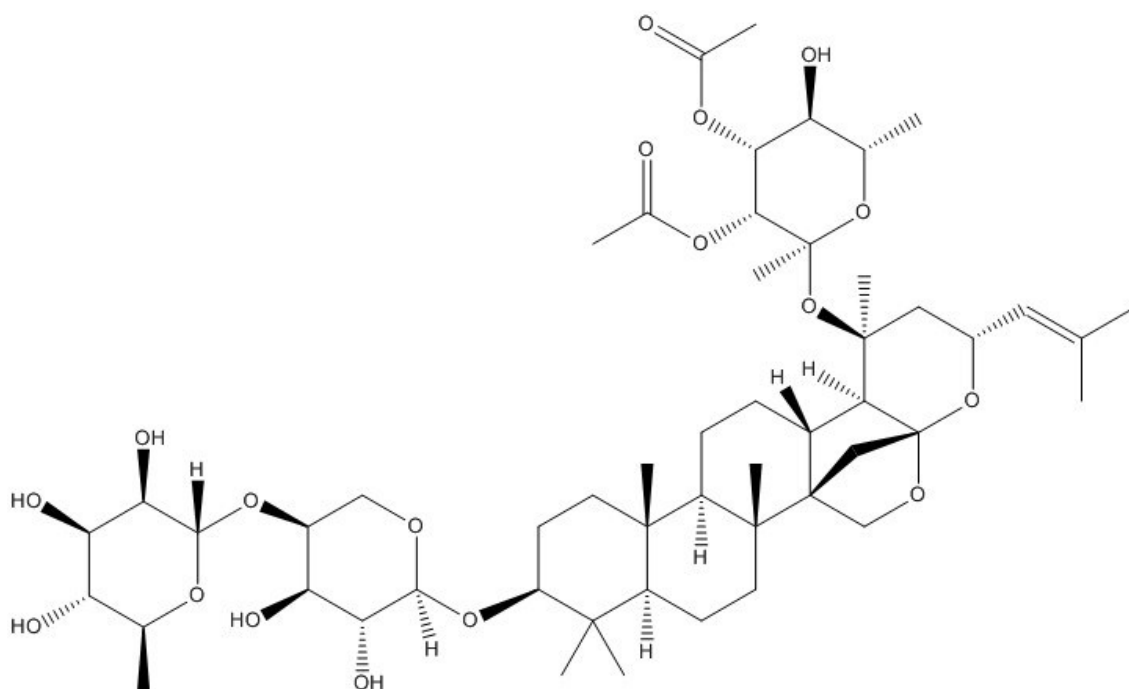
Obr. 21 betulinová kyselina



Obr. 22 oleanolová kyselina



Obr. 23 jujubosid B



Obr. 24 ziziphyn

4.6.3 Účinky a užití

Plody cicimku, známé také jako čínské datle, se používají jako pochutina. Konzumují se čerstvé nebo sušené. V tradiční čínské medicíně se pro své léčebné účinky využívají plody a semena. Jejich hlavní užití je při léčbě nespavosti, únavě, celkové slabosti, fyzickém vyčerpání, hypertenzi a podvýživě. Dále také tlumí kašel, snižují pocení a zpomalují stárnutí. [52]

V placebem kontrolované klinické studii vědců z íránské univerzity byla sledována účinnost cicimkového extraktu při léčbě chronické idiopatické zácpy. Sledovaným parametrem byl čas, za který projde potrava trávicím traktem od úst ke konečníku, tzv. TT test. Výsledky studie prokázaly výraznou změnu ve výsledcích TT testu u skupiny pacientů užívajících extrakt. Většina pacientů užívající placebo studii nedokončila kvůli zhoršujícím se příznakům zácpy. Dalšími studiemi je třeba prokázat dlouhodobou účinnost a bezpečnost užívání extraktu. [53] [54]

V další studii byl hodnocen ochranný efekt vodného extraktu plodu cicimku proti nefrotoxicitě způsobené užíváním ibuprofenu. Účinek byl testován na myších. Podle histologického vyšetření a biochemických parametrů v séru bylo prokázáno, že podáváním extraktu je možné ochránit ledviny před poškozením. Hodnoty antioxidantních enzymů nebyly extraktem nijak ovlivněny. To znamená, že antioxidantní schopnosti cicimku nemají vliv na ochranu ledvin. [55]

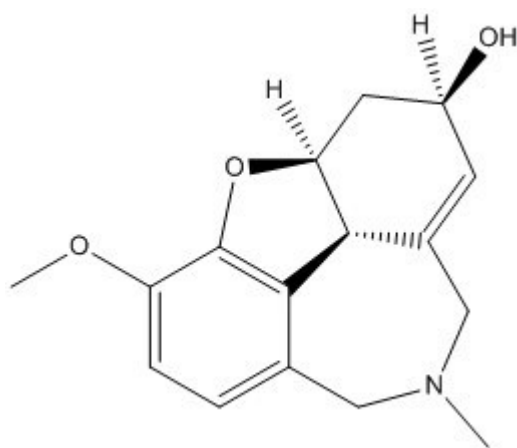
Ethanolický extrakt cicimku byl testován pro své antimikrobiální vlastnosti *in vitro*. Hodnocena byla minimální inhibiční koncentrace (=MIC) extraktu na gram-pozitivní bakterie (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), gram-negativní bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) a houby (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*). Výsledky studie prokázaly dostatečnou antimikrobiální i antifugální aktivitu v nízkých koncentracích extraktu, přičemž nejnižší MIC byla zjištěna u *Escherichia coli*, nejvyšší MIC pak u *Aspergillus fumigatus*. [56]

5 Testované alkaloidy

5.1 Galanthamin

5.1.1 Popis

Galanthamin je alkaloid, který byl izolovaný z cibulí kavkazské sněženky *Galanthus woronowi* a z běžnějšího druhu *Galanthus nivalis*. V malém množství je obsažen i v dalších druzích rostlin např. *Narcissus* sp., *Lycoris* sp.. [51] [57] Galanthamin je terciální amin, má tři chirální centra a je levotočivý. [58]



Obr. 25 Galanthamin

5.1.2 Účinky a užití

Galanthamin má dvojí mechanismus účinku. Jedná se o inhibici acetylcholinesterázy a to tak, že se váže kompetitivně a reverzibilně na aktivní místo acetylcholinesterázy a tím zabraňuje zpětnému vychytávání acetylcholinu. Druhým mechanismem účinku je pozitivní alosterická modulace nikotinových receptorů. Galanthamin způsobí to, že jsou nikotinové receptory citlivější k acetylcholinu. [57] [59]

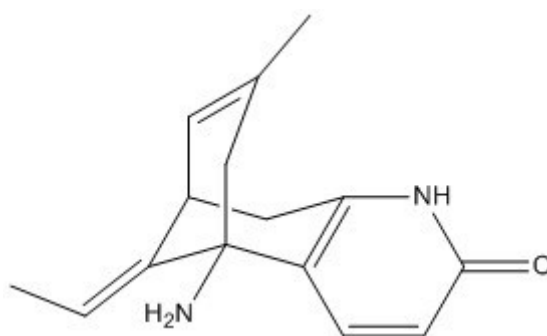
V tradiční medicíně se galanthamin využívá k dlouhodobé léčbě Alzheimerovy nemoci. Má příznivé účinky na celkové, kognitivní i behaviorální symptomy nemoci. V klinických studiích, které byly randomizované, dvojitě zaslepené, kontrolované placebem a probíhaly v různých místech světa, byla prokázána bezpečnost a účinnost galanthaminu u pacientů s lehkou až středně těžkou formou

Alzheimerovy demence. [59] V České republice je v současné době registrován léčivý přípravek s obsahem galanthaminu, a to Galantamin Mylan®. [60]

5.2 Huperzin A

5.2.1 Popis

Huperzin A byl izolován z rostliny *Huperzia serrata*, je možné ho nalézt i v dalších druzích čeledi *Huperziaceae* a v druzích čeledí *Lycopodiaceae* a *Selaginellaceae*. [61] Huperzin A je nenasycený seskviterpenový alkaloid. Je opticky aktivní a přirozeně se vyskytuje izomer (-)-huperzin A. [62]



Obr. 26 Huperzin A

5.2.2 Účinky a užití

Mechanismem účinku huperzinu A je silná kompetitivní a reverzibilní inhibice acetylcholinesterázy. Ve srovnání s ostatními inhibitory acetylcholinesterázy, jako např. takrinem, donepezilem nebo rivastigminem, má huperzin A vyšší nebo stejnou účinnost jako tyto inhibitory. A to z důvodu, že huperzin A inhibuje přednostně tetramerní formu acetylcholinesterázy, která se vyskytuje převážně v savčím mozku. Huperzin A je schopný vázat se na dva hlavní enzymy, a to acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu, ale vyšší afinitu má k acetylcholinesteráze.

Bylo provedeno několik klinických studií zaměřených na účinnost huperzinu A při léčbě Alzheimerovy demence. Většina studií byla dvojitě zaslepená, randomizovaná a kontrolovaná placebem, některé studie byly multicentrické. Účinnost byla hodnocena pomocí paměťových testů, mezi nejčastěji využívané patří MMSE, MQ, ADAS-COG a ADL testy. Výsledky studií prokázaly, že huperzin A má příznivé účinky na kognitivní funkce u pacientů s lehkou nebo středně těžkou formou Alzheimerovy demence. [61]

Další ze studií byla zaměřena na léčbu vaskulární demence. Studie byla randomizovaná, kontrolovaná placebem a dvojitě zaslepená. U pacientů obou skupin byl hodnocen MMSE a CDR test po 4, 8 a 12-ti týdnech léčby. Z výsledků testů vyplývá, že dlouhodobé užívání huperzinu A významně zlepšuje kognitivní funkce u pacientů trpících vaskulární demencí. [63]

6 Praktická část

6.1 Použitý materiál

6.1.1 Testovaný organismus

Pro testování přírodních látek byla použita jednodenní nauplia artemie. *Artemia salina* je primitivní mořský koryš s vysokou citlivostí na změny životních podmínek, používaný při toxikologických zkouškách. Cysty artemií byly dodány společností JBL GmbH & Co. KG.

6.1.2 Látky

- vodné extrakty rostlin *Salvia officinalis*, *Apium graveolens*, *Evodia rutaecarpa*, *Coptis chinensis*, *Zanthoxylum nitidum*, *Ziziphus jujuba*
- hydrobromid galantaminu, Huperzin A (izolované výzkumnou skupinou ADINACO, která působí na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové)
- tetrahydrát chloridu manganatého FLUKA, p. a.
- deionizovaná voda
- mořská voda

6.1.3 Pomůcky a přístroje

- analytické digitální váhy KERN ABJ
- ultrazvuková lázeň SONNOREX DIGITAL 10P BANDELIN
- vakuová odparka
- třepačka VORTEX-GENIE 2
- inkubátor AQUALYTIC
- mikroskop LEICA EZ4 D
- mikrotitrační destička s 96 jamkami
- automatická mikropipeta

6.2 Pracovní postup

6.2.1 Příprava vodných extraktů

Vybraná suchá rostlinná část byla rozlámána a v mixéru rozemleta na hrubý prášek. Tohoto hrubého prášku bylo odváženo přibližně 5 g a byl nasypán do destilační baňky. K rostlinnému materiálu v destilační baňce byla přidána deionizovaná voda o teplotě cca 85°C. Na 1 g suchého materiálu bylo použito 15 ml vody. Destilační baňka pak byla zahřívána na vroucí vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 15 minut. Po sejmutí baňky a usazení drogy byl extrakt zfiltrován tak, aby pevná rostlinná část zůstala v baňce. Do baňky bylo znovu přidáno odměřené množství vody a proces byl opakován. Oba filtráty byly zfiltrovány přes tubus se slabou vrstvou křemeliny. Vzniklý čirý roztok byl odpařen na vakuové odparce za sníženého tlaku. Poté byly baňky s odparky vloženy do vakuového exsikátoru se suchým silikagelem, kde se sušily dva dny. Nakonec, pro homogenizaci extraktu a snadnější vyjmutí z baňky, byl k suchému extraktu přidán pevný CO₂.

Rostlinná droga	Navážka suchého hrubého prášku v g	Hmotnost suchého extraktu v g
<i>Salviae folium</i>	5,01	0,5163
<i>Apii semen</i>	5,03	0,7139
<i>Coptidis rhizoma</i>	4,8	0,9345
<i>Evodiae fructus</i>	3,89	0,6133
<i>Zanthoxyli radix</i>	4,98	0,2357
<i>Ziziphi fructus</i>	5,03	1,82

Tab. 1 Navážky práškových drog a hmotnosti získaných extraktů

6.2.2 Příprava mořské vody

NaCl	PENTA	23,0 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	PENTA	11,0 g
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	PENTA	9,07 g
CaCl ₂	PENTA	2,11 g
KCl	PENTA	0,7 g

Látky byly naváženy v uvedených množstvích, k nim byla doplněna deionizovaná voda do 1000 ml a po úplném rozpuštění pevných látek byla připravena mořská voda vhodná k testování.

Mořská voda obsahovala 6,5 mg/l rozpuštěného kyslíku, její pH bylo $8,0 \pm 0,1$.

6.2.3 Líhnutí artemií

Do Petriho misek s mořskou vodou bylo vloženo dostatečné množství cyst. Misky byly umístěny do inkubátoru, kde byly ponechány 24 hodin při inkubační teplotě 23 ± 2 °C. Poté byla vylíhlá nauplia připravena k testování.

6.2.4 Test toxicity přírodních látek a vyhodnocení

Suchý práškový extrakt byl rozpuštěn za pomoci ultrazvukové lázně a třepačky VORTEX – GENIE 2 v mořské vodě. Z roztoku byla připravena koncentrační řada o 23 koncentracích. Nejvyšší koncentrace byla 25 mg/ml a každá následující byla získána koeficientem ředění 1,5. Vzniklé roztoky byly převedeny do mikrotitračních destiček. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl roztoku. Ve sloupcích destičky byla vždy stejná koncentrace. Poslední, 24. sloupec destičky, byl kontrolní, obsahoval pouze mořskou vodu.

Obdobně byly připraveny koncentrační řady galantaminu a huperzinu A. Nejvyšší koncentrace byla 10 mg/ml, koeficient ředění se rovnal 1,5. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl roztoku.

Aby bylo co nejvíce zamezeno dalšímu ředění roztoků, při testování bylo využito promývacích jamek. První jamka každého sloupce byla vždy promývací. Nejprve bylo do promývací jamky přeneseno z Petriho misek větší množství nauplií. Následně bylo do každé jamky destičky vloženo 10 nauplií. Při přenášení nauplií je důležité postupovat co nejrychleji, aby žábřonožky nebyly vystaveny

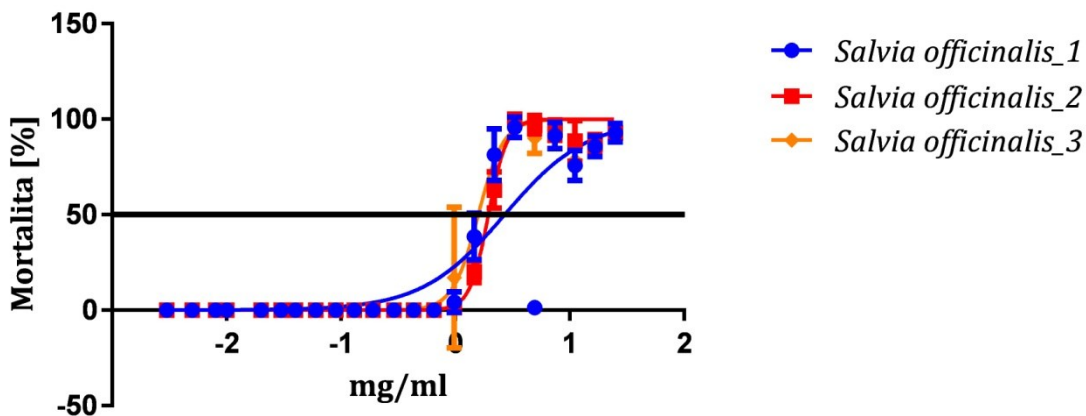
stresu. Destička naplněná nauplii byla přikryta víčkem, vložena na 24 hodin do inkubátoru za tmy při inkubační teplotě 23 ± 2 °C.

Po 24 hodinové inkubační době byl pod mikroskopem pozorován počet uhynulých nauplií v každé jamce, kromě jamek promývacích.

Stanovení jednotlivých látek bylo provedeno vždy třikrát.

7 Výsledky

7.1 Toxicita vodného extraktu *Salviae folium*



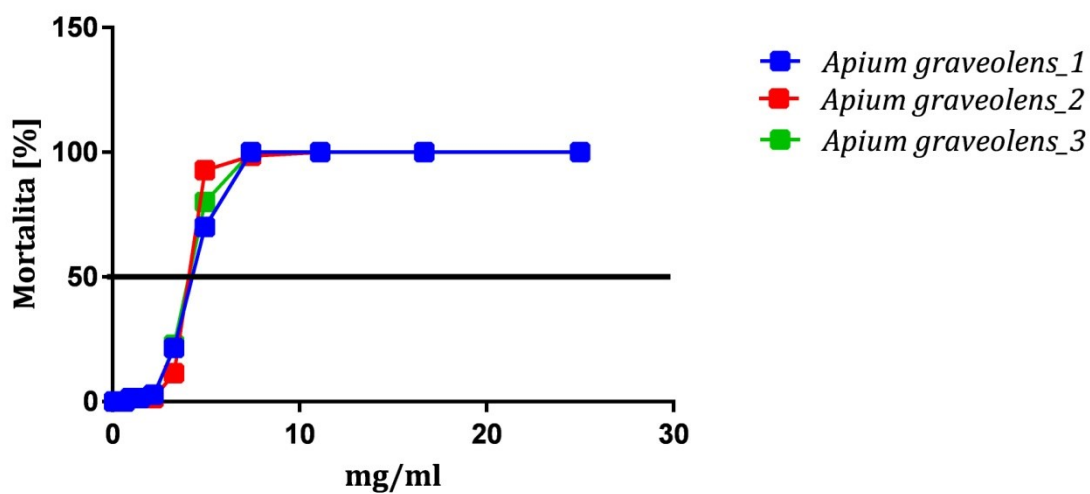
Graf 1 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Salviae folium*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	2,693
2	1,944
3	1,584

Tab. 2 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Salviae folium* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ šalvějového extraktu byla $2,074 \pm 0,462$ mg/ml.

7.2 Toxicita vodného extraktu *Apíi semen*



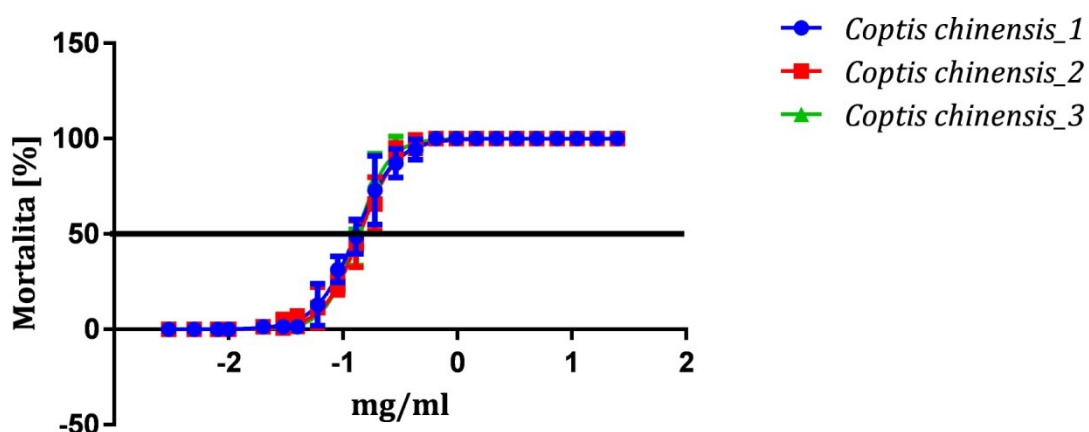
Graf 2 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Apíi semen*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	4,192
2	3,948
3	3,982

Tab. 3 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Apíi semen* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ celerového extraktu byla $4,041 \pm 0,108$ mg/ml.

7.3 Toxicita vodného extraktu *Coptidis rhizoma*



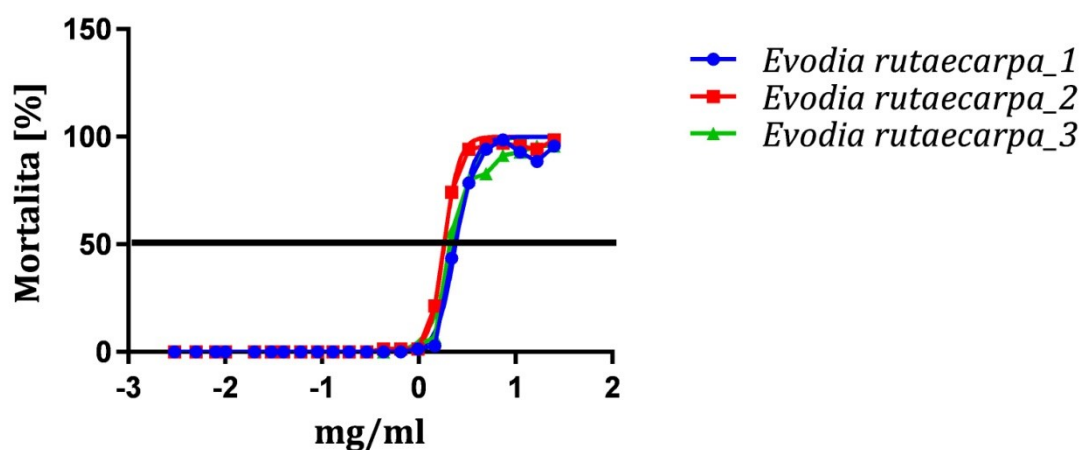
Graf 3 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Coptidis rhizoma*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	0,130
2	0,140
3	0,133

Tab. 4 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Coptidis rhizoma* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ koptisového extraktu byla $0,134 \pm 0,004$ mg/ml.

7.4 Toxicita vodného extraktu *Evodiae fructus*



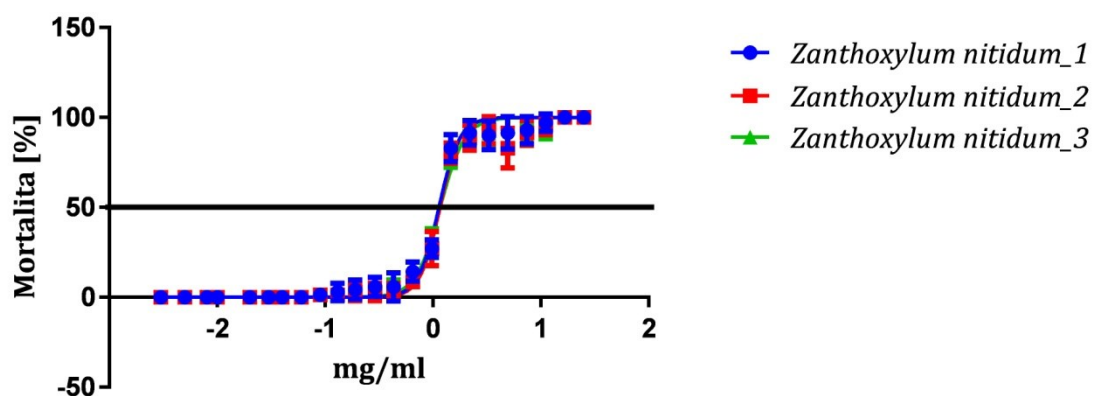
Graf 4 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Evodiae fructus*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	2,405
2	1,831
3	2,263

Tab. 5 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Evodiae fructus* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ ampákového extraktu byla $2,166 \pm 0,244$ mg/ml.

7.5 Toxicita vodného extraktu *Zanthoxyli radix*



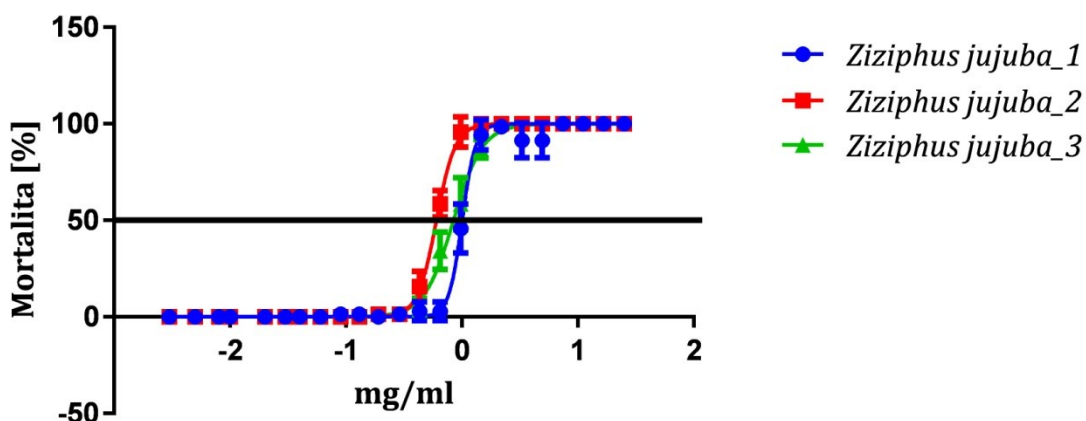
Graf 5 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Zanthoxyli radix*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	1,134
2	1,162
3	1,167

Tab. 6 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Zanthoxyli radix* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ žlutodřevového extraktu byla $1,154 \pm 0,015$ mg/ml.

7.6 Toxicita vodného extraktu *Ziziphi fructus*



Graf 6 Graf závislosti mortality na koncentraci extraktu *Ziziphi fructus*

Číslo měření	LC ₅₀ v mg/ml
1	1,003
2	0,602
3	0,845

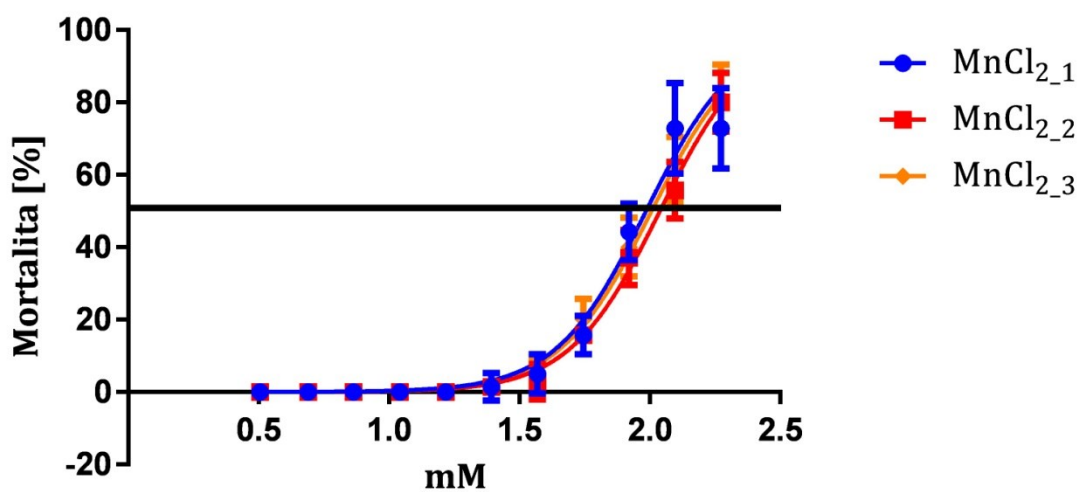
Tab. 7 Hodnoty LC₅₀ extraktu *Ziziphi fructus* stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC₅₀ cicimkového extraktu byla $0,817 \pm 0,165$ mg/ml.

7.7 Toxicita galanthaminu a huperzinu A

Při nejvyšší testované koncentraci, 10 mg/ml, nebylo pozorováno žádné toxické působení na nauplia artemií.

7.8 Toxicita standardu $MnCl_2$ (pro ověření správného průběhu testu)



Graf 7 Graf závislosti mortality na koncentraci standardu $MnCl_2$

Číslo měření	LC_{50} v mM
1	98,62
2	109,2
3	101,4

Tab. 8 Hodnoty LC_{50} standardu $MnCl_2$ stanovené při jednotlivých měřeních

Průměrná hodnota LC_{50} standardu $MnCl_2$ byla $103,073 \pm 4,478$ mM.

8 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit akutní toxicitu vodných extraktů připravených z rostlinných drog tradiční čínské medicíny a to *Salviae folium*, *Apii semen*, *Coptidis rhizoma*, *Evodiae fructus*, *Zanthoxyli radix* a *Ziziphi radix* a dvou izolovaných alkaloidů – galantaminu a huperzinu A a poté stanovit jejich LC₅₀. Pro testování byl vybrán mořský korýš *Artemia salina*, který je dostatečně citlivý a výsledky korelují s mnohem specifitějšími testy, přesto že jsou relativně jednoduché.

Výsledky testů byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 6. Byly stanoveny LC₅₀ přírodních látek, jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 9. Testované alkaloidy neprokázaly při testovaných koncentracích žádnou mortalitu, proto již nejsou dále uvedeny.

Rostlinná droga	LC ₅₀
<i>Salviae folium</i>	2,074 ± 0,462 mg/ml
<i>Apii semen</i>	4,041 ± 0,108 mg/ml
<i>Coptidis rhizoma</i>	0,134 ± 0,004 mg/ml
<i>Evodiae fructus</i>	2,166 ± 0,244 mg/ml
<i>Zanthoxyli radix</i>	1,154 ± 0,015 mg/ml
<i>Ziziphi fructus</i>	0,817 ± 0,165 mg/ml

Tab. 9 Hodnoty LC₅₀ jednotlivých extraktů

Nejtoxičtější z extraktů byl *Coptidis rhizoma* s LC₅₀ = 0,134 ± 0,004 mg/ml. Dále toxicita klesala v pořadí *Ziziphi fructus* – LC₅₀ = 0,817 ± 0,165 mg/ml > *Zanthoxyli radix* – LC₅₀ = 1,154 ± 0,015 mg/ml > *Salviae folium* – LC₅₀ = 2,074 ± 0,462 mg/ml > *Evodiae fructus* – LC₅₀ = 2,166 ± 0,244 mg/ml > *Apii semen* – LC₅₀ = 4,041 ± 0,108 mg/ml.

9 Diskuse

Drogy, které byly použity pro přípravu extraktů, nacházejí uplatnění v tradiční čínské medicíně. Izolované alkaloidy jsou inhibitory acetylcholinesterázy a z toho důvodu patří mezi potencionální léčiva Alzheimerovy demence.

Akutní toxicita je toxicita po jednorázovém podání látky. Látka se obvykle podává živému organismu. Pro účely testování v této diplomové práci byl vybrán korýš *Artemia salina*. Byla hodnocena procentuální úmrtnost (mortalita) nauplií artemií, z té pak byla vypočítána LC_{50} látek. [64]

Artemia salina je primitivní mořský korýš vysoce citlivý na abiotické podmínky. K testování se využívají nauplia vylíhlá z cyst po jednodenní inkubaci. Důvodem pro použití artemií v toxikologických testech jsou kromě citlivosti jejich snadný odchov v dostatečném množství, relativně jednoduché provedení testů a spolehlivost. Nachází uplatnění i v ekotoxikologii. [16] [17]

Tradiční čínská medicína je celostní systém známý tisíce let vycházející ze starodávné čínské filozofie. Jednou z jejích oblastí je fytotherapie. Pro léčebné účely jsou využívány směsi drog. [3] [4]

Alzheimerova demence je nejčastěji se vyskytující typ demence postihující zejména starší lidi. Hlavními symptomy jsou obtížné rozpomínání se, desorientace a změny v chování. V současné době neexistuje léčba, která by dokázala Alzheimerovu demenci vyléčit. Lze pouze zpomalit progresi onemocnění. Mechanismy účinku léčiv jsou inhibice enzymu acetylcholinesterázy a nekompetitivní antagonismus na NMDA-receptorech. [5] [6] [7]

Vodné extrakty byly připraveny z následujících rostlinných drog: *Salvia officinalis folium*, *Apii graveolens semen*, *Coptidis chinensis rhizoma*, *Evodiae rutaecarpae fructus*, *Zanthoxyli nitidi radix* a *Ziziphi jujubae fructus*. Testované izolované alkaloidy byly galanthamin a huperzin A.

Methanolový extrakt z listů *Salvia officinalis* byl hodnocen pro potenciální protinádorovou, antibakteriální a antifungální aktivitu. Studií, která testovala cytotoxickou aktivitu methanolového extraktu proti lidským buňkám způsobujícím leukémii (Raji, U937, KG-1A), bylo zjištěno, že tato aktivita je závislá na dávce a délce expozice buněk extraktem. Největší aktivitu vykazoval extrakt proti buněčným kulturám Raji. Při koncentraci 800 $\mu\text{g/ml}$ a době expozice 48 hodin byla stanovena hodnota $IC_{50} = 130,597 \mu\text{g/ml}$. [65]

Další studie hodnotila aktivitu ethanolových rostlinných extraktů proti vybraným bakteriím a kvasinkám. Jedním z nich byl extrakt z listů šalvěje lékařské. Bylo zjištěno, že tento extrakt je schopný inhibovat růst bakterií, kvasinek a dermatofytů, nejvyšší inhibice růstu byla stanovena u anaerobní bakterie *Porphyromonas gingivalis*, MIC = 2 µg/ml. [66]

Při našem hodnocení biologické aktivity vodného extraktu z listů šalvěje na žábřonozkách byla stanovena jeho LC₅₀ = 2,074 ± 0,462 mg/ml.

Čínští vědci zjistili cytotoxickou aktivitu extraktu *Apii semen in vitro* proti lidským nádorovým buňkám žaludku BGC – 823. Míra cytotoxicity závisí na koncentraci a délce působení extraktu. [35]

Další ze studií se zabývala antihypertenzivními účinky celerových extraktů získaných ze semen rostliny. Byly připraveny methanolový, vodno - ethanolový a n-hexanový extrakt. Testujícím organismem byly v této studii myši. Extrakty byly myším podávány po dobu 7 týdnů. Všechny extrakty po podání vykazovaly snížení krevního tlaku, nejvýraznější snížení pak vykazoval n-hexanový extrakt v dávce 300 mg/kg. [67]

V této práci byla stanovovaná hodnota LC₅₀ vodného extraktu celeru 4,041 ± 0,108 mg/ml.

U extraktu *Coptidis rhizoma* byl testovány jeho cytotoxické účinky na růst lidských leukemických a jaterních buněk způsobujících rakovinu. Celkem bylo hodnoceno 8 buněčných linií. Nejvýraznější inhibiční účinky měl koptisový extrakt proti leukemickým buňkám Raji, IC₅₀ = 4,1 ± 0,9 µg/ml, a proti jaterním nádorovým buňkám SK-Hep1, IC₅₀ = 7,1 ± 0,5 µg/ml. [68]

V této práci byla stanovena biologická aktivita vodného extraktu *Coptidis rhizoma* jako hodnota LC₅₀ = 0,134 ± 0,004 mg/ml.

Jedním z účinků extraktu plodu *Evodia rutaecarpa* je protizánětlivá aktivita. Ta byla hodnocena aktivací lidských neutrofilů prostřednictvím receptorů, *N*-formyl-methionyl-leucyl-fenylaninem (fMLP), nebo bez zprostředkování přes receptory, phorbol-12-myristat-13-acetatem (PMA). Výsledkem studie bylo stanovení IC₅₀ ethanolového extraktu *Evodiae fructus* proti oběma mediátorům aktivující neutrofilů. Hodnota IC₅₀ pro fMLP byla naměřena 3,3 ± 1,0 µg/ml, pro PMA byla IC₅₀ = 2,7 ± 0,3 µg/ml. [69]

Při hodnocení biologické aktivity vodného extraktu *Evodia rutaecarpa* byla získána hodnota $LC_{50} = 2,166 \pm 0,244$ mg/ml.

Vodný a ethanolový extrakt kořene *Zanthoxylum nitidum* byly testovány pro svou potenciální antibakteriální aktivitu. Pro hodnocení byla využita disková difuzní metoda. Extrakty prokázaly aktivitu proti většině testovaných bakterií hlavně ve vyšších koncentracích – 40 mg/ml. Ethanolový extrakt měl největší zónu inhibice proti *Bacillus cereus*, a to 17 mm, nejmenší pak proti *Klebsiella pneumoniae* – 8,5 mm. U vodného extraktu byla zjištěna největší inhibiční zóna proti *Bacillus subtilis* – 16 mm, nejmenší proti *Escherichia coli* – 6 mm. [70]

Stanovením biologické aktivity na žábřonožkách byla získána hodnota LC_{50} vodného extraktu *Zanthoxyli radix* $1,154 \pm 0,015$ mg/ml.

Vědci v Íránu testovali ethanolický extrakt připravený z plodů *Ziziphus jujuba* pro své antimikrobiální účinky. Účinky byly hodnoceny proti vybraným druhům bakterií a hub. Aktivita byla stanovována pomocí minimální inhibiční koncentrace. Výsledky studie prokázaly dostatečnou aktivitu i v nízkých koncentracích extraktu. Nejnižší MIC byla zjištěna u gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, $MIC = 0,65 \pm 0,22$ mg/ml, nejvyšší pak u houby *Aspergillus fumigatus* a dosáhla $MIC = 2,86 \pm 0,7$ mg/ml. [57]

V této práci v případě extraktu *Ziziphi fructus* bylo zjištěno $LC_{50} = 0,817 \pm 0,165$ mg/ml.

Marylandští vědci sledovali působení galanthaminu a huperzinu A jako antidota proti sarinu. Sarin patří mezi organofosfátové jedy, kteří ireverzibilně inhibují enzym acetylcholinesterázu. Působení látek bylo sledováno na prasatech. Hodnoceno bylo jak protektivní podání galanthaminu a huperzinu A před expozicí sarinem, tak jejich kurativní podání po expozici sarinem. Výsledkem studie bylo procento přežití prasat po 24 hodinové expozici látkami. Nejlepší ochranu před otravou měl v obou případech galanthamin. Při protektivním podání galanthaminu, 8 mg/kg, přežilo 100% prasat. Při kurativním podání galanthaminu přežilo 90% jedinců. Huperzin A byl podáván v dávce 0,3 mg/kg. Při protektivním i kurativním podání huperzinu A přežilo pouze 50% jedinců. [71]

Izolované alkaloidy galantamin a huperzin A nevykazovaly na naupliích žábřonožek, ani při maximální stanovované koncentraci 10 mg/ml, nulovou akutní toxicitu.

Z výsledků uvedených v tabulce č. 11 vyplývá, že nejtoxičtější účinky má extrakt *Coptidis rhizoma*, $LC_{50} = 0,134 \pm 0,004$ mg/ml. Dále následují extrakt *Ziziphi fructus*, $LC_{50} = 0,817 \pm 0,165$ mg/ml, *Zanthoxyli radix*, $LC_{50} = 1,154 \pm 0,015$ mg/ml, *Salviae folium*, $LC_{50} = 2,074 \pm 0,462$ mg/ml a *Evodiae fructus*, $LC_{50} = 2,166 \pm 0,244$ mg/ml. Nejméně toxicky pak působí extrakt *Apii semen*, $LC_{50} = 4,041 \pm 0,108$ mg/ml.

V diplomové práci kolegyně byly použity vodné extrakty ze stejných rostlinných drog k určení jejich antiprotozoální aktivity pomocí jednobuněčného organismu *Tetrahymena thermophila*. U každého extraktu byla stanovována jeho IC_{50} . Podle výsledků této práce měl největší antiprotozoální aktivitu vodný extrakt získaný z *Coptis chinensis*, jeho IC_{50} byla $0,116 \pm 0,007$ mg/ml. Dále následovaly extrakt ze *Zanthoxylum nitidum*, $IC_{50} = 0,225 \pm 0,006$ mg/ml, extrakt ze *Ziziphus jujuba*, $IC_{50} = 0,622 \pm 0,001$ mg/ml, extrakt ze *Salvia officinalis*, $IC_{50} = 1,317 \pm 0,004$ mg/ml, extrakt z *Evodia rutaecarpa*, $IC_{50} = 13,07 \pm 1,442$ mg/ml. Nejmenší antiprotozoální aktivitu měl pak extrakt z *Apium graveolens* a to $IC_{50} = 13,18 \pm 0,311$ mg/ml. [72]

Rostlinná droga	LC_{50} (mg/ml)	IC_{50} (mg/ml)
<i>Salviae folium</i>	$2,074 \pm 0,462$	$1,317 \pm 0,004$
<i>Apii semen</i>	$4,041 \pm 0,108$	$13,18 \pm 0,311$
<i>Coptidis rhizoma</i>	$0,134 \pm 0,00$	$0,116 \pm 0,007$
<i>Evodiae fructus</i>	$2,166 \pm 0,244$	$13,07 \pm 1,442$
<i>Zanthoxyli radix</i>	$1,154 \pm 0,015$	$0,225 \pm 0,006$
<i>Ziziphi fructus</i>	$0,817 \pm 0,165$	$0,622 \pm 0,001$

Tab. 10 Hodnoty LC_{50} a IC_{50} v mg/ml stanovovaných extraktů

Největší aktivitu proti oběma testovaným organismům (*Artemia salina* a *Tetrahymena thermophila*) vykazoval extrakt získaný z *Coptis rhizoma*. Nejméně toxické pak byly extrakty z *Evodiae fructus* a *Apii semen*.

10 Citovaná literatura

1. The Free Dictionary [online]. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/biological+activity>. [cit. 2017-04-05].
2. Karchesy, Y. M., Kelsey, R. G., Constantine, G., Karchesy, J. J. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *SpringerPlus*. 2016. 5(1). 2-9.
3. Komora TČM [online]. <http://www.komoratcm.cz/tradicni-cinska-medicina/fytoterapie>. [cit. 2017-03-14].
4. Tradiční čínská medicína [online]. <http://www.tradicnicinska.cz/>. [cit. 2017-03-14].
5. Alzheimer's Association [online] http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp. [cit. 2017-03-15].
6. Mayo Clinic [online]. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/home/ovc-20167098>. [cit. 2017-03-15].
7. Doležal, M. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Karolinum. Praha. 2013. 188 s.
8. Animal Diversity Web [online]. <http://animaldiversity.org/accounts/Artemia/classification/>. [cit. 2016-10-11].
9. Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S., Sorgeloos, P. (Eds.). *Artemia: basic and applied biology*. Kluwer Academic Publishers. Boston. 2002. 286 p.
10. NORSAS [online]. <http://www.norsas.eu/species/artemia-salina>. [cit. 2016-10-12].
11. Invertebrate Anatomy OnLine [online]. <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/artemia.html>. [cit. 2016-10-13].
12. Artemia World [online]. <http://www.artemiaworld.com/home/index.php?lng=cz>. [cit. 2016-10-12].
13. Great Salt Lake Ecosystem Program [online]. <https://wildlife.utah.gov/gsl/brineshrimp/parthenogenesis.php>. [cit. 2016-11-02].
14. Genetic Science Learning Centre: Brine Shrimp Life Cycle [online]. <http://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/artemia/>. [cit. 2016-11-02].
15. Obr. 1. <http://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/artemia/>. [cit. 2016-11-02].
16. Brine Shrimp [online]. https://en.wikipedia.org/wiki/Brine_shrimp. [cit. 2016-11-02].

17. Nunes, B. S., Carvalho, F. D, Guilhermino, L. M., Van Stappen, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.* 2006. **144**(2). 453-462.
18. Dvorak, P., Benova, K., Vitek, J. Alternative Biotest on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology*. Begum, G. (Ed.) InTech. Rijeka. 2012.
19. MicroBioTests Inc [online]. <http://www.microbiotests.be/SOPs/Artoxkit%20M%20SOP%20-%20A5.pdf>. [cit. 2017-02-28].
20. Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., Najj, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru.* 2015. **23**(1). 20-26.
21. Kumar, D., Rajdeep, R., Parashar, A., et al. Toxicity assessment of zero valent iron nanoparticles on *Artemia salina*. *Environ Toxicol.* 2017. **32**(5). 1617-1627.
22. Campos, K. C., Rivera, J. H., Gutierrez, J., et al. Biological screening of select Puerto Rican plants for cytotoxic and antitumor activities. *P R Health Sci J.* 2015. **34**(1). 25-30.
23. Arcanjo, DDR., Albuquerque, ACM., Melo-Neto, B., et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz J Biol.* 2012. **72**(3). 505-509.
24. Mwangi, G. G., Wagacha, J. M., Nguta, J. M., Mbaria, J. M. Brine shrimp cytotoxicity and antimalarial activity of plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district. *Pharm Biol.* 2015. **53**(4). 588-593.
25. Coe, F. G., Dimpi M. P., Caley A. J. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. *Pharm Biol.* 2010. **48**(4). 439-445.
26. Jahodář, L. *Farmakobotanika semenné rostliny*. 3. vydání. Karolinum. Praha. 2011. 278 s.
27. Obr. 2. http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/imgdetail.asp?img=images/plant/middlesized/Salvia_officinalis_rostlina.JPG. [cit. 2016-11-07].
28. Karlíčková, J. Terapeutické účinky *Salvia officinalis*. *Praktické lékárenství.* 2007, **3**(1). 33-34.
29. Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., et al. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther.* 2003. **28**(1). 53-59.

30. Kianbakht, S., Abasi, B., M. Perham, M., Dabaghian, F. H. Antihyperlipidemic Effects of *Salvia officinalis* L. Leaf Extract in Patients with Hyperlipidemia: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Phytother Res.* 2011. **25**(12). 1849-1853.
31. Kianbakht, S., Dabaghian, F. H. Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: A randomized placebo. Controlled clinical trial. *Complement Ther Med.* 2013. **21**(5). 441-446.
32. Obr. 6. http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/imgdetail.asp?img=images/plant/middlesized/Apium_graveolens_rostlina.JPG. [cit. 2016-11-15].
33. Erdelská, O., Erdelský, K., Kvačala, M. Atlas léčivých rostlin. Nakladatelstvo Příroda, s.r.o. Bratislava. 2008. 215 s.
34. Hardani, A., Afzaalzadeh, M. R., Amirzargar, A., Mansouri, E., Meamar, Z. Effects of aqueous extract of celery (*Apium graveolens* L.) leaves on spermatogenesis in healthy male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2015. **5**(2). 113-119.
35. GAO, LL., Feng, L., Yao, St., et al. Molecular Mechanisms of Celery Seed Extract Induced Apoptosis via S Phase Cell Cycle Arrest in the BGC-823 Human Stomach Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011. **12**(10). 2601-2606.
36. Obr. 9. http://vitaberin.com/wp-content/uploads/2015/06/Organic_coptis_chinensis_franch.jpg. [cit. 2016-11-22].
37. WHO. Selected medicinal plants – vol. 1. World Health Organization. Geneva. 1999. 289 p.
38. Chinese Herbs [online]. <http://www.chinese-herbs.org/coptis-chinenses/>. [cit. 2016-12-14].
39. Wang, X., Lin, S., Kang, H. F., et al. The effect of RHIZOMA COPTIDIS and COPTIS CHINENSIS aqueous extract on radiation-induced skin injury in a rat model. *BMC Complement Altern Med.* 2013. **13**(105). 1-6.
40. Tjong, Y., Ip, S., Lao, L., et al. Analgesic effect of *Coptis chinensis* rhizomes (*Coptidis Rhizoma*) extract on rat model of irritable bowel syndrome. *J Ethnopharmacol.* 2011. **135**(3). 754-761.
41. Obr. 14. http://kura1.photozou.jp/pub/639/1239639/photo/160783831_624.jpg. [cit. 2016-12-15].

42. Chinese Medicine Central [online]. <https://chinesemedicinecentral.com/2015/wuzhuyu%E5%90%B3%E8%8C%B1%E8%90%B8-pharmacological-investigation-fun/>. [cit. 2017-02-24].
43. Tang, W. C., Eisenbrand, G. Handbook of Chinese medicinal plants: chemistry, pharmacology, toxicology. Wiley-VCH. Weinheim. 2011. 1296 p.
44. Yu, L. L., Liao, J. F., Chen, C. F. Anti-diarrheal effect of water extract of *Evodiae fructus* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2000. **73**(1-2). 39-45.
45. Cai, Q. Y., Li, W. R., Wei, J. J., Mi, S. Q., Wang, N. S. Antinociceptive activity of aqueous and alcohol extract of *Evodia rutaecarpa*. *Indian J Pharm Sci.* 2014. **76**(3). 235-239.
46. Obr. 17. <http://flora.huh.harvard.edu/FloraData/Gallery/1109/Zanthoxylum%20nitidum-lsj.jpg>. [cit. 2016-12-15].
47. Flora of China [online]. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200012482. [cit. 2017-01-02].
48. Hu, J., Zhang, W. D., Liu, R. H., et al. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, and Their Analgesic and Anti-Inflammatory Activities. *Chem Biodivers.* 2006. **3**(9). 990-995.
49. Zuo, G. Y, Wang, C. J., Han, J., Li, Y. Q., Wang, G. C. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine.* 2016. **23**(14). 1814-1820.
50. Obr. 20. <http://media1.webgarden.cz/images/media1:510632b336301.jpg/006.JPG>. [cit. 2016-12-15].
51. WHO. WHO monographs on selected medicinal plants – vol. 3. World Health Organization. Geneva. 2007. 390 p.
52. Ando, V., Čížek, H., Potužák, M., Valíček, P. Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny. Svítání. Hradec Králové. 1998. 320 s.
53. MedlinePlus [online]. <https://medlineplus.gov/ency/article/003887.htm>. [cit. 2017-01-11].
54. Naftali, T., Feingelernt, H., Lesin, Y., Rauchwarger, A., Konikoff, F. M. Ziziphus jujuba Extract for the Treatment of Chronic Idiopathic Constipation: A Controlled Clinical Trial. *Digestion.* 2009. **78**(4). 224-228.

55. Awad, D. S., Ali, R. M., Mhaidat, N. M., Shotar, A. M. Zizyphus jujuba protects against ibuprofen-induced nephrotoxicity in rats. *Pharm Biol.* 2013. **52**(2). 182-186.
56. Daneshmand, F., Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hasani, Z. Crude Extract from Ziziphus Jujuba Fruits, a Weapon against Pediatric Infectious Disease. *Iran J Ped Hematol Oncol.* 2013. **3**(1). 216-221.
57. Havlasová, J., Šafratová, M., Siatka, T., et al. Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some Narcissus Species and Varieties and their Biological Activity. *Nat Prod Commun.* 2014. **9**(8). 1151-1155.
58. Harvey, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacol Ther.* 1995. **68**(1). 113-128.
59. Lilienfeld, S. Galantamine - a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Rev.* 2002. **8**(2). 159-176.
60. SÚKL [online]. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>. [cit. 2017-02-19].
61. Ha, G. T., Wong, R. K., Zhang, Y. Huperzine A as Potential Treatment of Alzheimer's Disease: An Assessment on Chemistry, Pharmacology, and Clinical Studies. *Chem Biodivers.* 2011. **8**(7). 1189-1204.
62. Ferreira, A., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcao, A., Alves, G. Huperzine A from Huperzia serrata: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. *Phytochem Rev.* 2016. **15**(1). 51-85.
63. Xu, Z. Q., Liang, X. M., Juan-Wu, et al. Treatment with Huperzine A Improves Cognition in Vascular Dementia Patients. *Cell Biochem Biophys.* 2012. **62**(1). 55-58.
64. Horák, J., Linhart, I., Klusoň, P. Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. Vysoká škola chemicko-technologická. Praha 2004. 188 s.
65. Shahneh, F. Z., Valiyari, S., Baradaran, B., et al. Inhibitory and Cytotoxic Activities of Salvia Officinalis L. Extract on Human Lymphoma and Leukemia Cells by Induction of Apoptosis. *Adv Pharm Bull.* 2013. **3**(1). 51-55.
66. Weckessera, S., Engela, K., Simon-Haarhaus, B., et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomed.* 2007. **14**(7-8). 508-516.

67. Moghadam, M. H., Imenshahidi, M., Mohajeri, S. A. Antihypertensive Effect of Celery Seed on Rat Blood Pressure in Chronic Administration. *J Med Food*. 2013. **16**(6). 558-563.
68. Lin, C. C., Ng, L. T., Hsu, F. F., Shieh, D. E., Chiang, L. C. Cytotoxic Effects of Coptis Chinensis and Epimedium Sagittatum Extracts and Their Major Constituents (Berberine, Coptisine and Icariin) on Hepatoma and Leukemia Cell Growth. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004. **31**(1-2). 65-69.
69. Ko, H. C., Wang, Y. H., Liou, K. T., et al. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of Evodia rutaecarpa and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *Eur J Pharmacol*. 2007. **555**(2-3). 211-217.
70. Bhattacharya, S., Zaman, M. K., Haldar, P. K. Antibacterial Activity of Stem Bark and Root of Indian Zanthoxylum Nitidum. *Asian J Pharm Clin Res*. 2009. **2**(1). 30-34.
71. Aracava, Y., Pereira, E. F. R., Akkerman, M., Adler, M., Albuquerque, E. X. Effectiveness of Donepezil, Rivastigmine, and (\pm)Huperzine A in Counteracting the Acute Toxicity of Organophosphorus Nerve Agents: Comparison with Galantamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009. **331**(3). 1014-1024.
72. Nechanická, L. Antiprotozoální aktivita přírodních látek. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. 2015. diplomová práce.

Chemické vzorce látek byly vytvořeny v programu ChemBioDraw Ultra 13.0.

11 Seznam zkratk

ADAS-COG	Alzheimer's disease assessment scale – cognitive section
ADL	Activities of daily living
ALT	Alaninaminotransferasa
AST	Aspartataminotransferasa
CDR	Clinical dementia rating scale
IC ₅₀	Koncentrace, která způsobí u 50% populace inhibici
LC ₅₀	Koncentrace, při které nastane u 50% populace smrt
MMSE	Mini-mental state evaluation
MQ	Memory quotient
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NMDA receptory	N-methyl-D-aspartátové receptory

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Vendula Ježková

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Hodnocení přírodních látek pomocí *in vivo* testů s *Artemia salina*

Hodnocení biologické aktivity látek je důležité pro stanovení jejich toxického působení na chemické a fyziologické funkce organismů a jejich části. V této práci byl pro hodnocení akutní toxicity použit mořský korýš *Artemia salina*. Testovány byly vodné extrakty připravené z rostlinných drog *Salviae folium*, *Apii semen*, *Coptidis rhizoma*, *Evodiae fructus*, *Zanthoxyli radix* a *Ziziphi fructus* a dva izolované alkaloidy galanthamin a huperzin A. Pro každý extrakt a alkaloid byla vypočtena hodnota LC_{50} . Výsledky práce ukázaly, že nejtoxičtější působil extrakt z *Coptis chinensis*, $LC_{50} = 0,134 \pm 0,004$ mg/ml. Dále toxicita extraktů klesala v pořadí *Ziziphus jujuba*, $LC_{50} = 0,817 \pm 0,165$ mg/m > *Zanthoxylum nitidum*, $LC_{50} = 1,154 \pm 0,015$ mg/ml > *Salvia officinalis*, $LC_{50} = 2,074 \pm 0,462$ mg/ml > *Evodia rutaecarpa*, $LC_{50} = 2,166 \pm 0,244$ mg/ml > *Apium graveolens*, $LC_{50} = 4,041 \pm 0,108$ mg/ml. Testované alkaloidy neprokázaly při hodnocených koncentracích žádnou toxickou aktivitu.

Klíčová slova: *Artemia salina*, přírodní látky, alkaloidy, toxicita, biologická aktivita

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Botany

Author: Vendula Ježková

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Evaluation of natural substances using *in vivo* tests with *Artemia salina*

Biological activity evaluation of substances is important because of toxic effect's assessment on chemical and physiological functions of organisms and their parts. For acute toxicity evaluation was used crustacean *Artemia salina* in this study. They were tested aqueous extracts isolated from various plant drugs of *Salviae folium*, *Apii semen*, *Coptidis rhizoma*, *Evodiae fructus*, *Zanthoxyli radix* and *Ziziphi fructus* and two isolated alkaloids galanthamine and huperzine A. For each extract and alkaloid was calculated value of lethal concentration LC_{50} . Results of this study showed, that the extract of *Coptis chinensis*, $LC_{50} = 0,134 \pm 0,004$ mg/ml, had most toxic effects. Further the extract's toxicity decreased in the order *Ziziphus jujuba*, $LC_{50} = 0,817 \pm 0,165$ mg/m > *Zanthoxylum nitidum*, $LC_{50} = 1,154 \pm 0,015$ mg/ml > *Salvia officinalis*, $LC_{50} = 2,074 \pm 0,462$ mg/ml > *Evodia rutaecarpa*, $LC_{50} = 2,166 \pm 0,244$ mg/ml > *Apium graveolens*, $LC_{50} = 4,041 \pm 0,108$ mg/ml. Tested alkaloids don't demonstrated any toxicity activity in determined concentrations.

Key words: *Artemia salina*, natural substances, alkaloids, toxicity, biological activity