

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra Farmakognozie



**Fytochemická studie jednotlivých taxonů rostlin  
rodu *Bergenia***

**Phytochemical study of individual plant species of *Bergenia* genus**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí disertační práce: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Hradec Králové, 2015

Mgr. Helena Hendrychová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně, pod vedením své školitelky doc. PharmDr. Lenky Tůmové, CSc. 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.“  
Disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 186.

V Hradci Králové 15. 7. 2015

.....  
Mgr. Helena Hendrychová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. za cenné rady při vypracování této práce a odborný přístup během postgraduálního studia.

Mé poděkování za spolupráci a vstřícnost patří také RNDr. Gabriele Hrčkové, DrSc., PharmDr. Doris Vokurkové, Ph.D., doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D., doc. dr. Nině Kočevár Glavač, mag. farm., Mgr. Ivě Dolečkové, Ph.D., Ing. Elnuře Abdykerimovně Kanybekovně, Ing. Anně Vildové, Ph.D., Mgr. Janu Kubešovi a také celému kolektivu katedry Farmakognozie.

Děkuji za finanční podporu Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzitě Karlově v Praze (program FAFIS, ERASMUS, PRVOUK, SVV 260 186) a firmě Zentiva.

Srdečné poděkování bych chtěla vyjádřit celé své rodině za podporu a pochopení během studia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakognozie

Kandidát: Mgr. Helena Hendrychová

Školitel: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Název disertační práce: Fytochemická studie jednotlivých taxonů rostlin rodu *Bergenia*

Bergénie, původní asijský druh, patří mezi nejhodnotnější zdroj léčivých látek zejména v tradiční čínské a indické medicíně. Využití nalézají již po staletí při léčbě různých onemocnění. Ceněny jsou pro svoji schopnost rozpouštět močové a ledvinové kameny. Využívány jsou při léčbě infekcí dýchacích cest a nachlazení. Prokázány u nich byly antioxidační, antibakteriální, antivirové, imunostimulační, protizánětlivé, protirakovinné, antidiabetické, antitusické, hepatoprotektivní a diuretické účinky.

Cílem této disertační práce bylo stanovit obsah sekundárních metabolitů (arbutinu, celkových polyfenolů, bergeninu a anthokyanů) ve třech taxonech rostlin rodu *Bergenia* - *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. a *Bergenia x ornata* Stein., současně porovnat jejich biologické aktivity a určit nejvhodnější druh bergénie s největším potenciálem pro využití v léčebné terapii. Hybrid rostliny *B. x ornata* byl vůbec poprvé hodnocen na obsah fenolických látek a biologickou aktivitu. Extrakty z bergenií byly testovány na antioxidační, antiradikálovou, tyrozinázovou, antiparazitickou, imunostimulační, antiagregační aktivitu a na schopnost inhibovat enzym COX-1 a tvorbu PGH<sub>2</sub>.

V extraktech zelených a červených listů bergenií byl stanoven obsah arbutinu, celkových polyfenolů, bergeninu a anthokyanů v sušině. Nejvyšší obsah fenolického glykosidu arbutinu byl stanoven v listech druhu *B. crassifolia* ( $58,85 \pm 0,71 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a *B. x ornata* ( $51,04 \pm 1,21 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl určen u druhů *B. x ornata* ( $49,36 \pm 1,31 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a *B. crassifolia* ( $48,74 \pm 1,14 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Statisticky nejvyšší obsah bergeninu byl zjištěn v listech *B. x ornata* ( $6,23 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$ ). V červených listech bergenií byla také prokázána přítomnost anthokyanů ( $5,41 (\pm 0,06)$  až  $8,30 (\pm 0,08) \text{ mg C3G.g}^{-1}$ ). Obsah polyfenolů a bergeninu byl podobně jako u arbutinu nejvyšší u vzorků listů sbíraných na podzim. Jak bylo prokázáno korelačními analýzami, obsah sekundárních metabolitů je závislý na aktuálních klimatických podmínkách (především na vlhkosti a úhrnu srážek).

Statisticky významné a pozitivní korelace byly stanoveny mezi obsahem fenolických látek a výsledky z měření antiradikálové a antioxidační aktivity (metodami DPPH, ABTS, NADH, FRAP). Vyššímu obsahu arbutinu, polyfenolů, bergeninu a anthokyanů v podzimních měsících odpovídala zvýšená antioxidační aktivita. Nejprůkazněji to bylo patrné u druhu *B. crassifolia*. Z těchto výsledků je zřejmé, že fenolické sekundární metabolity přímo ovlivňují antioxidační a antiradikálovou aktivitu. K vyšší aktivitě přispívají také anthokyaniny, obsažené v červených listech bergenií. Etanolové extrakty bergenií prokázaly schopnost inhibovat aktivitu houbové tyrozinázy. Korelační závislost mezi obsahem arbutinu a inhibicí aktivity tyrozinázy ale nebyla průkazná. Antiparazitická aktivita byla testována na larvách tasemnic druhu *Mesocestoides vogae*. Larvicidní účinek bergeninu, arbutinu a extraktů bergenií však nebyl prokázán. Testované látky naopak povzbudily metabolismus a životaschopnost larev (především arbutin a vodný extrakt *B. crassifolia*). Sledován byl také vztah mezi metabolickou aktivitou a obsahem celkových lipidů v larvách. Při výzkumu imunostimulační aktivity byla prokázána stimulace exprese CD69 na povrchu lymfocytů. Nejúčinněji aktivoval lymfocyty etanolový extrakt *B. x ornata* v koncentracích  $3,13$  a  $6,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Antiagregační

aktivita byla prokázána u bergeninu ( $41,64 \pm 0,97$  %) a etanolového extraktu *B. x ornata*, který signifikantně snížil agregaci trombocytů až na  $28,53 \pm 0,96$  % a byl analogicky účinný s kyselinou acetylsalicylovou ( $24,17 \pm 1,02$  %). Stejný extrakt byl účinný i při stanovení inhibice cyklooxygenázy (COX-1). Extrakt *B. x ornata* prokázal schopnost inhibovat tvorbu prostaglandinu PGH<sub>2</sub> na  $60,68 \pm 1,05$  %.

# Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Mgr. Helena Hendrychová

Supervisor: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Title of Doctoral Thesis: Phytochemical study of individual plant species of *Bergenia* genus

*Bergenia*, native to central Asia, is promising source of medicinal compounds mainly in the system of Chinese and Indian traditional medicine. These species have been used for centuries in therapy of various diseases. They are valued for their ability to dissolve kidney or bladder stones. *Bergenia* plants are used for therapy of pulmonary diseases and cold. They have demonstrated antioxidant, antibacterial, antiviral, immunostimulant, anti-inflammatory, anticancer, antidiabetic, antitussive, hepatoprotective and diuretic effects.

The main aim of this thesis was to determine the content of secondary metabolites (arbutin, total polyphenols, bergenin and anthocyanins) in three taxons of *Bergenia* genus - *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. a *Bergenia* x *ornata* Stein., to compare their biological activities and to identify the most appropriate kind of *Bergenia* plants with the greatest potential for use in therapy. Plant hybrid *B. x ornata* was evaluated on the content of phenolic compounds and biological activity for the first time. *Bergenia* leaf extracts were tested for antioxidant, antiradical, tyrosinase, antiparasitic, immunostimulating, anti-platelet activity and its ability to inhibit the enzyme COX-1 and the formation of PGH<sub>2</sub>.

The contents of arbutin, total polyphenols, anthocyanins and bergenin (in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry weight DW) were determined in the extracts of green and red leaves of *Bergenia* plants. The highest content of phenolic glycoside arbutin in the leaves of *B. crassifolia* ( $58,85 \pm 0,71 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) and *B. x ornata* ( $51,04 \pm 1,21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) was found. The highest content of total polyphenols in *B. x ornata* ( $49,36 \pm 1,31 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) and *B. crassifolia* ( $48,74 \pm 1,14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) was detected. The highest total amount of bergenin in the leaves of *B. x ornata* ( $6,23 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) was revealed. The anthocyanins were also determined in the red leaves of *Bergenia* (from  $5,41 (\pm 0,06)$  to  $8,30 (\pm 0,08) \text{ mg C3G}\cdot\text{g}^{-1}$  DW). The highest amount of polyphenols, bergenin and arbutin in leaf samples collected in autumn was found. The content of secondary metabolites correlated significantly with the meteorological data (mainly with relative humidity and water precipitation).

Significant positive correlations between phenolic contents and results from the measurement of antiradical and antioxidant activity (by methods DPPH, ABTS, NADH, FRAP) were demonstrated. Higher content of arbutin, polyphenols, bergenin and anthocyanins of the tested samples during autumn correlated with the higher antioxidant activity. The highest correlation was obtained for *B. crassifolia*. Great percentage content of phenolic compounds is responsible for the radical scavenging activity. Anthocyanins in red leaves are responsible for the antioxidant activity as well.

Ethanol extracts of *Bergenia* proved the ability to inhibit the activity of mushroom tyrosinase. But the correlation dependence between the total amount of arbutin and inhibiting activity of tyrosinase has not been significant. Antiparasitic activity was tested on the larvae of flat worms *Mesocostoides vogae*. Larvicidal activity of bergenin, arbutin and *Bergenia* extracts has not been established. Tested biological substances encouraged metabolism and viability of



larvae conversely (mainly aqueous extract of *B. crassifolia* and arbutin). The relationship between metabolic activity and the amount of total lipids in the larvae was also revealed.

Lymphocytes were markedly activated (as measured by CD69 expression) by ethanolic extracts of *B. x ornata* in concentration of 3,13 and 6,25 mg.ml<sup>-1</sup>, as revealed in the immunostimulatory assay. Antiplatelet activity was proved for bergenin (41,64 ± 0,97 %) and aqueous extract of *B. x ornata*, which significantly reduced the platelet aggregation up to 28,53 ± 0,96 % and was effective in analogy with acetylsalicylic acid (24,17 ± 1,02 %). The same extract was active in the inhibition of cyclooxygenase (COX-1). *B. x ornata* extract demonstrated the ability to inhibit the production of prostaglandin PGH<sub>2</sub> up to 60,68 ± 1,05 %.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. CÍL</b>	<b>1</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>2</b>
3.1. Historie využití	2
3.2. Popis a výskyt rostlin rodu <i>Bergenia</i>	3
3.2.1. <i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch	4
3.2.2. <i>Bergenia ciliata</i> (Haw.) Sternb.	5
3.2.3. <i>Bergenia x ornata</i> Stein.	5
3.3. Obsahové látky	8
3.4. Biosyntéza sekundárních metabolitů	18
3.4.1. Biosyntéza arbutinu	18
3.4.2. Biosyntéza anthokyanů	18
3.5. Biologická aktivita rostlin rodu <i>Bergenia</i>	22
3.5.1. Antioxidační aktivita	22
3.5.2. Antibakteriální aktivita	23
3.5.3. Antivirová aktivita	24
3.5.4. Antimalarická aktivita	25
3.5.5. Imunostimulační a protizánětlivá aktivita	25
3.5.6. Protirakovinná aktivita	26
3.5.7. Antidiabetická aktivita	27
3.5.8. Antitusická aktivita	28
3.5.9. Diuretická aktivita	28
3.5.10. Hepatoprotektivní aktivita	28
3.5.11. Tyrozinázová aktivita	29
3.5.12. Vedlejší účinky a toxicita	30
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>32</b>
4.1. Materiál a metody	32
4.1.1. Použité chemikálie	32
4.1.2. Přístrojové vybavení	35
4.1.3. Rostlinný materiál	36
4.1.4. Vliv klimatických podmínek na sběr rostlinného materiálu	38

4.1.5. Stanovení obsahu sekundárních metabolitů .....	38
4.1.5.1. Stanovení obsahu arbutinu .....	38
4.1.5.2. Stanovení obsahu celkových polyfenolů .....	39
4.1.5.3. Stanovení obsahu bergeninu metodou HPLC ....	39
4.1.5.4. Stanovení obsahu anthokyanů .....	40
4.1.6. Biologická aktivita .....	43
4.1.6.1. Antioxidační a antiradikálová aktivita .....	43
4.1.6.1.1. Metody založené na eliminaci radikálu... 44	
4.1.6.1.1.1. Metoda DPPH .....	44
4.1.6.1.1.2. Metoda ABTS .....	45
4.1.6.1.1.3. Metoda NADH .....	46
4.1.6.1.2. Metoda založená na hodnocení	
redoxních vlastností látek.....	47
4.1.6.1.2.1. Metoda FRAP .....	47
4.1.6.2. Tyrozinázová aktivita .....	49
4.1.6.3. Antiparazitická aktivita.....	50
4.1.6.3.1. Sledování vlivu čistých látek a extraktů	
na morfologii larev <i>M. vogae</i> .....	50
4.1.6.3.2. Test metabolické aktivity (MTT).....	51
4.1.6.3.3. Stanovení celkových lipidů	
u larev <i>Mesocestoides vogae</i> .....	52
4.1.6.4. Imunostimulační aktivita .....	53
4.1.6.5. Antiagregační aktivita .....	54
4.1.6.6. Stanovení inhibice COX-1 .....	55
4.1.6.7. Statistická analýza .....	57
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1. Stanovení obsahu sekundárních metabolitů .....</b>	<b>58</b>
5.1.1. Stanovení obsahu arbutinu .....	58
5.1.2. Stanovení obsahu celkových polyfenolů .....	62
5.1.3. Stanovení obsahu bergeninu .....	65
5.1.4. Stanovení obsahu anthokyanů .....	68
<b>5.2. Biologická aktivita .....</b>	<b>70</b>
5.2.1. Antioxidační a antiradikálová aktivita .....	70
5.2.1.1. Metoda DPPH .....	70

5.2.1.2. Metoda ABTS .....	71
5.2.1.3. Metoda NADH .....	72
5.2.1.4. Metoda FRAP .....	75
5.2.1.5. Stanovení závislosti antiradikálové aktivity na obsahu sekundárních metabolitů .....	78
5.2.2. Tyrozinázová aktivita .....	85
5.2.3. Antiparazitická aktivita .....	91
5.2.3.1. Test metabolické aktivity .....	94
5.2.3.2. Stanovení celkových lipidů u larev <i>Mesocestoides vogae</i> .....	98
5.2.4. Imunostimulační aktivita .....	103
5.2.5. Antiagregační aktivita .....	107
5.2.6. Stanovení inhibice COX-1 .....	110
<b>5.3. Celkové shrnutí .....</b>	<b>111</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>114</b>
<b>7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY .....</b>	<b>116</b>
<b>8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA .....</b>	<b>117</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>126</b>
<b>10. SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>137</b>
<b>11. SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>142</b>
<b>12. SEZNAM VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PUBLIKACÍ .....</b>	<b>143</b>
<b>13. ÚČAST NA KONFERENCÍCH, PRACOVNÍCH STÁŽÍCH A SEMINÁŘÍCH .....</b>	<b>144</b>

## 1. ÚVOD

Rostlinná říše je velkým zdrojem chemických sloučenin a látek, které mají velký farmaceutický význam. Do dnešní doby však bylo prozkoumáno jen malé procento rostlinných druhů s potenciálními léčivými účinky. Odedávna byly látky přírodního původu využívány k vylepšování zdravotního stavu. Tvořily jediný zdroj materiálu až do doby, kdy se lidé začali zabývat úspěšnou cílenou chemickou přeměnou látek. V současné době produkce léčiv stoupá s jejich spotřebou, což se odráží i na spotřebě léčivých rostlin. Více než čtvrtina u nás vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané deriváty. Rod *Bergenia* patří mezi nejhodnotnější zdroj léčivých látek. V současnosti je na celém světě známo 31 taxonů s potenciálně významnou farmaceutickou hodnotou. Bergénie, původní asijský druh, je jednou z nejvíce využívaných rostlin v tradiční čínské a indické (ajurvédské) medicíně. Využití nalézá již po staletí při léčbě plicních onemocnění, při zástavě krvácení, při rozpouštění ledvinových a močových kamenů či pro posílení imunity.<sup>1)</sup>

## 2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce bylo provést celkové zhodnocení obsahu sekundárních metabolitů ve třech taxonech rostlin rodu *Bergenia* - *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. a *Bergenia x ornata* Stein. a současně stanovit a porovnat jejich biologické aktivity. Vytyčeny byly následující dílčí cíle:

- Provést rešerši literatury týkající se obsahových látek a biologické aktivity rostlin rodu *Bergenia*. Stanovit obsah sekundárních metabolitů – polyfenolů, arbutinu, bergenu, anthokyanů. Sledovat vliv klimatických podmínek na produkci sekundárních metabolitů.
- Testovat antioxidační, antiradikálovou, imunostimulační, antiparazitickou, tyrozinázovou a antiagregační aktivitu a schopnost inhibice enzymu COX-1.
- Na základě získaných výsledků určit ze tří testovaných druhů bergenií tu, s největším potenciálem pro využití v léčebné terapii.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Historie využití

Podle Světové zdravotnické organizace 70 % indické populace užívá na léčbu různých chorob především alternativní medicínu. V současnosti je zde takto využíváno okolo 800 druhů původních rostlin. Díky dlouhodobému historickému používání a spolehlivosti přírodních léčiv, se tak na indickou tradiční medicínu zaměřuje stále více farmaceutických společností, které zde našly výborný zdroj pro hledání nových bioaktivních složek. Jedním z významných zdrojů aktivních látek, na který je soustředována pozornost je i rod *Bergenia*.

<sup>2)</sup> Na úbočích Himálaje (od Kašmíru po Bhútán) se vyskytují rostliny *Bergenia ciliata* Sternb. a *Bergenia ligulata* (Wall.) Engl., známé pod jménem *Pasanabheda* či *Pakhanbhed* (což v překladu znamená „rozpustit kámen“), pod tímto jménem jsou i součástí oficiálního Indického Ajurvédského Lékopisu. <sup>3, 4)</sup> V indickém lidovém léčitelství Ajurvéda jsou tyto rostliny již po staletí využívány na léčbu různých onemocnění. Příklady tradičního využití jsou uvedeny v **Tabulce č. 1**. Ceněny jsou především pro svoji schopnost rozpouštět ledvinové a močové kameny. <sup>5)</sup> Využívány jsou při léčbě infekcí močových cest, hemeroidech, krvácení a epilepsii. Extrakty se používají na léčbu infekcí dýchacích cest a při nachlazení. Kořen rostliny se využívá jako antidiabetikum a antidotum při intoxikaci opiem. Kořenovými extrakty se podporuje vylučování, léčba zánětu spojivek, horečky, kašle, úplavice a průjmových onemocnění. Při prořezávání dětských zoubků se kořeny žvýkají s přídavkem medu a snižují tak podráždění. Tibeťané aplikují čerstvou pastu z listů bergénií na pokožku a chrání se tak před škodlivým ultrafialovým zářením. V tradiční nepálské medicíně se bergénie využívá k léčbě žaludečních obtíží a zejména její extrakty jsou účinné při léčbě žaludečních vředů. V Indočíně se drcením listů získává šťáva na léčbu zánětů zevního zvukovodu. V Číně se suchý prášek používá k posílení imunity a při léčbě astmatu, kašle či závratí. <sup>6 - 10)</sup>

*B. crassifolia* je jedinou rostlinou z rodu *Bergenia* zahrnutou ve Státním Lékopise SSSR (11. edice, 1990).<sup>11)</sup> Jako droga je zde uvedena *Rhizomata bergeniae* s adstringentním, hemostatickým a protizánětlivým účinkem. Odvary z oddenků jsou doporučovány v gynekologii při masivním krvácení, pro posílení kapilární stěny, pro lokální vasodilatační účinky, při vysokém tlaku a k posílení činnosti srdce. Extrakty z oddenků bergenií jsou v ruské tradiční medicíně využívány pro léčbu chřipky, horečky, enterokolitidy, gastritidy a průjemových onemocnění. Používají se také při léčbě onemocnění dutiny ústní (stomatitida, gingivitida či krvácení dásní). Burjatové a Mongolové z přezimujících černých listů bergenie tučnolisté připravují čaj, považovaný za zdraví prospěšný nápoj bez škodlivého kofeinu. V oblasti Altaje jsou pro léčebné účely nejvíce využívány černé přezimující listy z důvodu vyššího obsahu tříslovin, známé jako chagirský čaj.<sup>12-15)</sup>

### **3.2. Popis a výskyt rostlin rodu *Bergenia***

Rod *Bergenia*, z čeledi lomikamenovité (Saxifragaceae), v současnosti zahrnuje 10 původních asijských druhů (**Tab. č. 2**), sedm z nich roste v Číně, z toho tři patří mezi endemické. V taxonomické databázi IPNI (The International Plant Names Index) je uvedeno 31 taxonů ze sekcí *Bergenia*, *Ciliatae* a *Scopulosae* (**Tab. č. 3**). Tento seznam zahrnuje všechny známé druhy, jejich variety a hybridy.<sup>1, 16)</sup> Rodové jméno je odvozeno od jména Karla Augusta z Bergenu (1704-1759), německého lékaře a botanika. Kompletní systematické členění rodu *Bergenia* shrnula Borisova v roce 1956. Popsala 11 druhů včetně jejich synonym, morfologie, rozšíření a ekonomického využití.<sup>12)</sup> Současné vědecké zkoumání je zaměřeno především na 5 druhů bergenií rostoucích ve východní Asii, v jihovýchodní části centrální Asie a v severních regionech jižní Asie. Patří mezi ně druhy *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb., *Bergenia stracheyi* Engl., *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ligulata* (Wall.) Engl. a *Bergenia himalaica* Boriss. Rostliny se vyskytují ve vyšších nadmořských výškách okolo 3 000 m n. m.

v pohořích Himálaje a Altaje, na území Indie, Nepálu, Kašmíru, Pákistánu, Číny, Mongolska a Ruska. <sup>17, 18)</sup> Všechny bergénie jsou charakteristické silnými plazivými oddenky, nápadně velkými tuhými listy a masitými stonky s množstvím velikých, pětičetných květů v cymózních květenstvích. <sup>19)</sup> Bergénie jsou častým doplňkem okrasných zahrad. Nejznámější je bergénie tučnolistá (*B. crassifolia*), ze sekce *Bergenia*, nejčastěji pěstovaná okrasná bergénie nejen v České republice, s velikými listy a se zvonkovitými bledě růžovými až tmavě purpurovými květy. O něco robustnější je pak bergénie srdčitolistá (*Bergenia cordifolia* (Haw.) Sternb.) s okrouhlými listy se ztloustlými okraji a srdčitými bázemi a se sytě růžovými květy v rozvolněných latách. Oba druhy se v zahradách pěstují již od 18. století. Mezi oblíbené zahradní bergénie patří i původně tibetská *Bergenia purpurascens* (Hook. & Thoms.) Engl., s menšími obvejčitými listy, sytě červenými stonky a svítivě purpurovými květy. Z druhů ze sekce *Ciliatae* je nejvíce rozšířena *Bergenia stracheyi* Engl., s krátkými po obvodu pilovitě brvitými listy a bílými až bledě růžovými vonnými květy. Sekci *Scopulosae* zastupuje jediný taxon *Bergenia scopulosa* T.P.Wang. se zcela lysými květenstvími, původně rostoucí ve výšce 3 400 m n. m. Bergénie jsou půdopokryvné rostliny se stálezeleným olistěním, na podzim výrazně červeně zbarveným. <sup>19)</sup> Divoce rostoucí bergénie jsou ve své domovině hojně využívány pro své blahodárné léčivé účinky. Díky tomu jsou však silně ohroženy, nejen nadměrným vykopáváním oddenků, ale i destrukcí původního prostředí. <sup>20, 163)</sup> Pro léčebné účely jsou využívány jak oddenky, tak i listy, v sušeném i čerstvém stavu. <sup>21)</sup>

### **3.2.1. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch**

Synonymum: *B. bifolia* Moench, *Saxifraga crassifolia* L.; mongolské jméno: Zuzaannavchit (Badgar) či Badaan; tibetské jméno: Gadur; anglické jméno: Leather Bergenia, Leatherleaf Berginia, Thickleaved Berginia; české jméno: badan tučnolistý, bergénie tučnolistá. Čeleď: *Saxifragaceae* Juss. (lomikamenovité), typová sekce rodu: *Bergenia*. <sup>19, 22)</sup>



Vytrvalá bylina, 15 až 50 cm vysoká, s plazivým několik metrů dlouhým oddenkem tmavě hnědé barvy (průměr 10 až 18 mm) a masitým dočervena zbarveným stonkem. Řapíkaté, široce obvejčité až okrouhlé, celokrajné až vroubkované lesklé listy bez trichomů (průměr 15 až 30 cm). Pětčetné temně purpurové až bledě růžové květy ve stažených latách s obvejčitými korunními lístky (průměr 10 až 12 mm). Plodem je tobolka. Semena jsou malá, tmavě hnědá. Bergénie se přirozeně vyskytují na skalních sutích a balvanech při horní hranici lesa ve výšce kolem 2 000 m n. m. v Číně, Severní Koreji, Mongolsku a Rusku. Rostliny se pěstují jak pro okrasné tak i pro léčebné využití a byly značně hybridizovány.<sup>12, 19, 23, 24)</sup>

### **3.2.2. *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb.**

Synonymum: *Megasea ciliata* Haw., *Bergenia thysanodes* (Lindl.) Schneid.; nepálské jméno: Pakanabadha; hindské jméno: Pakhenbhed; perské jméno: Gashah; kašmírské jméno: Pashanbhed. Čeleď: *Saxifragaceae* Juss. (lomikamenovité), typová sekce rodu: *Ciliatae*.<sup>19, 25)</sup>

Vytrvalá, až 35 cm vysoká bylina s pevným, válcovitým a hnědým oddenkem aromatické vůně a svíravé chuti. Listy oválné až široce obvejčité (průměr 3 až 11 cm), po obou stranách i obvodu brvité. Bílé až do růžova zbarvené květy v jednostranné latě jsou široce zvonkovité se žláznatými, červenými kalichy. Semena jsou protáhlá, hnědě zbarvená. Tento druh bergénie se přirozeně vyskytuje na skalnatých svazích západního Himálaje do nadmořské výšky kolem 2700 m n. m. Je původní v Afghánistánu, jižním Tibetu, Bhútánu a severovýchodní Indii (Západní Bengálsko, Arunáčalpradéš, Méghálaja, aj.).<sup>25)</sup>

### **3.2.3. *Bergenia x ornata* Stein.**

Synonymum: *Saxifraga ornata* Decne. Čeleď: *Saxifragaceae* Juss. (lomikamenovité).

Jedná se o hybrid poprvé uvedený v roce 1878, vzešlý sprášením *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch s *B. ciliata* (Haw.) Sternb. Z dalších hybridů, vzniklých i z křížení s *B. purpurascens* Engl., vznikly desítky pěstovaných odrůd již v poválečných letech, všechny dodnes vysoce

ceněné pro podzimní vybarvení svých listů. *B. x ornata* je vytrvalá, do 30 cm vysoká bylina, s okrouhlými, pýřitými listy s brvitým okrajem. Bílé až růžové květy jsou široce zvonkovité se žláznatými kalichy. <sup>19)</sup>

**Tabulka č. 1:** Příklady tradičního ajurvédského použití rostlin známých jako *Pashanbheda*. <sup>8,</sup>  
26 - 28)

Onemocnění	Používaná část rostliny	Způsob užití
Ledvinové, močové kameny	Oddenky	Sušený prášek užívaný vnitřně
Kašel, chřipka	Listy, Oddenky	Výluh připravený ve vroucí vodě a užívaný vnitřně
Hojení ran	Listy, oddenky	Sušený prášek podávaný přímo na rány
Astma	Oddenky	Oddenková šťáva užívaná vnitřně
Zaživací potíže	Oddenky	Žvýkání čerstvých oddenků
Popáleniny, řezné rány	Oddenky	Rozdrcený oddenek smíchaný s tvarohem a přikládán na rány
Kožní infekce	Oddenky	Pasta z čerstvých oddenků
Afrodiziakum	Oddenky	Sušený prášek užívaný vnitřně

**Tabulka č. 2:** Deset původních druhů rostlin rodu *Bergenia*, sedm z nich se vyskytuje v Číně, z toho tři endemicky (\*). <sup>29 - 32)</sup>

Původní druhy rodu <i>Bergenia</i>				
	Druh	Sekce	Výskyt	Přirozený výskyt v rozpětí nadmořské výšky (m n. m.)
1	<i>Bergenia ciliata</i> (Haw.) Sternb.	<i>Ciliatae</i>	Nepál, Afghánistán, Pákistán	1 800 – 3 000
2	<i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch	<i>Bergenia</i>	Sibiř, střední Asie (Primorje, Korea, Čína - Xinjiang)	(200) – 2 000
3	<i>Bergenia emeiensis</i> Wu & Pan *	<i>Ciliatae</i>	Sichuan, Čína	1 600 – 4 200
4	<i>Bergenia hissarica</i> Boriss.	<i>Ciliatae</i>	Uzbekistán	1 200 – 1 600
5	<i>Bergenia pacumbis</i> (Buch.-Ham.) Wu & Pan	<i>Ciliatae</i>	západní Himálaj, Tibet, Yunnan, Nepál	1 200 – 3 000
6	<i>Bergenia purpurascens</i> (Hook. & Thoms.) Engl.	<i>Bergenia</i>	Himálaj, Tibet, Yunnan, Nepál	2 800 – 4 800
7	<i>Bergenia scopulosa</i> T. P. Wang *	<i>Scopulosae</i>	Čchin - ling, Čína, Shaanxi	2 400 – 3 600
8	<i>Bergenia stracheyi</i> (Hook. & Thoms.) Engl.	<i>Bergenia</i>	Afghánistán, Tibet, západní Himálaj	3 000 – 4 600
9	<i>Bergenia tianquanensis</i> Pan *	<i>Ciliatae</i>	Sichuan, Čína	2 200 – 3 400
10	<i>Bergenia ugamica</i> Pavlov	<i>Ciliatae</i>	Kazachstán	2 600 – 2 800

**Tabulka č. 3:** Seznam druhů rostlin rodu *Bergenia* (ze sekci *Scopulosae*, *Bergenia* a *Ciliatae*) zahrnující známé variety a hybridy. <sup>29 - 30)</sup>

	<b>Druh</b>	<b>Celý název</b>
1	<i>Bergenia beesiana</i>	<i>Bergenia beesiana</i> Hort. ex C. Schneider
2	<i>Bergenia biflora</i>	<i>Bergenia biflora</i> Moench
		<i>Bergenia bifolia</i> Moench
3	<i>Bergenia ciliata</i>	<i>Bergenia ciliata</i> A. Braun ex Engl.
		<i>Bergenia ciliata</i> Stein
		<i>Bergenia ciliata</i> (Haw.) Sternb.
4	<i>Bergenia cordifolia</i>	<i>Bergenia cordifolia</i> Sternb.
5	<i>Bergenia coreana</i>	<i>Bergenia coreana</i> Nakai
6	<i>Bergenia crassifolia</i>	<i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch var. <i>sajanensis</i> Stepanov
		<i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch
7	<i>Bergenia delavayi</i>	<i>Bergenia delavayi</i> Engl.
8	<i>Bergenia emeiensis</i>	<i>Bergenia emeiensis</i> C.Y.Wu ex J.T.Pan
		<i>Bergenia emeiensis</i> C.Y.Wu ex J.T.Pan var. <i>rubellina</i> J.T.Pan
9	<i>Bergenia fortunei</i>	<i>Bergenia fortunei</i> Stein
10	<i>Bergenia gorbunovii</i>	<i>Bergenia gorbunovii</i> B.Fedtsch. & Boriss.
		<i>Bergenia gorbunovii</i> B.Fedtsch.
11	<i>Bergenia himalaica</i>	<i>Bergenia himalaica</i> Boriss.
12	<i>Bergenia hissarica</i>	<i>Bergenia hissarica</i> Boriss.
13	<i>Bergenia ligulata</i>	<i>Bergenia ligulata</i> (Wall.) Engl.
14	<i>Bergenia media</i>	<i>Bergenia media</i> Engl.
15	<i>Bergenia milesii</i>	<i>Bergenia milesii</i> Stein
16	<i>Bergenia orbicularis</i>	<i>Bergenia orbicularis</i> Stein
17	<i>Bergenia x newryensis</i>	<i>Bergenia newryensis</i> Yeo
18	<i>Bergenia ornata</i>	<i>Bergenia ornata</i> Stein & Guillaumin
		<i>Bergenia ornata</i> Stein
19	<i>Bergenia pacifica</i>	<i>Bergenia pacifica</i> Komarov
20	<i>Bergenia pacumbis</i>	<i>Bergenia pacumbis</i> (Buch.-Ham. ex D.Don C.Y.Wu & J.T.Pan
21	<i>Bergenia purpurascens</i>	<i>Bergenia purpurascens</i> Engl.
		<i>Bergenia purpurascens</i> (Hook.f. & Thomson) Engl.
		<i>Bergenia purpurascens</i> (Hook.f. & Thomson) Engl. var. <i>sessilis</i> H.Chuang
22	<i>Bergenia schmidtii</i>	<i>Bergenia schmidtii</i> (Regel) Silva Tarouca
23	<i>Bergenia scopulosa</i>	<i>Bergenia scopulosa</i> T.P.Wang
24	<i>Bergenia smithii</i>	<i>Bergenia smithii</i> Engl.
25	<i>Bergenia x schmidtii</i>	<i>Bergenia schmidtii</i> (Regel) Silva Tarouca, prospec. & Yeo
26	<i>Bergenia spathulata</i>	<i>Bergenia spathulata</i> Nagels ex Guillaumin
27	<i>Bergenia stracheyi</i>	<i>Bergenia stracheyi</i> Stein
		<i>Bergenia stracheyi</i> (Hook.f. & Thomson) Engl.
28	<i>Bergenia thysanodes</i>	<i>Bergenia thysanodes</i> (Lindl.) C.Schneider
29	<i>Bergenia tianquanensis</i>	<i>Bergenia tianquanensis</i> J.T.Pan
30	<i>Bergenia ugamica</i>	<i>Bergenia ugamica</i> V.N.Pavlov
31	<i>Bergenia yunnanensis</i>	<i>Bergenia yunnanensis</i> Hort.

### 3.3. Obsahové látky

Do současnosti bylo z oddenků a listů rodu *Bergenia* izolováno a identifikováno více než 100 různých chemických látek. Seznam všech dosud izolovaných látek z oddenků a listů *B. crassifolia* udává **Tabulka č. 4**. Mezi hlavní bioaktivní sloučeniny vyskytující se v bergéniích patří polyfenoly, flavonoidy a chinony. Bergénie obsahují bioaktivní složky především ve svých oddencích. Oddenky jsou tak například hlavním zdrojem fenolických látek arbutinu, bergeninu a (+)-afzelechinu.<sup>33)</sup> Semena obsahují bergenin, kumariny, třísloviny, kyselinu gallovou, minerály a vosky.

#### Fenolické sloučeniny

Listy a oddenky bergénií jsou významným zdrojem fenolického glykosidu **arbutinu** (4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid) (**Obr. č. 1a**). Ten byl z čerstvých listů *B. crassifolia* izolován poprvé již v roce 1930.<sup>12)</sup> Volný aglykon arbutinu hydrochinon (**Obr. č. 1b**) se v čerstvé rostlině vyskytuje jen ve stopách. *B. crassifolia* je v literatuře uváděna jako jeden z nejbohatších přírodních zdrojů arbutinu (oddenky: 17 – 23 %, listy kolem 7,5 %).<sup>34, 35)</sup> Arbutin se ve vyšším množství vyskytuje také v listech druhu *Arctostaphylos uva-ursi* L. (8 %).<sup>36)</sup> Dále například ve *Vaccinium vitis-idaea* L., *Pyrus communis* L. a *Lathyrus* sp.<sup>34)</sup> Z farmakologického hlediska jsou zajímavé dva způsoby terapeutického využití arbutinu. První je jeho schopnost inhibovat produkci melaninu a snižovat tak aktivitu tyrozinázy. Hlavní aktivní složkou je přitom necukerná část jeho molekuly hydrochinon, který vzniká hydrolýzou arbutinu působením  $\beta$ -glukosidázy. Hydrochinon je využíván jako zesvětlující látka. Má schopnost inhibovat produkci melaninu a snižovat tak aktivitu tyrozinázy. Toxicita pro melanocyty nebyla prokázána. Velmi často je využíván v 3% koncentraci v zesvětlujících kosmetických přípravcích především v Japonsku. Arbutin izolovaný z čerstvých plodů *Aesculus californica* (Spach) Nutt. je využíván při léčbě kožní hyperpigmentace, způsobené

hyperaktivní funkcí melanocytů. Inhibitory tyrozinázy jsou důležité také při léčbě maligních melanomů.<sup>37 – 39)</sup> Druhé terapeutické využití našel arbutin při léčbě onemocnění genito – urinálního traktu. Aktivní složkou s antibakteriálním účinkem je hydrochinon (desinficiens močových cest) a metylarbutin.<sup>40)</sup> V listech *B. crassifolia* byly také identifikovány tři galloyl estery arbutinu: 2-O-caffeoylarbutin, 6-O-galloylarbutin a p-galloyloxyfenyl β-D-glukosid.<sup>12, 34, 41)</sup>

Mezi další důležité fenolické látky, vyskytující se v bergeniích ve značném množství, patří **taniny** (trísloviny). Obsah taninů v listech může být až dvakrát vyšší než v oddencích. Zelené listy obsahují kolem 55 % ellagotanimů, 29 % derivátů kyseliny gallové a 11 % flavonoidů, významný je také obsah kyseliny gallové, arbutinu, bergeninu a kyseliny chlorogenové. Fermentované listy obsahují kolem 31 % kyseliny gallové, 28 % ellagotanimů, 18 % derivátů kyseliny gallové a 18 % flavonoidů.<sup>42)</sup> Z oddenků byly izolovány hydrolyzovatelné trísloviny: +(-)katechin, (-)-3-O-galloylepikatechin, (-)-3-O-galloylkatechin (**Obr. č. 1c, d, e**) a polymerní proanthocyanidiny.<sup>43)</sup> Z ellagotanimů se v zelených listech vyskytuje tellimagrandin a pedunculagin (**Obr. č. 2a, b**), z derivátů kyseliny gallové (**Obr. č. 2e**) pak monogalloyl kyseliny chinové, 1-O-galloylglukóza, 1,2,6-tri-O-galloylglukóza (**Obr. č. 2f, g**), 1,2,3,4,6-penta-O-galloylglukóza. Dále pak metylgallát a kyselina ellagová (**Obr. č. 2c, d**). Izolovány byly také 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-D-glukopyranóza, pyrogallol, kyselina chlorogenová (**Obr. č. 3g**). Z fenolických kyselin byly v listech stanoveny například kyselina acetylsalicylová, fumarová, furankarboxylová, jablečná a chinová (**Obr. č. 3f**).<sup>12, 42, 44, 45)</sup>

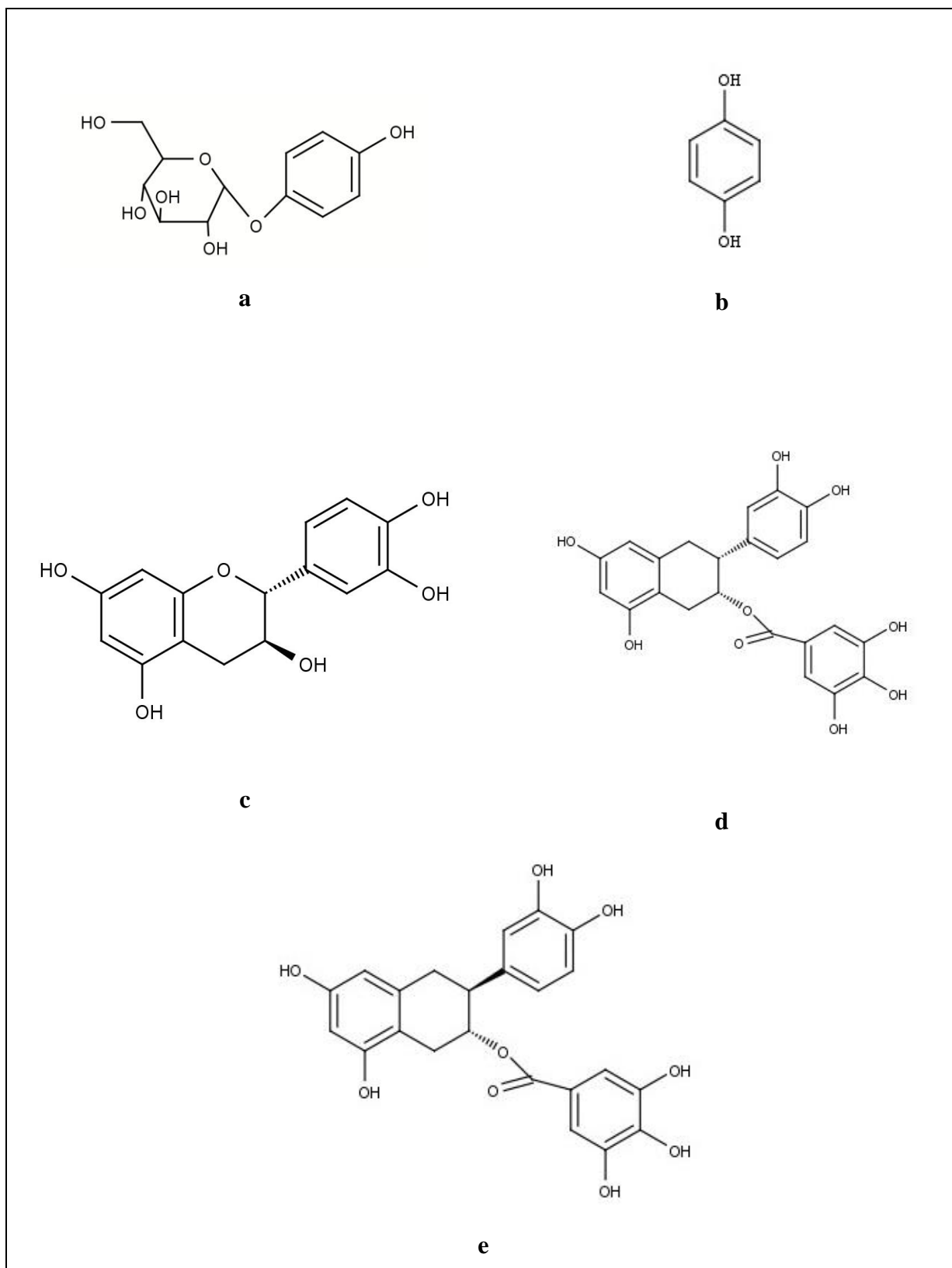
Z kořenů *B. crassifolia* byl poprvé izolován bezbarvý krystalický polyfenol **bergenin** (C-glykosid 4-O-metyl kyseliny gallové) (**Obr. č. 3a**). Jedná se o hydrolyzovatelný tanin a izokumarinový derivát se třemi hydroxylovými a dvěma fenolickými skupinami. Obsah bergeninu v oddencích je až osmkrát vyšší než v listech.<sup>33)</sup> Bergenin vykazuje antivirové, antiarytmické, neuroprotektivní, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antikoagulační,

protirakovinné, cytoprotektivní a imunomodulační účinky.<sup>46, 47)</sup> Působí jako antioxidant a účinný likvidátor volných radikálů. Redukuje aktivitu transamináz a dehydrogenáz uvolňovaných z tetrachlórmetanem intoxikovaných jaterních buněk. V rámci výzkumu účinků bergeninu, získaného z lomikamenu výběžkatého (*Saxifraga stolonifera* Meerb.), za účelem ošetření pacientů s benigní hyperplazií prostaty, byl zjištěn jeho pozitivní účinek na prostatu při léčbě tohoto onemocnění. Důležitou roli v biologické aktivitě bergeninu hrají jeho hydroxylové skupiny. Vstřebávání bergeninu v tenkém střevě odpovídá pasivnímu transportu. Na absorpci má vliv především koncentrace a pH.<sup>48 - 51)</sup>

Výzkumy ukazují, že biologická aktivita bergeninu může být optimalizována selektivní modifikací chemické struktury. Tak byl deacylací bergeninu s pomocí lipáz získán derivát bergenin-3,4,10,11-tetraacetát s prokazatelnými antimikrobiálními účinky. Bergenin a jeho deriváty byly izolovány například i z *Macaranga peltata* Roxb. Mueller, *Mallotus philippensis* Muell., *M. japonicus* Müll., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Ardisia japonica* Blume, *Flueggea virosa* Roxb. ex Wild, *Sacoglottis uchi* Huber, *Astilbe chinensis* Franch. et Savat a *Rodgersia sambucifolia* Hemsl. Z oddenků *B. crassifolia* byly izolovány deriváty bergeninu 3,11-di-O-galloylbergenin, 4,11-di-O-galloylbergenin a 11-O-(p-hydroxybezoyl)bergenin.<sup>52 - 54)</sup> V zelených listech byl dále prokázán bergapten, norathyriol a trihydroxykumarin.<sup>55)</sup> V listech se dále vyskytují norbergenin, flavonoidní glykosidy kvercetin a kaempferol (**Obr. č. 3b, c, d**).<sup>12)</sup> Z oddenků *B. ligulata* byl izolován flavanol (+)-afzelechin (**Obr. č. 3e**). Jedná se o inhibitor alfa-glukosidázy, který má schopnost blokovat aktivitu střevní alfa-glukosidázy a snižovat tak vstřebávání glukózy. Může tak potlačit postprandiální hyperglykémii a hyperinzulinémií.<sup>56)</sup>

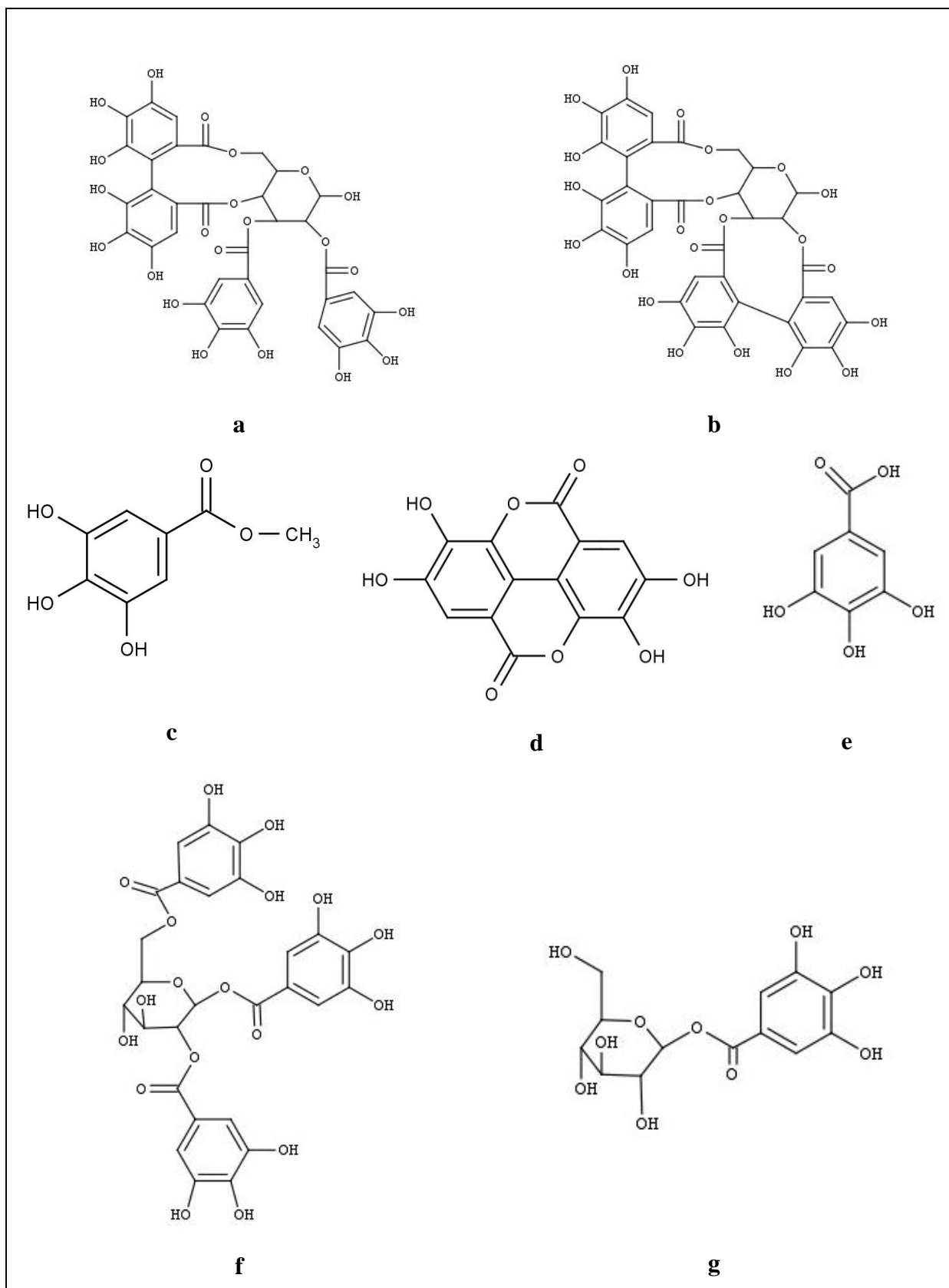
## Ostatní látky

Ze zelených listů *B. crassifolia* byl izolován pektinový polysacharid **bergenan**, složený převážně z kyseliny galakturonové (82 %), galaktózy (2 %), rhamnózy (1,1 %), arabinózy a glukózy. Jedná se o hlavní strukturní složku rostlinných buněčných stěn s prokázaným imunostimulačním účinkem *in vivo* na peritoneální makrofágy, leukocyty a fagocytické buňky. Fagocytózu bergenan zvyšuje zvětšením buněčné přilnavosti.<sup>57)</sup> Z kořenových extraktů *B. ligulata* byla poprvé izolována sloučenina **pashaanolacton**, neboli 4(4'-β-D-glukopyranosyloxy-1'-benzoyloxy)-6-metyltetrahydropyran (**Obr. č. 4a**).<sup>12, 58)</sup> Z listů byl získán také glukosid rhododendrin, sitosterol, dále β-sitosterol-D-glukosid a leucocyanidin (**Obr. č. 4b, c**). Listy bergenií akumulují také lipofilní látky jako je chlorofyl, karotenoidy a vitamíny A a E. Sušené zelené listy bergenií obsahují kolem 0,05 % silic. Největší zastoupení z nich mají 3-metyl-2-buten-1-ol (26,56 %) (**Obr. č. 4d**) a linalol (5,63 %). Z dalších se zde vyskytují β-eudesmol, karyofylen, fytol (**Obr. č. 4e, f, g**) a bisabolol.<sup>17)</sup> V listech jsou dále obsaženy kyselina palmitová (16,06 %), kyselina laurová (9,99 %), kyselina linolová (4,10 %) a kyselina myristová.<sup>59)</sup> Fermentací zelených listů se obsah některých látek zvyšuje (například geraniolu, linalolu a nerolidolu).<sup>12)</sup> Výše zmíněné obsahové látky přispívají k insekticidnímu účinku extraktů *B. ligulata*, které tak aktivně působí proti druhu *D. melanogaster*.<sup>60)</sup>

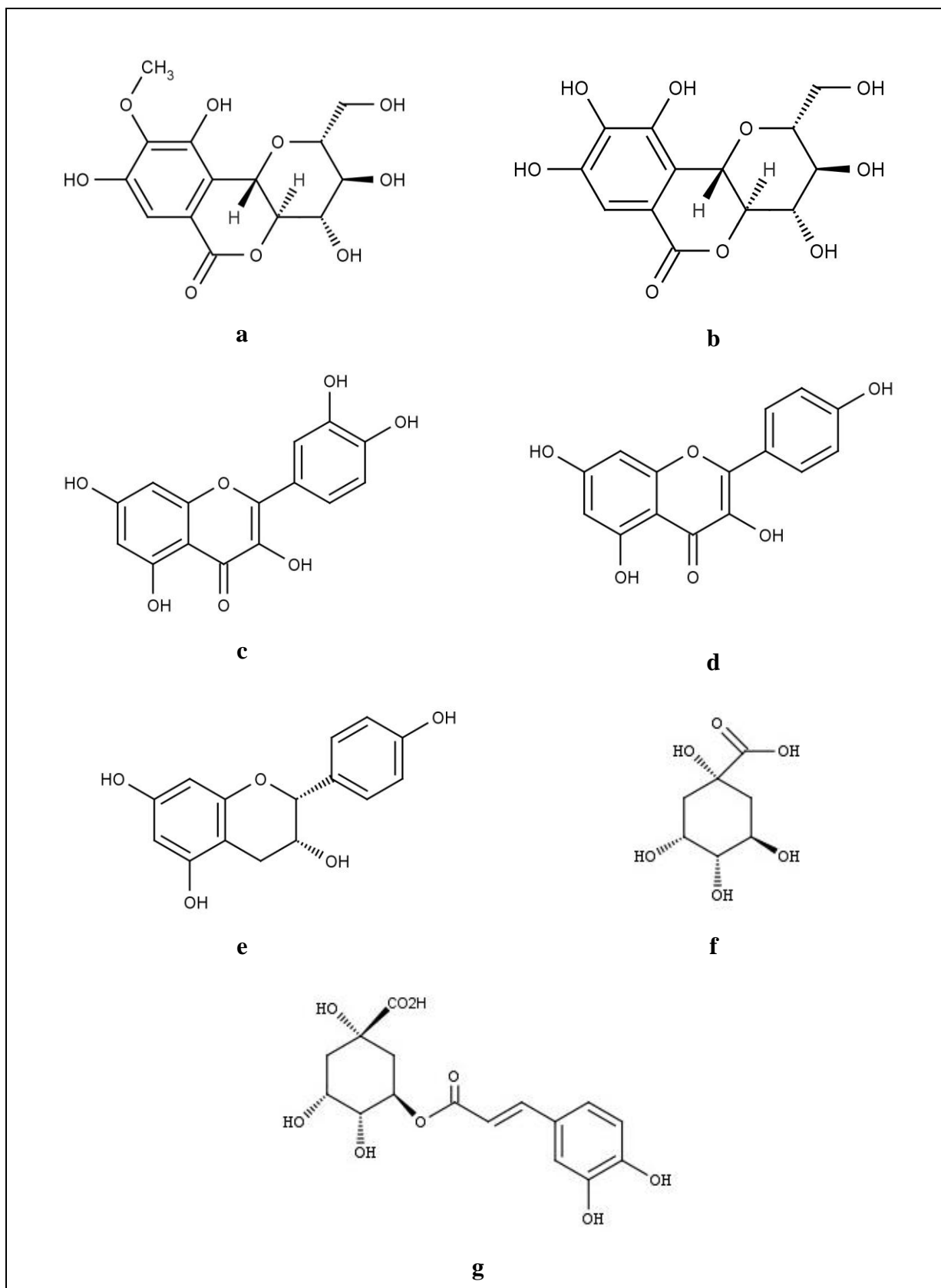


**Obrázek č. 1:** Strukturální vzorce obsahových látek z extraktů rostlin rodu *Bergenia*: a – arbutin, b – hydrochinon, c – +(-)katechin, d – (-)-3-O-galloylepikatechin, e – (-)-3-O-galloylkatechin.

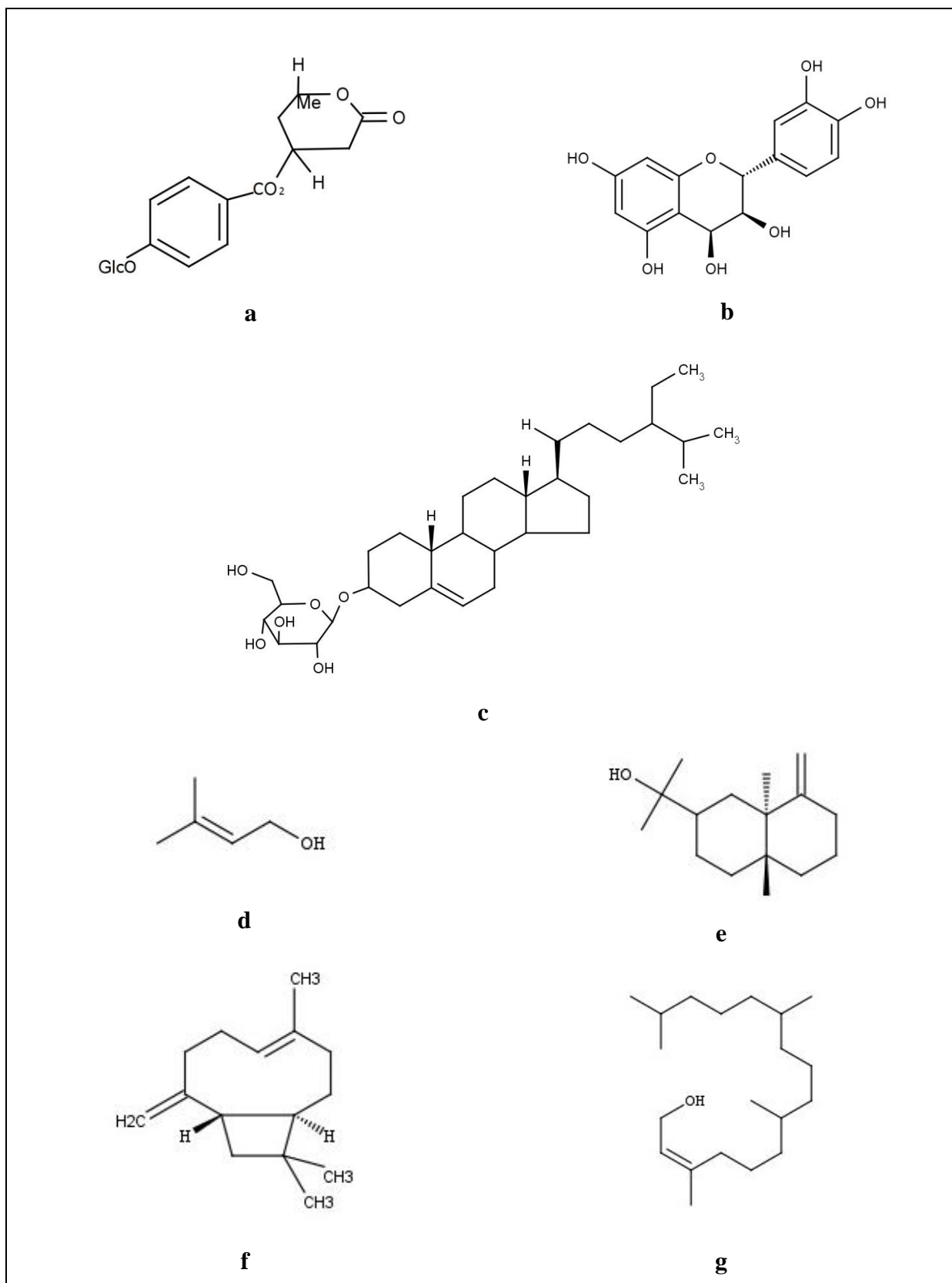




**Obrázek č. 2:** Strukturní vzorce obsahových látek rostlin rodu *Bergenia*: a – tellimagrandin, b – pedunculagin, c – metylgallát, d – kyselina ellagová, e – kyselina gallová, f – 1,2,6-tri-O-galloylglukóza, g – 1-O-galloylglukóza.



**Obrázek č. 3:** Strukturní vzorce obsahových látek rostlin rodu *Bergenia*: a – bergenin, b – norbergenin, c – kvercetin, d – kaempferol, e – (+)-afzelechin, f – kyselina chinová, g – kyselina chlorogenová.



**Obrázek č. 4:** Strukturální vzorce obsahových látek rostlin rodu *Bergenia*: a – pashaanolacton, b – leucocyanidin, c –  $\beta$ -sitosterol-D-glukosid, d – 3-metyl-2-buten-1-ol, e –  $\beta$ -eudesmol, f – karyofylen, g – fytol.

**Tabulka č. 4:** Seznam všech dosud izolovaných chemických látek z listů a oddenků rostlin druhu *Bergenia crassifolia*.<sup>2, 11, 12, 34, 35)</sup>

\* Klíčové chemické struktury izolované z listů *B. crassifolia*.

\*\* Chemické látky doposud izolované pouze z oddenků *B. crassifolia*.

Aldehydy		Flavonoidy	
1	2,4-Heptadienal	37	Bergapten
2	Benzaldehyd	38	Kaemferol 3-O-xylosylgalaktosid
3	Benzenacetaldehyd	39	Kaemferol 3-O-xylosylglukosid
4	Decadienal	40	Kaemferol 3-O-arabinosid
5	Decanal	41	Kaemferol 3-O-rutinosid
6	Dimethyl cyklohexan acetaldehyd	42	Norathyriol
7	2-Decenal	43	Kvercetin 3-O-xylosylgalaktosid
8	2-Nonenal	44	Kvercetin 3-O-xylosylglukosid
9	Nonanal	45	Kvercetin 3-O-arabinosid
10	p-Menthenal	46	Kvercetin 3-O-galaktosid
<b>Terpeny</b>		47	Kvercetin 3-O-glukosid
11	$\beta$ -Damasconon	48	Kvercetin 3-O-rhamnosid
12	$\beta$ -Damascon	49	Kvercetin 3-O-rutinosid
13	3-Thujen-2-on	50	Kvercetin 3-O-xylosid
14	Karyofylen	51	Trihydroxykumarin
15	Cedranol	<b>Třísloviny</b>	
16	2-Decenol	52**	(+)-Katechin 3,5-di-O-gallát
17	Farnesol	53**	(+)-Katechin 3-O-gallát
18	Farnesyl aceton	54	1,2,3,4,6-penta-O-galloylglukóza
19	Geraniol	55**	1,2,3,4,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukopyranóza
20	Geranyl aceton	56	1,2,6-tri-O-galloylglukóza
21	Hexahydrofarnesyl aceton	57	1-O-galloylglukóza
22	Ionone	58	Monogalloyl kyseliny chinové
23	Linalol	59	Pedunculagin
24	m-Cymen	60	Tellimagrandin I
25	Nerolidol	<b>Další fenolické látky</b>	
26	Fytol	61	2-O-caffeoylarbutin
27	p-Ment-1-en-4-ol	62	6-O-galloylarbutin
28	Prenol	63*	Arbutin
29	Thymol	64*	Bergenin
30	$\alpha$ -Bisabolol	65	Norbergenin
31	$\alpha$ -Bisabololoxid B	66**	11-O-(p-hydroxybezoyl)bergenin
32	$\alpha$ -Cadinol	67**	3,11-di-O-galloylbergenin
33	$\alpha$ -Terpineol	68**	4,11-di-O-galloylbergenin
34	$\beta$ -Elemene		
35	$\beta$ -Eudesmol		
36	$\delta$ -Cadinene		

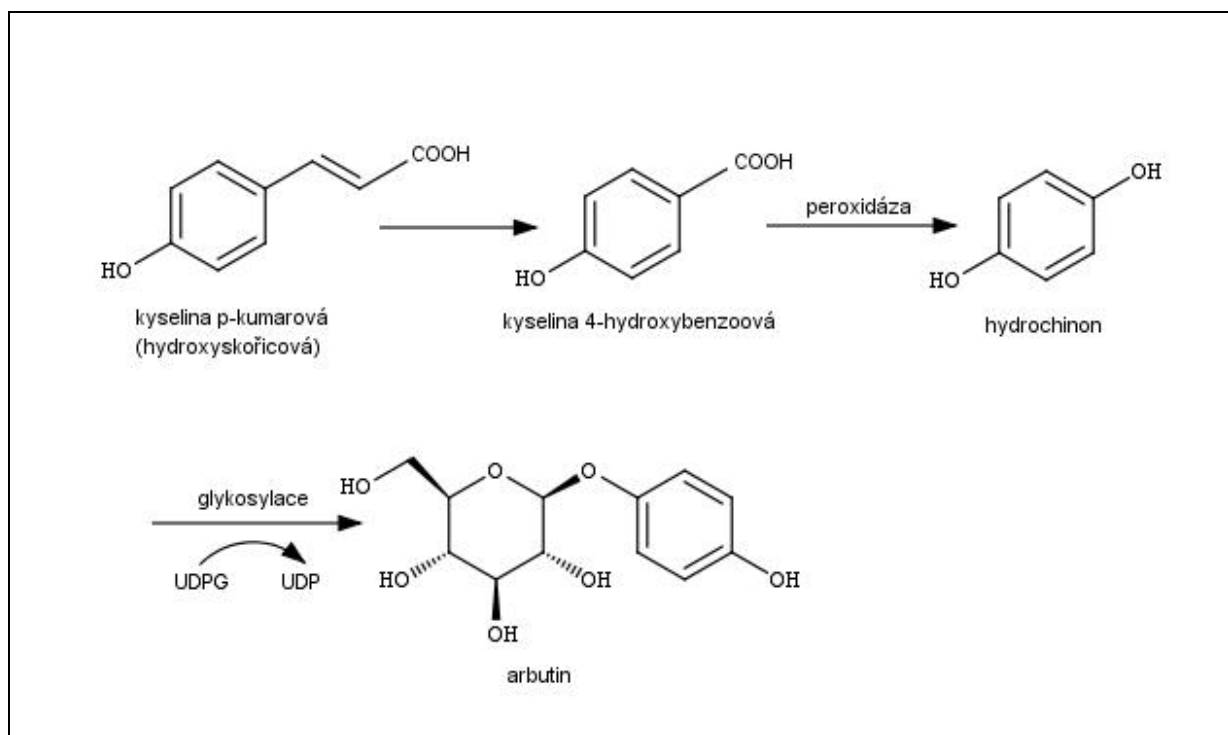
69*	Kyselina ellagová
70*	Hydrochinon
71	p-galloyloxyfenyl $\beta$ -D-glukosid
72	Pyrogallol
73	Metylarbutin
<b>Fenolické kyseliny</b>	
74	Kyselina acetylsalicylová
75	Kyselina chlorogenová
76	Kyselina fumarová
77	Kyselina furankarboxylová
78*	Kyselina gallová
79	Kyselina jablečná
80*	Kyselina dihydroxybenzoová
81	Kyselina chinová
<b>Ostatní látky</b>	
82	Bergenan
83	4-methoxystyren
84	3-metyl-2-buten-1-ol
85	Kyselina 9,12-oktadekadienová

86	Kyselina 9-oktadekanová
87	Karotenoidy
88	Chlorofyl
89	Kyselina dekanová
90	Kyselina dodekanová
91	Kyselina hexadekanová
92	n-Cetyl alkohol
93	n-eicosanol
94	n-hentriacontan
95	n-heptacosan
96	n-nonacosan
97	Kyselina pelargonová
98	n-pentacosan
99	Kyselina pentadekanová
100	Rhododendrin
101	Kyselina stearová
102	Kyselina tetradekanová
103	Tetrametyl hexadekenol
104	Trimetyl dihydronaftalen
105	Trimetyl-3-metylen hexadekatetraen

### 3.4. Biosyntéza sekundárních metabolitů

#### 3.4.1. Biosyntéza arbutinu

Jako terapeuticky významný sekundární metabolit je arbutin důležitou obsahovou složkou listů bergénií. Současné biotechnologické pokusy se soustřeďují na jeho možné získávání biotransformační přeměnou jeho prekurzorů. Arbutin je syntetizován vyššími rostlinami z tyrozinu či L-fenylalaninu přes kyselinu p-kumarovou (hydroxyskořicovou) a 4-hydroxybenzoovou, která přechází oxidativní dekarboxylací a glukosylací na arbutin (**Obr. č. 5**).<sup>61, 62)</sup>



**Obrázek č. 5:** Biosyntéza arbutinu.

#### 3.4.2. Biosyntéza anthokyanů

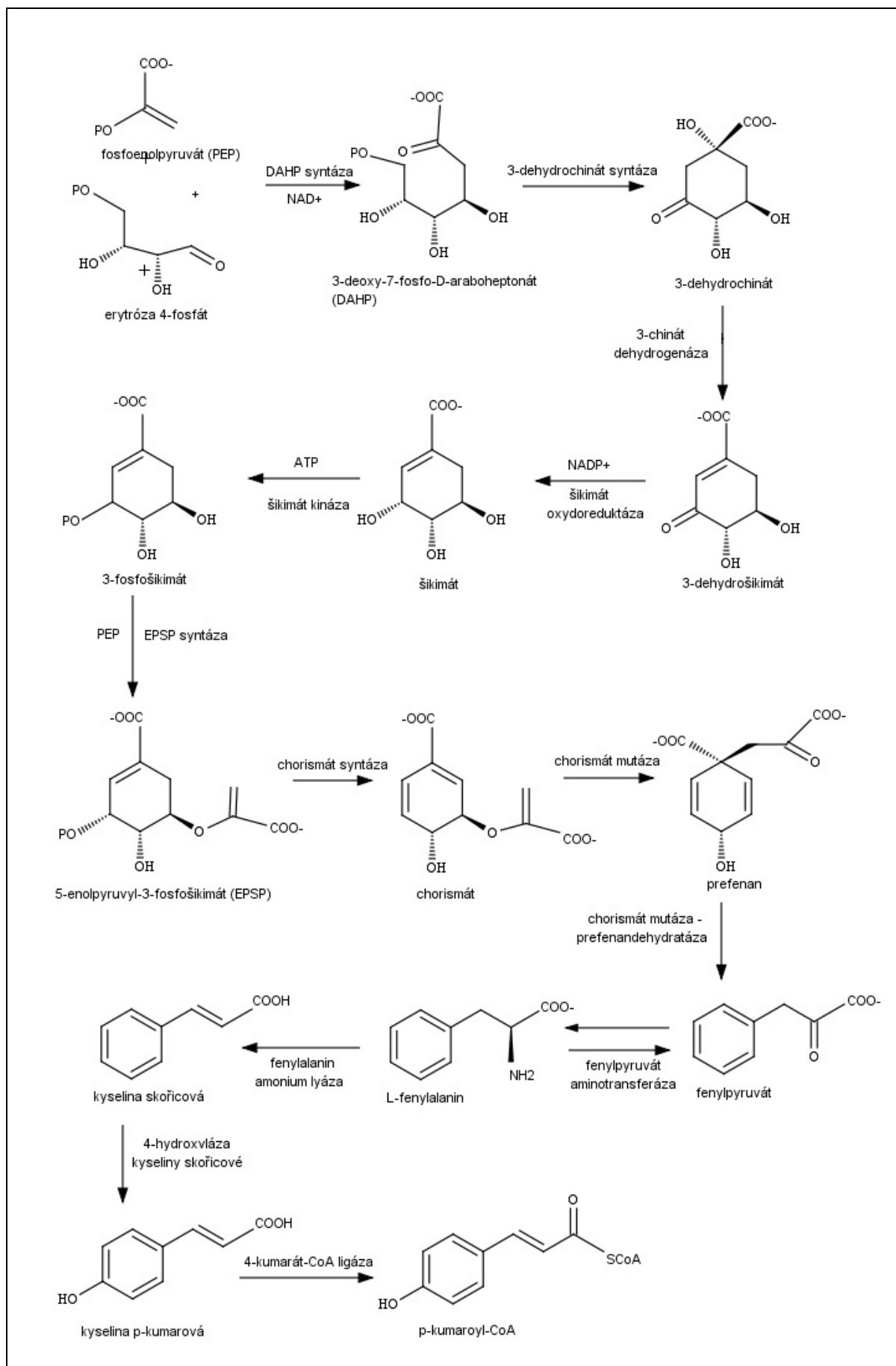
Anthokyaniny jsou rostlinná barviva zodpovědná za červené, fialové a modré zabarvení listů, květů a plodů. Stavebně jsou složeny z aglykonu (anthokyanidinu) a cukerné složky. Mezi nejčastěji se vyskytující sacharidy v anthokyanech patří glukóza, rhamnóza, xylóza, galaktóza, arabinóza a fruktóza. Jejich klasifikace se provádí podle počtu a povahy

sacharidových jednotek v molekule. V rostlinách se vyskytuje 6 běžných anthokyanidinů (pelargonidin, kyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin a malvidin). Anthokyaniny se využívají jako barviva v potravinářském průmyslu, poslední dobou však o ně roste zájem i z důvodu jejich antioxidačních a protirakovinných účinků.<sup>63)</sup>

Metabolická dráha anthokyanů spadá do celkové biosyntézy flavonoidů. K syntéze dochází v cytosolu a následně jsou ukládány ve vakuolách. V rámci buňky je možno anthokyaniny nalézt v buněčných stěnách, chloroplastech i v extracelulárním prostoru.<sup>64)</sup>

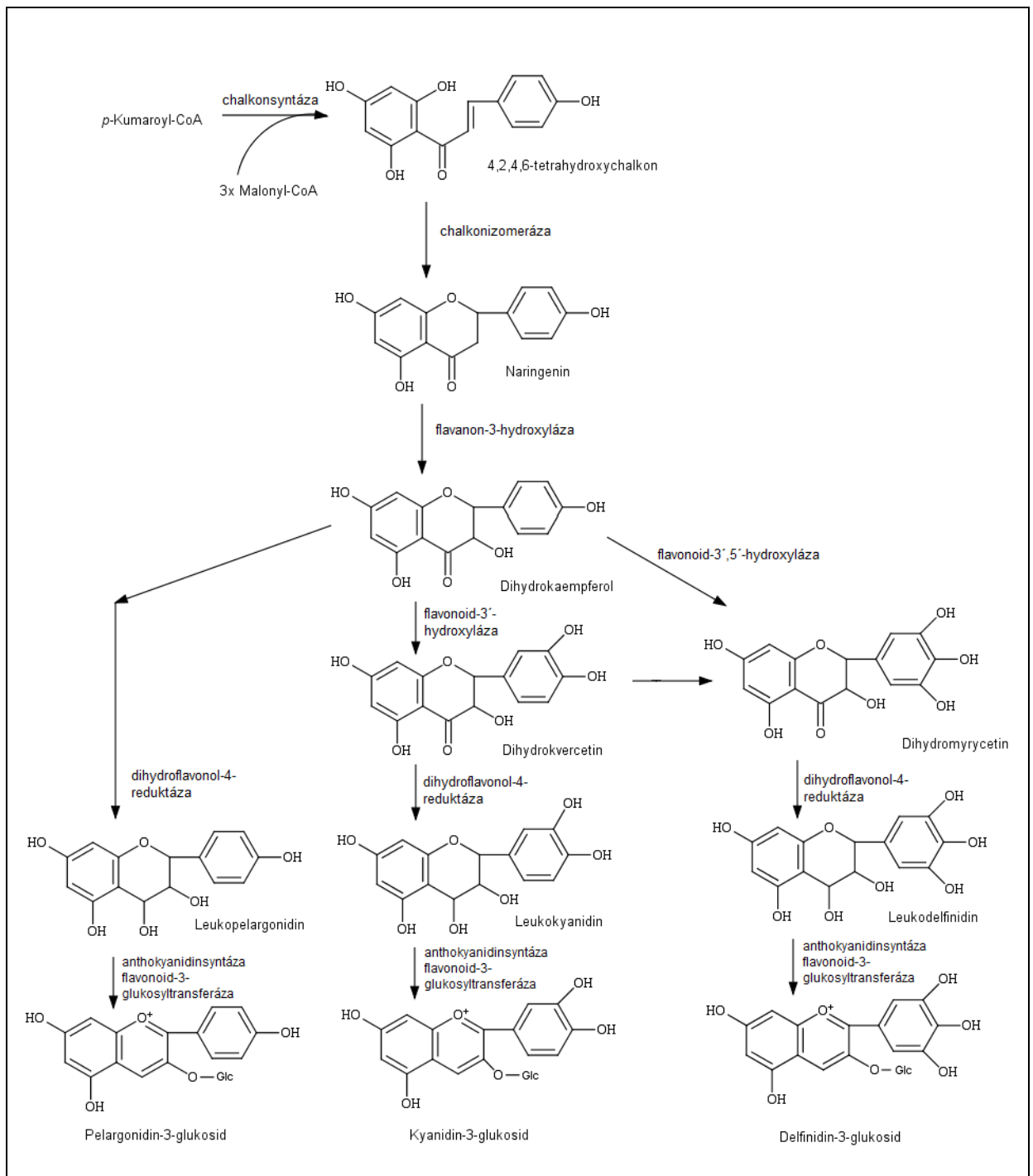
Klíčovým mechanismem tvorby anthokyanů je kondenzace tří molekul malonyl-CoA a *p*-kumaroyl-CoA katalyzovaná chalkonsyntázou. Produktem této reakce je žlutě zbarvený chalkon (4,2,4,6-tetrahydroxychalkon či naringenin chalkon). Biosyntetická cesta dále vede k ostatním třídám flavonoidů, kumarinů, polyfenolů a nakonec k anthokyanům.<sup>64, 164)</sup>

Malonyl-CoA je syntetizován z acetyl-CoA a CO<sub>2</sub>. Ester koenzymu A a hydroxyskořicové kyseliny *p*-kumaroyl-CoA vzniká přes fenylalanin. Tato aminokyselina je tvořena pomocí enzymů šikimátové dráhy, která začíná aldolovou kondenzací fosfoenolpyruvátu a erytróza-4-fosfátu, dvou produktů karbohydrátového metabolismu. Enzym fenylalanin amonium lyáza odnímá aminoskupinu fenylalaninu a vytváří kyselinu skořicovou. 4-hydroxyláza kyseliny skořicové z enzymatického systému monooxygenáz cytochromu P450, přidává do molekuly hydroxylové skupiny a vzniká *p*-kumarát. Koenzym A ligáza aktivuje *p*-kumarát připojením CoA na tříuhlíkatý postranní řetězec (**Obr. č. 6**). Poté nastává kondenzace *p*-kumaroyl-CoA s třemi molekulami malonyl-CoA s pomocí chalkonsyntázy a vytváří se 15 uhlíkatý flavonoidní skelet. Ve většině rostlinných druhů se jedná o naringenin-chalkon. Chalkon syntetizovaný chalkonsyntázou může být přeměněn na naringeninový flavonon (5,7,4-trihydroxyflavanon) enzymem chalkonizomerázou. Následující modifikace naringeninu vedou k vytvoření anthokyanů (**Obr. č. 7**).<sup>64, 65)</sup>



Obrázek č. 6: Biosyntéza *p*-kumaroyl-CoA – tzv. šikimátová dráha.





**Obrázek č. 7:** Biosyntéza anthokyanů.

### 3.5. Biologická aktivita rostlin rodu *Bergenia*

#### 3.5.1. Antioxidační aktivita

Antioxidanty hrají důležitou roli v tlumení a likvidaci volných radikálů a poskytují tak ochranu před infekcí a degenerativními chorobami. Syntetické antioxidanty bývají často zakazovány pro svoji toxicitu. Proto roste zájem o bezpečnější přírodní antioxidanty, které můžeme získávat i z rostlinných extraktů bergenií.

Několik druhů bergenií již bylo podrobeno studiu antioxidační aktivity. Vodné, metanolové a etanolové extrakty *B. ciliata* a *B. crassifolia* vykazují antioxidační aktivitu proti 1,1-difenyl-2-picrylhydrazylvému radikálu (DPPH) a hydroxylovému radikálu. Nejúčinnější přitom byly 70% etanolové extrakty ze zelených listů *B. crassifolia*. Dále byla zjištěna schopnost extraktů bergenií redukovat kationty  $Fe^{2+} - Fe^{3+}$  a tlumit lipidovou peroxidaci. Prokázána byla také ochrana molekuly DNA proti oxidativním změnám metodou UV fotolýzy za přítomnosti peroxidu vodíku. Separací individuálních složek ze zelených, hnědých a černých listů (analýzou HPTLC s DAD detektorem) a následným měřením aktivity DPPH bylo zjištěno, že největší aktivitu vykazovala kyselina gallová, poté arbutin, kyselina ellagová, hydrochinon a kyselina askorbová (s hodnotami  $ID_{50}$  0,488; 0,879; 0,937; 1,227 a 3,080 nmol). Antioxidační aktivita zelených listů je způsobena vysokým obsahem arbutinu, naproti tomu hlavní bioaktivní složkou extraktu z černých listů je kyselina gallová. Antiradikálová aktivita *B. crassifolia* tak souvisí s vysokým obsahem fenolických látek. I z dalších studií vyplývá, že metanolové extrakty *B. ciliata* chrání biomolekuly před oxidačními změnami a mají protizánětlivý účinek.<sup>66)</sup> Také antioxidační aktivita bergeninu byla prokázána DPPH metodou a Fentonovou reakcí.<sup>67, 68)</sup> Významné antioxidační účinky vykazují také některé deriváty bergeninu a katechiny: (+)-katechin 3-O-gallát a (+)-katechin 3,5-di-O-gallát.<sup>12, 54, 69,</sup>

70)

### 3.5.2. Antibakteriální aktivita

Antibakteriální účinky byly prokázány u druhu *B. ciliata*, *B. ligulata* a *B. purpurascens*.<sup>71 - 73)</sup>

Vodné, etanolové, hexanové, etylacetátové, chloroformové a butanolové extrakty z kořenů a listů *B. ciliata* (5 mg.ml<sup>-1</sup>) byly testovány proti deseti různým druhům grampozitivních a gramnegativních bakterií. Jejich kultury byly připraveny kultivací na sójovém agaru (TSA). Všechny výše uvedené kořenové extrakty zastavují růst bakterií *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kromě butanolových a etanolových, jsou všechny ostatní kořenové extrakty účinné i proti *Escherichia coli*. Etanolové, hexanové, butanolové a chloroformové extrakty nebyly účinné proti *Streptococcus viridians*. Žádný z extraktů není aktivní proti *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi para* a *Shigella sonnei*. Při studiu antimikrobiální aktivity různých listových extraktů z *B. ciliata* byl prokázán účinek proti *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, u vodných, chloroformových a butanolových pak i proti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* a *Bacillus micrococcus*. Žádný z listových extraktů neprokázal aktivitu proti *Streptococcus viridians*, *Salmonella typhi* a *Shigella sonnei*. Fungicidní účinek extraktů byl dokázán proti *Microsporium canis*, *Pleuroetus oustreatus* a *Candida albicans*. Za účinnou antimikrobiální aktivitu extraktů z bergénie jsou pravděpodobně zodpovědné benzenové kumariny, steroidy a třísloviny.<sup>25, 33)</sup> V rámci studia antibakteriální aktivity bergeninu, izolovaného z *B. stracheyi*, byl prokázán účinek proti *Escherichia coli*.<sup>74 - 76)</sup>

Také extrakty z oddenků *B. ligulata* (10, 25 a 50 mg.ml<sup>-1</sup>) byly testovány pro svoji schopnost inhibovat růst *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Streptococcus aureus*. V dávce 50 mg.ml<sup>-1</sup> byl antibakteriální efekt extraktů nejprůkaznější. Antimikrobiální účinek byl srovnatelný s ciprofloxacinem (25 mg.ml<sup>-1</sup>).<sup>33, 73)</sup>

Antimikrobiální aktivita listových extraktů z *B. crassifolia* byla prokázána proti *Pseudomonas aeruginosa* v koncentraci 25 mg.ml<sup>-1</sup>, proti *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus* spp. v koncentraci 3,125 mg.ml<sup>-1</sup>. 80% etanolové listové extrakty byly účinnější proti *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *E. coli* a *S. aureus*. Zatímco kořenové extrakty byly účinnější proti *B. cereus*, *Candida albicans* a *E. coli*.<sup>12, 77)</sup>

### 3.5.3. Antivirová aktivita

Výzkum různých rostlin používaných v tradiční nepálské medicíně prokázal, že metanolové extrakty *B. ciliata* také vykazují významnou antivirovou aktivitu. Z důvodu buněčné toxicity hexanu a dichlormetanu, byly pro testování použity pouze metanolové extrakty. Aktivita byla zkoumána proti viru lidské chřipky typu A (H1N1) a proti viru Herpes simplex typu 1 (HSV-1). Infikovanými buňkami se staly buňky typu MDCK a Vero. Antivirová aktivita byla měřena s pomocí zjištění inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> (koncentrace, která ochrání 50 % buněk před destrukcí virem). Extrakt z *B. ciliata* prokázal vysokou aktivitu proti viru HSV-1, s koncentrací menší než 6,25 μg.ml<sup>-1</sup>, proti viru chřipky A pak s koncentrací 8 až 10 μg.ml<sup>-1</sup>.<sup>78</sup>  
-<sup>80)</sup> Vysokou antivirovou aktivitu vykazují v rostlině obsažené fenolické látky.

*B. ligulata*, která je taxonomicky blízce příbuzná s *B. ciliata*, brzdí růst viru chřipky typu A v buněčných kulturách s koncentrací IC<sub>50</sub> kolem 10 μg.ml<sup>-1</sup>. Její extrakt rovněž inhibuje virový protein a syntézu virové RNA nukleové kyseliny.<sup>33)</sup>

Také listové extrakty *B. crassifolia* byly testovány proti viru Herpes simplex (HSV-2). Vodný extrakt inhiboval virem indukovaný cytopatický efekt z 95 % při koncentraci 1,5 – 15 μg.ml<sup>-1</sup>. Inhibiční aktivita galloyl glukosidu byla testována *in vitro* také proti virové hepatitidě typu C. Inhibice penta- a tri-galloyl-β-D-glukósy byla při koncentraci 100 μg.ml<sup>-1</sup> v rozmezí 98,7 až 94,7%.<sup>12)</sup>

### 3.5.4. Antimalarická aktivita

Malárie je jednou z hlavních příčin vysoké morbidity a mortality v mnoha tropických a subtropických oblastech. Životní cyklus malarických parazitů zahrnuje dva hostitele. Během sání infikované samice komára rodu *Anopheles* dochází spolu se slinami k inokulaci sporozoitů do člověka (mezihostitel). Sporozoiti infikují jaterní buňky, kde se množí a mění ve schizonty (merozoity), kteří se uvolňují z infikovaných buněk. Po této iniciální replikaci v játrech, se paraziti nepohlavně rozmnožují v erythrocytech. Krevní stádia jsou zodpovědná za klinickou manifestaci onemocnění.<sup>81, 82)</sup>

Etanolové extrakty *B. ciliata* byly testovány na antimalarickou aktivitu *in vivo* u myší. Listové extrakty vykazovaly aktivitu proti původci malárie, parazitickému prvokovi rodu *Plasmodium berghei*. Akutní toxicita extraktu byla stanovena na  $> 5 \text{ g.kg}^{-1}$  (*per oral*). Extrakty v dávkách 250, 500, 750 a 1 000  $\text{mg.kg}^{-1}$  inhibovaly vytváření schizontů v napadených jaterních buňkách ( $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) z 69,68 %; 81,38 %; 86,54 % a 87,5 %. Standardní látka užívaná k léčbě a chemoprolaxi malárie chlorochin ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) inhibovala vytváření schizontů z 96,82 %.<sup>81)</sup>

### 3.5.5. Imunostimulační a protizánětlivá aktivita

Účinek listových extraktů bergenií na specifickou imunitní odpověď byl testován u myší *in vivo* (s minimálním množstvím arbutinu kolem 18 %). Extrakty vedly k normalizaci obsahu imunokompetentních buněk ve slezině testovaných zvířat. Extrakty snížily projev zánětlivého procesu zabráněním akumulace lymfocytů a redukcí schopnosti buněk produkovat cytokiny. Hlavní vliv na redukcí prozánětlivých cytokininů přitom vykazuje arbutin a bergenin.<sup>12)</sup> Bergenin je selektivním inhibitorem cyklooxygenázy COX-2 *in vitro*, naproti tomu není aktivní proti cyklooxygenáze COX-1 a fosfolipáze A2. Ošetření myší bergeninem v dávce 50

a  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vedlo ke snížení hyperalgezie, edému a snížilo produkci cytokininů (TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ ).<sup>83)</sup>

Z čerstvě nasbíraných zelených listů *B. crassifolia* byl extrakcí vodným roztokem šťavelanu amonného a následným vysrážením etanolem, získán pektinový polysacharid bergenan. Podávání roztoku bergenanu myším ( $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) po dobu 3 týdnů se projevilo zvýšením imunitní odpovědi typu DTH (opožděná hypersenzitivita). DTH je součástí imunitní odpovědi na mnoho nitrobuněčných infekcí mikroorganismy, speciálně těch, které způsobují chronická onemocnění. Tímto *in vivo* pokusem tak byl odhalen stimulační efekt bergenanu na T – lymfocyty a další pomocné buňky potřebné k vyvolání reakce. Bergenan byl dále schopen během *in vitro* testování zvýšit absorpční kapacitu lidských neutrofilů při koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a stimuloval vznik kyslíkových radikálů peritoneálními makrofágy myší. Mechanismus stimulačního efektu pektinů na fagocytující buňky zatím není znám. Je možné, že bergenan zvyšuje fagocytózu rozšířením buněčné přilnavosti.<sup>84, 85)</sup>

Metanolové extrakty *B. ciliata* a *B. ligulata* vykazují významnou protizánětlivou aktivitu. Testování probíhalo na zvířecích modelech. Extrakty v dávce  $300 \text{ mg}$  na  $\text{kg}$  tělesné hmotnosti způsobily maximální úbytek edému z  $32,4 \%$ , který byl indukován pomocí karagenanu.<sup>86)</sup>

### **3.5.6. Protirakovinná aktivita**

Etanolové extrakty ( $40\%$ ) z oddenků *B. crassifolia* vykazují cytotoxicitu proti lidským lymfoblastickým buňkám a zabraňují jejich růstu téměř ze  $100 \%$  při koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , zatímco alkoholové extrakty ze zelených listů jsou méně aktivní a inhibují jejich růst z  $82 \%$  při stejné koncentraci.<sup>87)</sup> Pedunculagin (ellagotanin izolovaný ze zelených listů bergénií) má *in vivo* cytotoxický efekt proti chronické lymfatické leukémii, promyelocytické leukémii a lymfoidním nádorům. Protirakovinné účinky vykazují také extrakty z *B. ciliata*.<sup>12, 25)</sup>

Metanolvé a vodné extrakty z oddenků *B. ciliata* mají chemoterapeutické využití díky potenciálnímu působení proti vedlejším účinkům léků, které jsou využívány k zacílení nádorů, s cílem zjistit stav rakovinného růstu a malignity.<sup>25)</sup>

### 3.5.7. Antidiabetická aktivita

Metanolvý extrakt (50%) z oddenků *B. ciliata* vedl k izolaci dvou aktivních složek 3-O-galloylepikatechinu a 3-O-galloylkatechinu, které vykazují enzymovou inhibiční aktivitu *in vivo* proti střevní  $\alpha$ -glukosidáze a pankreatické  $\alpha$ -amyláze.<sup>25, 88)</sup>

Bergenin (v dávce  $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ per oral}$ ) snižuje hladinu krevní glukózy *in vivo* u zdravých myší, které byly vystaveny funkčnímu zátěžovému testu oGTT (orální glukózový toleranční test). Ten hodnotí, zda je organismus schopen udržet hladinu glukózy v krvi v normálu i po zátěži. Histopatologické studie také ukazují regenerativní efekt bergeninu na pankreatické  $\beta$  buňky.<sup>12, 89)</sup> Etanolvé extrakty *B. himalaica* působí na uvolňování inzulínu. Testování probíhalo *in vitro* s použitím buněk INS-1 v přítomnosti glukózy.<sup>90)</sup> Antidiabetický potenciál těchto látek může pomoci s vývojem potravních doplňků a přírodních léčiv pro osoby trpící diabetem.

Etanolvé (70%) extrakty z oddenků *B. crassifolia* inhibují lidskou pankreatickou lipázu *in vitro*. Extrakty z černých fermentovaných listů *B. crassifolia* ( $50 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ per oral}$ , 7 dní) mají schopnost ovlivnit energetický příjem u myší s indukovanou obezitou. Denní kalorický příjem u zkoumané skupiny tak klesl o 40 % v porovnání s kontrolou. Po sedmi dnech došlo k průkazné úpravě glukózové tolerance. Deriváty galloyl-bergeninu vykazují také antilipidovou akumulaci *in vitro*.<sup>12)</sup>

### 3.5.8. Antitusická aktivita

Metanolové extrakty oddenků z *B. ciliata* byly zkoumány pro svůj potenciál tlumit kašel indukovaný oxidem siřičitým *in vivo* u myší. Antitusická aktivita extraktů (10 mg.kg<sup>-1</sup> tělesné váhy) byla srovnatelná s fosforečnanem kodeinu. Extrakty v dávkách 100, 200 a 300 mg.kg<sup>-1</sup> vykazovaly jednoznačný pokles kašlacího reflexu o 28,7; 33,9 a 44,2 % v rámci 90 minutového experimentu.<sup>25)</sup> Také samotný arbutin (v dávkách 50 a 100 mg.kg<sup>-1</sup> *per oral*) snižuje intenzitu a frekvenci kašle u koček.<sup>12)</sup>

### 3.5.9. Diuretická aktivita

Etanolové extrakty *B. ligulata* vykazují diuretickou aktivitu *in vivo*.<sup>33)</sup> Nízké dávky extraktů (0,5 mg.kg<sup>-1</sup>) podporují diurézu, ve vyšších dávkách naopak vylučování moči redukuje (100 mg.kg<sup>-1</sup>). Podáváním arbutinu myším se zvýšilo vylučování moči, doprovázené zvýšeným vylučováním kreatininu a draslíku, zatímco hydrochinon způsobil vyšší vylučování moči bez ovlivnění exkrece kreatininu a draslíku.<sup>91)</sup>

Alkoholové extrakty *B. ligulata* a *B. ciliata* mají pozitivní účinek na rozpouštění ledvinových a močových kamenů, indukovaných s pomocí krystalů hydrogen fosfátu vápenatého v médiu ze silikagelu.<sup>92, 93)</sup> Extrakty z oddenků *B. ligulata* inhibují agregaci krystalů šřavelanu vápenatého, stejně tak i vytváření krystalů v metastabilních sloučeninách.<sup>33)</sup>

### 3.5.10. Hepatoprotektivní aktivita

Hepatoprotektivní účinky extraktů z *B. crassifolia* (v dávkách 50 mg.kg<sup>-1</sup>) byly prokázány *in vivo* u myší intoxikovaných kyselinou allyloctovou. Arbutin má ochranný účinek proti *tert*-butyl hydroperoxidu. Bergenin vykazuje ochranný účinek proti indukovanému poškození jater D-galaktosaminem u myší.<sup>94)</sup> Podáváním bergeninu (v dávkách 20 – 200 mg.kg<sup>-1</sup>, *per oral*, 7



dní) se snížila enzymatická aktivita alanin/aspartát aminotransferázy, sorbitol dehydrogenázy,  $\gamma$ -glutamyltransferázy a zvýšila se hladina malondialdehydu. Bergenin obnovuje snížené množství jaterního glutationu a snižuje aktivitu glutation transferáz a reduktáz. <sup>12)</sup> Bergenin taktéž redukuje aktivitu transamináz a dehydrogenáz, uvolňovaných z tetrachlormethanem intoxikovaných jaterních buněk u laboratorních potkanů. <sup>95, 96)</sup> Etanolové extrakty z oddenků *B. ligulata* také mají prokazatelný hepatoprotektivní účinek. Tato aktivita byla zkoumána měřením hladin sérové glutamát-pyruvát transaminázy, glutamát-oxalacetát transaminázy, fosfatázy a celkového bilirubinu. <sup>33)</sup>

### **3.5.11. Tyrozinázová aktivita**

Melanin, odvozený od aminokyseliny tyrozinu, hraje důležitou roli v ochraně pokožky před škodlivými ultrafialovými paprsky, určuje fenotyp, absorbuje škodlivé látky a chemikálie. Jeho nejběžnější formou je hnědočerný polymer eumelanin, druhou formou pak červenohnědý polymer feomelanin. Barva kůže závisí na množství, velikosti a typu melaninu, který je produkován melanocyty. Melanocyty jsou dendritické buňky v těsném kontaktu s blízkými epidermálními keratinocyty. Abnormální akumulace melaninu způsobuje výskyt hyperpigmentace, melasmy či pigmentových skvrn. Katalyticky aktivní tyrozináza je klíčovým enzymem, který se účastní tří odlišných reakcí syntézy melaninu v melanocytech v procesu zvaném melanogeneze (protein TRP 1 a 2). Nejprve katalyzuje hydroxylaci tyrozinu na DOPA a poté oxidaci DOPA na DOPA-chinon. TRP 2 (DOPA-chrom tautomeráza) katalyzuje přeměnu DOPA-chromu na 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou kyselinu (DHICA), TRP 1 oxiduje karboxylovou kyselinu na indol-chinon. Inhibitory tyrozinázy mají potenciál při ošetřování pacientů s hyperpigmentací a jsou využívány v kosmetice jako zesvětľující látky. Arbutin, je jako inhibitor tyrozinázy využíván v tradiční

indické medicíně pro zesvětlování pokožky a je součástí komerčně dostupných kosmetických přípravků.<sup>97, 98)</sup>

### 3.5.12. Vedlejší účinky a toxicita

Jak uvádí Sokolov a kol.<sup>99)</sup> ruská oficiální medicína doporučuje jako bezpečnou denní dávku výluhu z oddenku *B. crassifolia* (10 g na 200 ml vody) pro vnitřní užití 1 až 2 polévkové lžice třikrát denně. V Rusku jsou tyto výluhy dostupné v lékárnách bez receptu. Extrakty z černých fermentovaných listů *B. crassifolia* (10 g/100 ml vody) byly podávány po sedm dní myším v dávce  $9 \text{ ml.kg}^{-1}$ , tato dávka byla shledána jako bezpečná. Po týdenním podávání v množství  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  za den taktéž nebyla zjištěna žádná toxicita.<sup>11, 12)</sup>

Užívání bergeninu a norbergeninu bylo shledáno jako bezpečné až do dávky  $2\,000 \text{ mg.kg}^{-1}$ , bez zjevné změny v chování nebo úmrtnosti testovaných zvířat. Intraperitoneální podávání bergeninu v dávce  $50$  a  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  nezpůsobilo žádné viditelné tělesné změny či známky intoxikace. Bergenan ze zelených listů *B. crassifolia* byl taktéž shledán netoxickým, a neprokázal žádný vliv na změnu hmotnosti myši.<sup>8)</sup> Studium akutní toxicity arbutinu (v dávce  $1\,000$  a  $2\,000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) neukázalo žádné abnormální změny v chování, tělesné hmotnosti a nevedlo k výskytu jakýchkoliv makroskopických nálezů.<sup>100)</sup> Toxicita arbutinu nebyla prokázána ani po intraperitoneálním podávání v dávce  $8\,000 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Neměl žádný vliv na svalovou kontrakci, respirační aktivitu, krevní tlak ani na činnost srdce.<sup>11)</sup> Hydrochinon (0,05% až 0,2%) podávaný v denních dávkách pokusným myším nezpůsobil změnu tělesné či jaterní hmotnosti. Mikroskopickým vyšetřením bylo navíc zjištěno, že snížil velikost jaterního nádoru, který byl indukován 2-acetylaminofluorenem. Lidé tolerují hydrochinon až do denní dávky  $450 \text{ mg}$  nebo  $6,5 \text{ mg}$  na kilogram tělesné hmotnosti při pětiměsíčním užívání.<sup>101)</sup>

Naopak Chauhan a kol. udává, že *B. ciliata* může v některých případech vykazovat silnou toxicitu.<sup>25)</sup> Nitrokožní podání způsobilo vznik erytému a edému. Akutní systematická toxicita se projevovала dýchacími problémy a gastro-intestinálními problémy u experimentálního modelu zvířat. Mechanismus toxického účinku je předmětem zkoumání.<sup>33)</sup> Některé zdroje udávají, že extrakty z bergenií mohou ve vyšších dávkách působit hepatotoxicky či nefrotoxicky. Doposud však nebyla provedena žádná klinická studie toxického účinku extraktů z bergenií.<sup>25)</sup>

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1. Materiál a metody**

#### **4.1.1. Použité chemikálie**

**Acetonitril**, HPLC grade, Merck (Německo)

**Arbutin**, > 98%, Fluka (Německo)

**2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (ABTS)**, >99%, Sigma Aldrich (Německo)

**Bergenin**, analytical standard, Fluka (Německo)

**β-nikotinamid adenin dinukleotid (NADH)**, ≥95%, Sigma Aldrich (Německo)

**COX-1 (cyklooxygenáza)**, ≥30 000 units/mg, Sigma Aldrich (Německo)

**DAPI dihydrochlorid**, ≥98%, Sigma Aldrich (Německo)

**1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl (DPPH)**, >85%, Fluka (Německo)

**Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného**, p.a., Kemika (Chorvatsko)

**Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného**, p.a., Kemika (Chorvatsko)

**Dimetylsulfoxid (DMSO)**, ≥99,6%, Sigma Aldrich (Německo)

**Etanol**, HPLC grade, Sigma Aldrich (Německo)

**Etylacetát**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Heparin**, analytical standard, Fluka (Německo)

**Heptan**, p.a., Merck (Německo)

**Hexahydrát chloridu železitého**, p.a., Riedel-de Haën, Sigma Aldrich (Německo)

**Hexakvanoželezitan draselný**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Chlorid cínatý**, p.a., Sigma Aldrich (Německo)

**Chloroform**,  $\geq 99,5\%$ , Merck (Německo)

**Kožní prášek**, Sigma Aldrich (Německo)

**Kyselina acetylsalicylová (ASA)**, analytical standard, Sigma Aldrich (Německo)

**Kyselina arachidonová**, p.a., Sigma Aldrich (Německo)

**Kyselina askorbová**, p.a., Fagron (Česká republika)

**Kyselina citrónová**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Kyselina gallová**,  $>98\%$ , Fluka (Španělsko)

**Kyselina chlorovodíková**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Kyselina sírová**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Kyselina trihydrogenfosforečná**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Kyselina trichloroctová (TCA)**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**L-DOPA**,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Médium RPMI, 1640**, Sigma Aldrich (Německo)

**Metanol**, HPLC grade, Sigma Aldrich (Německo)

**5-metylfenazinium-metyl-sulfát (PMS)**,  $\geq 90\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Monoklonální protilátky**, CD 69 PE, Immunotech (Francie)

**MTT Formazan (Thiazolyl formazan)**,  $\geq 97\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Nile Red (Nile blue A oxazone)**, for microscopy, Sigma Aldrich (Německo)

**Nitrotetrazoliová modř (NBT)**,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Paraformaldehyd**,  $\geq 95\%$ , Fluka (Německo)

**PBS (Phosphate Buffered Saline)**, pH 7,4, Sigma Aldrich (Německo)

**Peroxodisíran amonný**,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Petrolether**, p.a., Penta Chrudim (Česká republika)

**Phytohemaglutinin (PHA)**,  $> 95\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

**Polyetylen glykol (PEG)**, reference standard, Fluka (Německo)

**Pycnogenol<sup>®</sup>**, Biolandes (Francie)

**Tyrozináza**, T3824,  $\geq 1\ 000$  unit/mg, Sigma Aldrich (Německo)

**Vanilín**, 99%, Sigma Aldrich (Německo)

**X-VIVO médium**, Bio-Wittaker (USA)

#### **4.1.2. Přístrojové vybavení**

**Agregometr**, Multiplate, Cobas/Roche (Švýcarsko)

**Analytické váhy**, Santorius A2005 (Německo)

**Centrifuga**, Centric 400R, Tehtnica (Slovinsko)

**Cytometr**, Cytomics FC500, Beckman Coulter (USA)

**Elektrický mlýnek**, ETA 0010 (Česká republika)

**Fluorescenční mikroskop**, Leica DM 4 000 (Německo)

**Kryostat**, Leica CM 1950 (Německo)

**Lyofilizační přístroj**, Heto PowerDry LL3 000 (Česká republika)

**Spektrofotometr UV-VIS**, Nanocolor, Macherey-Nagel (Německo)

**Spektrofotometr UV/VIS**, Shimadzu UV-1601 (Japonsko)

**Sušárna**, Binder (Německo)

**Světelný mikroskop s fotozařizním**, Leica DM 1000 (Německo)

**Ultrazvuková vodní lázeň**, Sonorex RK 100H, Bandelin (Německo)

**Versa Max ELISA Microplate Reader**, Molecular Devices (USA)

**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**, Hitachi s L-7400 UV detektorem (USA)

**Použitý software:** Vzorce chemických sloučenin byly vytvořeny programem MarvinSketch 5.10.2., statistické analýzy programem GraphPad Prism 6.

#### **4.1.3. Rostlinný materiál**

Listy druhů *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. a *Bergenia x ornata* Stein. byly sbírány vždy na podzim a na jaře v průběhu let 2011 až 2013 v Botanické zahradě Zahradnické fakulty Mendelovy Univerzity v Lednici. Pěstební plochy bergenií jsou zachyceny na **Obrázku č. 58 – 60**. Detail květu *B. crassifolia* je pak na **Obrázku č. 61** (viz kapitola Obrazová příloha). Sbírané rostlinné druhy byly vždy přesně odborně identifikovány, označeny a rozděleny (podle barvy listů na červeně a zeleně zbarvené). Sledované rostliny byly vysety v roce 2004 a vysazeny v roce 2005. Celkem bylo za celé sledované období nasbíráno 130 vzorků. Z nich byl pak vybrán užší výběr 32 vzorků pro testování biologických aktivit (**Tab. č. 5**). Rostlinný materiál byl usušen v sušárně při 40 a 50°C, poté byl rozdrobňen elektrickým mlýnkem na prášek o velikosti částic přibližně 0,1 mm.

#### **Příprava lyofilizovaných rostlinných extraktů**

Pro stanovení tyrozinázové, antiparazitické, imunostimulační a antiagregační aktivity a pro stanovení inhibice COX-1 byly připraveny etanolové a pro porovnání i vodné lyofilizované rostlinné extrakty bergenií. 2 g rozdrobňené drogy byly extrahovány 30 ml etanolu (60%, w/w) nebo 30 ml destilované vody v ultrazvukové vodní lázni Sonorex RK 100H po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Extrakt byl poté zfiltrován, znovu promyt 2 x 5 ml etanolu či vody. Filtráty byly spojeny a znovu přefiltrovány. Takto připravené extrakty byly zamrazeny a lyofilizovány na přístroji Heto PowerDry LL3000. Vysušený extrakt byl převeden do 10 ml lahvíček, uzavřen a skladován bez přístupu světla při teplotě -18°C až do začátku měření. Pro



ostatní stanovení byly připraveny jednotlivé extrakty samostatně tak, jak je uvedeno u konkrétní metodiky.

**Tabulka č. 5:** Seznam vzorků zelených (z) a červených (č) listů z jednotlivých bergenií označených písmeny (BCR – *B. crassifolia*; BOR – *B. x ornata*, BCL – *B. ciliata*) a čísly (jedná se o označení konkrétní rostliny). Z každé rostliny byly odebírány listy v průběhu jarního (J) a podzimního (P) období v letech 2011 až 2013 (viz termín sběru). Rostlinný materiál byl sušen při různých teplotách (40 nebo 50°C).

Druh	Číslo vzorku	Barva listů	Termín sběru	Teplota sušení °C	Číslo vzorku	Barva listů	Termín sběru	Teplota sušení °C
<i>B. crassifolia</i>	BCR 1	z	P 2011	40	BCR 3	z	P 2012	50
	BCR 2	z	P 2011	40	BCR 3	č	P 2012	50
	BCR 3	z	P 2011	50	BCR 5	z	P 2012	50
	BCR 1	z	J 2012	50	BCR 5	č	P 2012	50
	BCR 2	z	J 2012	50	BCR 6	z	P 2012	50
	BCR 3	z	J 2012	50	BCR 1	z	J 2013	50
	BCR 4	z	J 2012	50	BCR 4	z	J 2013	50
	BCR 1	z	P 2012	50	BCR 5	z	J 2013	50
	BCR 2	z	P 2012	50	BCR 6	z	J 2013	50
	BCR 2	č	P 2012	50				
<i>B. ciliata</i>	BCL 1	z	P 2011	40	BCL 1	č	P 2012	50
	BCL 1	z	J 2012	50	BCL 2	z	J 2013	50
	BCL 2	z	P 2012	50	BCL 1	z	J 2013	50
	BCL 1	z	P 2012	50				
<i>B. x ornata</i>	BOR 1	z	P 2011	40	BOR 1	z	P 2012	50
	BOR 1	z	J 2012	50	BOR 1	č	P 2012	50
	BOR 2	z	J 2012	50	BOR 1	z	J 2013	50

#### **4.1.4. Vliv klimatických podmínek na sběr rostlinného materiálu**

Jedním z cílů této práce bylo také určení nejvhodnější doby pro sběr rostlinného materiálu. Pro určení vlivu klimatických podmínek na obsah sekundárních metabolitů a s tím spojenou biologickou aktivitu, byly porovnávány hodnoty ze stanovení obsahových látek s meteorologickými údaji (**Tab. č. 5**) ze sběrné meteorologické stanice Mendelovy Univerzity v Lednici (164 m n. m.), kde probíhal sběr veškerého rostlinného materiálu. Tento sběr probíhal v letech 2011 až 2013 vždy v měsících květen a říjen.

#### **4.1.5. Stanovení obsahu sekundárních metabolitů**

U všech metod stanovení obsahu sekundárních metabolitů byla do výsledných hodnot započítána vypočtená ztráta sušením. Ztráta sušením byla stanovena dle metodiky uvedené v Českém lékopise 2009. Množství sekundárních metabolitů pak bylo vyjádřeno v mg na g sušiny.<sup>102)</sup> Do stanovení obsahu arbutinu a celkových polyfenolů bylo zahrnuto 130 vzorků bergénií z jarních a podzimních sběrů z let 2011 až 2013. Z nich pak bylo vybráno 32 obsahově statisticky významných vzorků, které byly zahrnuty do stanovení obsahu bergeninu a biologických aktivit.

##### **4.1.5.1. Stanovení obsahu arbutinu**

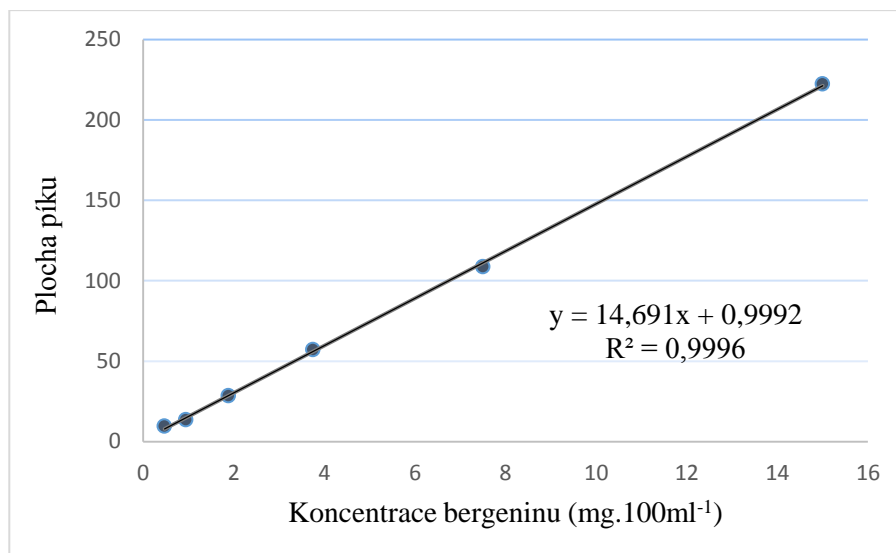
Celkové množství arbutinu v zelených a červených listech bergénií *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* bylo stanoveno dle lékopisné metodiky pro stanovení obsahu arbutinu u drogy *Uvae ursi folium* uvedené v Českém lékopise 2009.<sup>103)</sup>

#### 4.1.5.2. Stanovení obsahu celkových polyfenolů

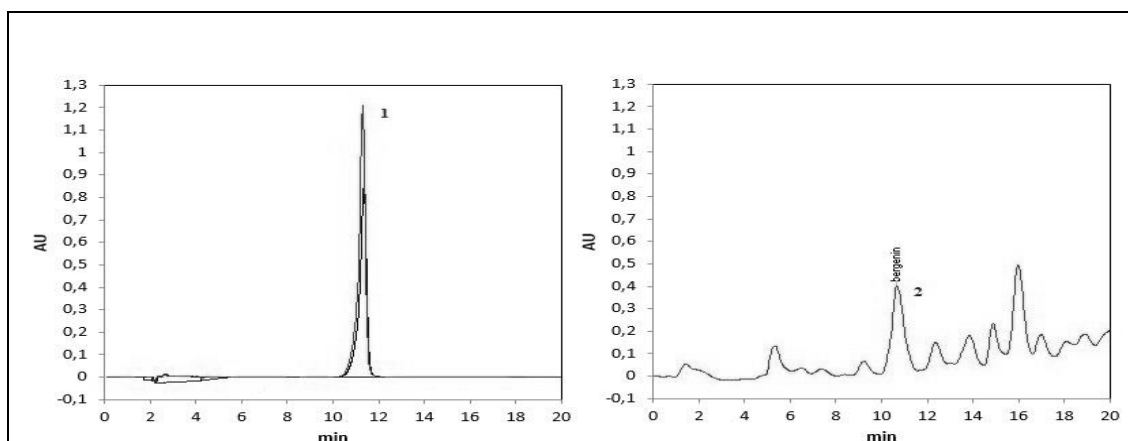
Celkové množství polyfenolů v zelených a červených listech bergénií *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* bylo stanoveno dle metodiky pro stanovení tříslovin v rostlinných uvedených v Českém lékopise 2009. <sup>104)</sup>

#### 4.1.5.3. Stanovení obsahu bergeninu metodou HPLC

Celkové množství bergeninu v zelených a červených listech sledovaných bergénií bylo provedeno dle metodiky pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), kterou popsali Reddy a kol. <sup>105)</sup> a Singh. a kol. <sup>106)</sup> s několika úpravami. 0,600 g sušených a rozmělněných listů (*B. crassifolia*, *B. ciliata*, *B. x ornata*, celkem 32 vzorků) bylo extrahováno 2 x 20 ml metanolu ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Extrakty byly zfiltrány a protřepány s 2 x 30 ml petroléteru a odpařeny. Všechny vzorky byly před vlastní analýzou zfiltrány přes membránový nylonový mikrofiltr (průměr 0,5 $\mu$ ). Pro chromatografickou analýzu byl zvolen multisolventní systém HPLC Hitachi s L-7400 UV detektorem, s použitím kolony Waters C 18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). Mobilní fáze se skládala z vody : acetonitrilu : kyseliny trihydrogenfosforečné (s lineárním gradientem od 94 : 5 : 1 do 69 : 30 : 1). Analýza trvala 20 minut při 25°C s průtokem mobilní fáze 1 ml/min. Detekce probíhala na DAD detektoru při vlnové délce 200 nm. Píky byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů s absorpčním spektrem s využitím standardu bergeninu (0,2 mg.ml<sup>-1</sup>). Množství bergeninu ve vzorcích bylo odečteno ze sedmibodové kalibrační křivky standardního bergeninu (koncentrace od 0,0125 do 0,2 mg.ml<sup>-1</sup>), (**Obr. č. 8**). Každý vzorek byl stanoven ve třech opakováních. Záznam HPLC chromatogramu standardního bergeninu a extraktu ze zelených listů *B. crassifolia* zobrazuje **Obrázek č. 9**. Množství bergeninu ve vzorku bylo vyjádřeno v mg na g sušiny.



**Obrázek č. 8:** Kalibrační křivka bergeniinu.

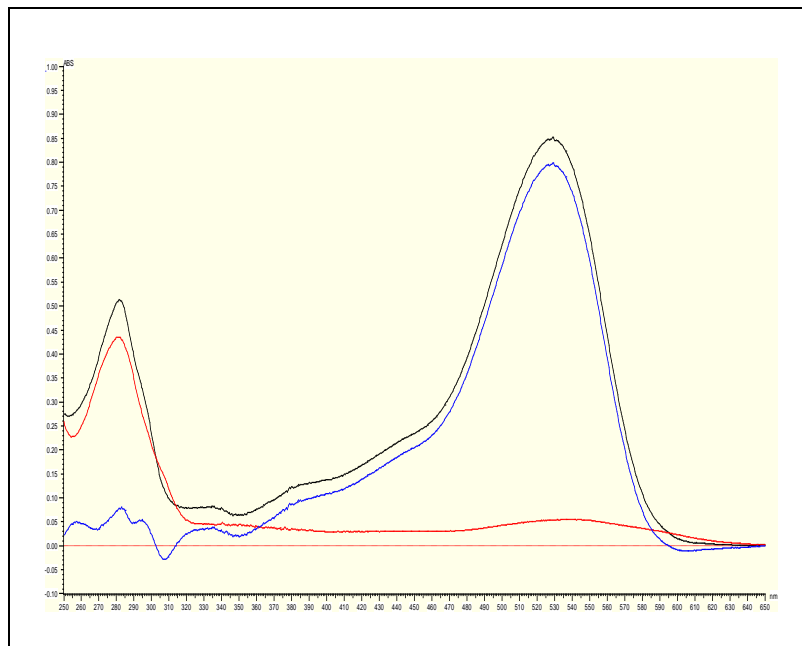


**Obrázek č. 9:** Záznam HPLC chromatogramu standardu bergeniinu (1) a extraktu ze zelených listů *B. crassifolia* (2).

#### 4.1.5.4. Stanovení obsahu anthokyanů

Metodika pro stanovení obsahu anthokyanů v listových extraktech bergenií byla upravena dle prací Giusti a kol.<sup>107)</sup> a Lee a kol.<sup>63)</sup> Obsah anthokyanů se nejčastěji vyjadřuje jako ekvivalent obsahu nejběžněji se vyskytujícího kyanidinu-3-*O*-β-glukosidu (C3G). S pomocí tohoto standardu byl také hodnocen obsah anthokyanů v červených listech bergenií. Zaznamenávala se vždy spektra (250 – 650 nm) barevné a bezbarvé formy standardu.

Diferenční křivka, která představuje rozdíl absorbance barevné a bezbarvé formy ve vhodné oblasti spektra (obvykle 380 – 600 nm), byla vyhodnocena pomocí automatického programu spektrofotometru (**Obr. č. 10**). Automatickým programem byla provedena integrace a zjištěna plocha pod diferenční křivkou.



**Obrázek č. 10:** Spektrální záznam standardu kyanidinu-3-*O*- $\beta$ -glukosidu; černá křivka - barevná forma anthokyanů; červená křivka - bezbarvá forma anthokyanů; modrá křivka - rozdílová (diferenční křivka).

Výsledná kalibrační křivka odpovídala závislosti plochy pod diferenční křivkou na koncentraci standardu ve vzorku. Kalibrační graf byl sestaven pomocí šesti dvojic kalibračních vzorků. Ze zásobního roztoku standardu o koncentraci 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (5 mg standardu na 25 ml 50% etanolu) byly připraveny dvě sady kalibračních roztoků, naředěných pufrům o pH 1,0 nebo 4,5 na koncentrace 2 – 25  $\mu\text{l}/\text{ml}$ . Kalibrační vzorky byly proměřeny spektrofotometrem s programem umožňujícím odečítání a integrace absorbancí. Pro výpočet koncentrace anthokyanů ve vzorku byla použita rovnice:

$$c (\mu\text{g C3G}\cdot\text{ml}^{-1}) = \Delta \text{AUC}_{380-600 \text{ nm}} / 5,6409$$

kde  $c$  ( $\mu\text{g C3G}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) je koncentrace anthokyanů v měřeném vzorku vyjádřená jako ekvivalent kyanidinu-3-*O*- $\beta$ -glukosidu;  $\Delta \text{AUC}_{380-600 \text{ nm}}$  je plocha pod diferenční spektrofotometrickou křivkou.

Pro stanovení anthokyanů byly použity rozemleté červené listy bergénií (vzorky z podzimního sběru 2012: BCR 3, BCR 5, BOR 1 a BCL 1). Vzorky rostlinného materiálu (20 g) byly homogenizovány 2 ml kyseliny citrónové. Dále bylo naváženo 1,1 g směsi, ke které se přidalo 10 ml 48% etanolu, roztok byl na 10 min vložen do ultrazvukové vodní lázně při laboratorní teplotě. Vzorky se centrifugovaly 15 min, při 5 000 ot. Získaný supernatant byl slit do kalibrované centrifugační zkumavky, ke zbytku se přidaly 4 ml etanolu a vzorek se znovu centrifugoval. Supernatanty se spojily a doplnily do 15 ml 48% etanolem. Z každého vzorku byl připraven vzorek C (naředění s 10 ml pufru C) a L (naředění s 10 ml pufru L). Pufr C: pro měření barevné formy: 0,025 M roztok KCl o  $\text{pH} = 1,0$  (1,86 g KCl do 1 000 ml 0,1M HCl). Pufr L: pro měření leukoformy: 0,4 M roztok octanu sodného o  $\text{pH} = 4,5$  (1,641 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  do 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Ředění bylo upraveno podle intenzity zbarvení vzorku tak, aby absorbance barevné formy (C) spadala do rozsahu kalibrační křivky. Jako slepý vzorek byl použit pufr C respektive L. Vzorky byly měřeny při vlnové délce 250 – 700 nm. S pomocí programu spektrofotometru se vyhodnotila diferenční křivka a vypočítala plocha pod diferenční křivkou v rozsahu vlnových délek 380 – 600 nm. Pomocí rovnice kalibrační křivky kyanidinu-3-*O*- $\beta$ -glukosidu byla z ploch pod diferenční křivkou vypočítána koncentrace anthokyanových barviv v  $\mu\text{g C3G}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Výsledný obsah anthokyanů byl vyjádřen v ekvivalentu kyanidinu-3-*O*- $\beta$ -glukosidu v  $\text{mg C3G}\cdot\text{g}^{-1}$  rostlinného materiálu.

#### **4.1.6. Biologická aktivita**

##### **4.1.6.1. Antioxidační a antiradikálová aktivita**

Použité metodiky měření antioxidační a antiradikálové aktivity vycházely z diplomové práce Krakar.<sup>108)</sup> Z důvodu validace upravených metod byla vyhodnocena jejich denní a mezi-denní opakovatelnost. Pro každý roztok vzorku a kontroly se provedla tři nezávislá stanovení. Výsledky byly vyjádřeny jako variační koeficient. Nejprůkaznější metodou je ta, u které dosáhla opakovatelnost  $\leq 10\%$ , ale mez tolerance je  $\leq 20\%$ . Denní opakovatelnost vyjadřuje přesnost metody během jednoho dne. Mezi-denní opakovatelností se stanovuje reprodukovatelnost nové metody a její schopnost poskytovat jednotné výsledky v několika po sobě jdoucích dnech.

Antioxidační a antiradikálová aktivita byla stanovena u 32 vzorků zelených a červených listů bergenií (*B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*) ze všech sběrných období z let 2011 až 2013. Za standardy pro porovnání antioxidačních účinků rostlinných extraktů bergenií byly použity: suchý extrakt z kůry borovice přímořské Pycnogenol<sup>®</sup> (Biolandes, Francie), suchý extrakt z kůry jedle bělokoré abigenol, abigenol rozpuštěný v polyetylglykolu (PEG) a kyselina askorbová (vitamín C).

Standard abigenol byl připraven dvoustupňovou extrakcí: 5 kg kůry jedle bělokoré (*Abies alba*) bylo extrahováno 25 litry vody při 70°C po dvě hodiny. Vodný extrakt byl odpařen ve vakuu až do objemu 5 l. Ve druhém stupni byl koncentrovaný vodný extrakt extrahován 3 x 3 l etylacetátu. Etylacetátový extrakt byl poté přidán k 25 ml polyetylglykolu a následně byl odpařen. Takto bylo získáno 50 ml viskózního extraktu jedlové kůry. Suchý extrakt byl připraven vysrážením s 300 ml heptanu, s výtěžkem reakce 20 g.

#### 4.1.6.1.1. Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z hlediska chemického jde o radikály kyslíkové (superoxidový) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS<sup>•+</sup>).<sup>109)</sup>

##### 4.1.6.1.1.1. Metoda DPPH

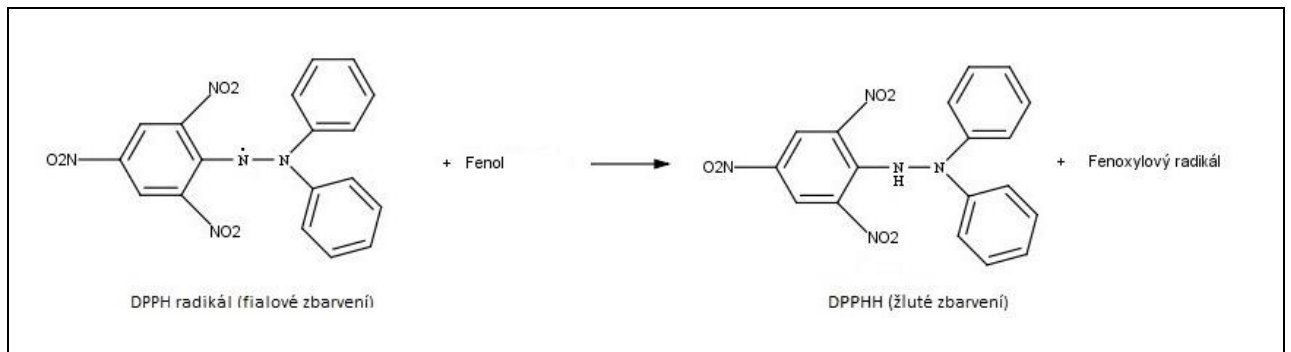
Jedna ze základních metod pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (**Obr. č. 11**). Tato reakce způsobí změnu zbarvení vzorku z fialové na žlutou.<sup>108, 109)</sup>

1,000 g rozemletého listového materiálu vybraných vzorků bergenií byl extrahován 10 ml vody ve vodní lázni po dobu 30 min. Vzorky byly dále centrifugovány (centrifuga Centric 400R, Tehtnica; 10 min., 5 000 ot.) a zfiltrány. Vodné extrakty byly dále rozředěny na koncentrace 1; 0,5; 0,3; 0,25 a 0,125 mg.ml<sup>-1</sup>. Poté byl 1 ml metanolového roztoku DPPH (2 mg na 50 ml) přidán k 36 µl každého vzorku včetně kyseliny gallové, která byla použita jako kontrola. Reakce probíhala 30 min při laboratorní teplotě. Po této době byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru Nanocolor UV-VIS (Macherey-Nagel) při 517 nm. Antiradikálová aktivita (AA) vyjádřená v % byla vypočítána ze vzorce:

$$AA (\%) = [(A_{\text{slepý vzorek}} - A_{\text{vzorek}}) / A_{\text{slepý vzorek}} - A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

kde  $A_{\text{kontrola}}$  je absorbance kyseliny gallové (0,01 mg.ml<sup>-1</sup>),  $A_{\text{vzorek}}$  je absorbance testovaných extraktů a  $A_{\text{slepý vzorek}}$  je absorbance roztoku složeného z vody a DPPH.





**Obrázek č. 11:** Zhášení DPPH volného radikálu fenolickou sloučeninou (antioxidantem). <sup>67)</sup>

#### 4.1.6.1.1.2. Metoda ABTS

Nejpoužívanější metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Testuje schopnost vzorku zhášet kation-radikál  $ABTS^{+\cdot}$  (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Zhášení radikálu  $ABTS^{+\cdot}$  antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje na základě změn absorpčního spektra a zbarvení roztoku. <sup>108)</sup>

1,000 g rozemletého rostlinného materiálu vybraných vzorků bergenií byl extrahován 10 ml vody ve vodní lázni po dobu 30 min. Vzorky byly dále centrifugovány (10 min., 5 000 ot.) a zfiltrány. Vodné extrakty byly dále rozředěny na koncentrace 1; 0,5; 0,3; 0,25 a 0,125  $mg \cdot ml^{-1}$ . ABTS a peroxodisíran amonný (APS) byly rozpuštěny v destilované vodě na koncentrace 7 mM a 140 mM. 10 ml 7 mM roztoku ABTS se smíchalo se 178  $\mu l$  140 mM roztoku peroxodisíranu amonného a tento roztok byl uchován bez přístupu světla 16 hodin při laboratorní teplotě. Vzniklý  $ABTS^{+\cdot}$  roztok byl poté zředěn etanolem tak, aby naměřená absorbance roztoku byla při 734 nm 0,700. 1 ml etanolového roztoku  $ABTS^{+\cdot}$  byl přidán k 26  $\mu l$  každého vzorku a ke kontrole (kyselina gallová). Po 6 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 734 nm.

Procentuální inhibice radikálu vyjádřená v % byla vypočítána ze vztahu:

$$AA (\%) = [(A_{\text{slepý vzorek}} - A_{\text{vzorek}}) / A_{\text{slepý vzorek}} - A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

kde za  $A_{\text{kontrola}}$  se dosazuje změřená absorbance kyseliny gallové ( $0,01 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ),  $A_{\text{vzorek}}$  je absorbance extraktů a standardu,  $A_{\text{slepý vzorek}}$  je absorbance roztoku vody a radikálu  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ .

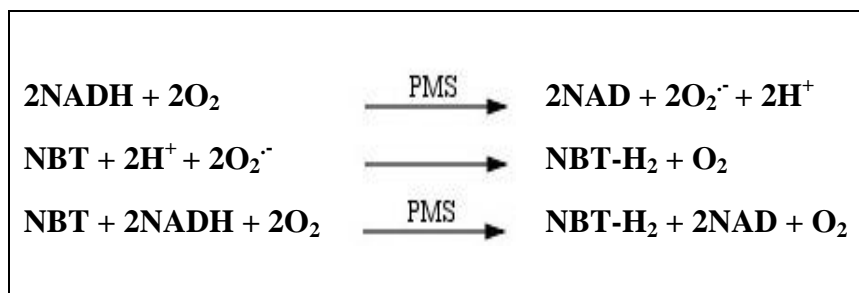
#### 4.1.6.1.1.3. Metoda NADH

Metoda založená na vycytávání superoxidového anion-radikálu. K produkci radikálu je využívána reakce 5-metylfenazinium-metyl-sulfátu (PMS) a NADH (**Obr. č. 12**). Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř (NBT).<sup>108)</sup>

1,000 g rozemletého listového materiálu vybraných vzorků bergénií byl extrahován 10 ml vody ve vodní lázni po dobu 30 min. Vzorky byly dále centrifugovány (10 min., 5 000 ot.) a zfiltrány. Extrakty byly dále zředěny ve vodném fosfátovém tlumivém roztoku na koncentrace 1; 0,5; 0,3; 0,25 a 0,125  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Poté bylo přidáno 0,5 ml 156  $\mu\text{mol/l}$  roztoku nitrotetrazoliové modři (NBT) a 0,5 ml 468  $\mu\text{mol/l}$  roztoku NADH (v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,4) k 50  $\mu\text{l}$  každého vzorku včetně kontroly (voda). Následně bylo ke vzorkům dodáno 50  $\mu\text{l}$  60  $\mu\text{mol/l}$  roztoku 5-metylfenazinium-metyl-sulfátu (PMS). Po 5 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance vzorků při 560 nm. Procentuální inhibice superoxidového radikálu byla vypočítána ze vztahu:

$$\% \text{ inhibice } \text{O}_2^{\cdot-} = [(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorek}}) / A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

kde za  $A_{\text{kontrola}}$  se dosazuje změřená absorbance kontroly (voda),  $A_{\text{vzorek}}$  je absorbance extraktů.



**Obrázek č. 12:** Redukce nitrotetrazoliové modři (NBT) superoxidovým radikálem generovaným z reakce NADH/PMS. <sup>65)</sup>

#### 4.1.6.1.2. Metoda založená na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. <sup>109)</sup>

##### 4.1.6.1.2.1. Metoda FRAP

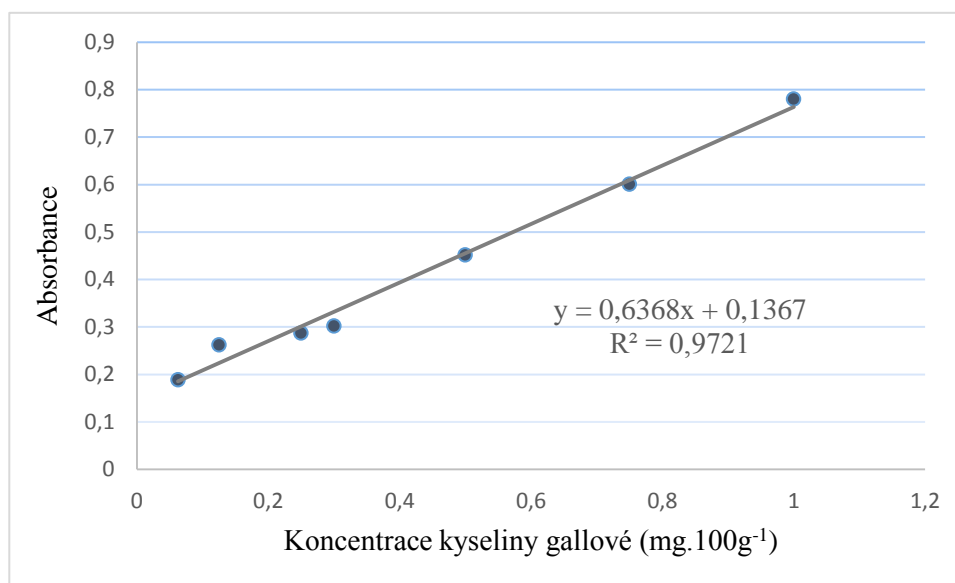
Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power). Při této reakci redukují antioxidanty ze vzorku komplex  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ . <sup>108)</sup>

1,000 g rozemletého listového materiálu vybraných vzorků bergenií byl extrahován 10 ml vody ve vodní lázni po dobu 30 min. Vzorky byly dále centrifugovány (10 min., 5 000 ot.) a zfiltrovány. Extrakty byly dále zředěny na koncentrace 1; 0,5; 0,3; 0,25 a 0,125  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ke 125  $\mu\text{l}$  každého vzorku včetně kontroly (kyselina gallová) bylo přidáno 125  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (pH 7,0) a 250  $\mu\text{l}$  1% roztoku hexakynoželezitanu draselného ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). Vzorky se nechaly inkubovat 20 minut při 50°C. Poté se ke každému přidalo 125  $\mu\text{l}$  10% kyseliny trichloroctové (TCA) a 500  $\mu\text{l}$  destilované vody. První absorbance byla změřena při 700 nm. Poté se ke vzorkům přidalo 125  $\mu\text{l}$  0,1% roztoku chloridu železitého ( $\text{FeCl}_3$ ) a byla změřena druhá absorbance při 700 nm.

Redukční síla antioxidantu vyjádřená v procentech, byla vypočítána ze vztahu:

$$RS (\%) = [(A_{2\text{vzorek}} - A_{1\text{vzorek}}) / (A_{2\text{kontrola}} - A_{1\text{kontrola}})]$$

kde za  $A_{\text{kontrola}}$  se dosazuje změřená absorbance kyseliny gallové ( $0,01 \text{ mg.ml}^{-1}$ ),  $A_{\text{vzorek}}$  je absorbance extraktů. Výsledná antioxidační aktivita byla vyjádřena v ekvivalentu kyseliny gallové v  $\text{mg GAE.100g}^{-1}$ . Kalibrační křivka kyseliny gallové je zobrazena na **Obrázku č. 13**.



**Obrázek č. 13:** Kalibrační křivka kyseliny gallové.

Všechny uvedené metodiky měření antioxidační a antiradikálové aktivity byly vypracovány ve spolupráci s dr. N. Kočevar Glavač na katedře Farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty, Univerzity v Ljubljani (Slovinsko).

#### 4.1.6.2. Tyrozinázová aktivita

Metoda pro měření tyrozinázové aktivity byla upravena dle práce Xie a kol.<sup>110)</sup> Jedná se o spektrofotometrický bezbuněčný test na stanovení míry inhibice houbové tyrozinázy rostlinnými extrakty. Ke stanovení byly využity připravené vodné a etanolové lyofilizované extrakty *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* (vzorky: BCR 3, BCL 1 a BOR 1 z podzimního sběru 2012). Vzorky byly předředěny etanolem a vodou na koncentrace 31  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 63  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , poté byly napipetovány na mikrotitrační destičku.

K 50  $\mu\text{l}$  každého vzorku, kontrole (rozpuštědlo: etanol, voda) a ke standardu (kyselina citrónová: zásobní roztoky o koncentraci 125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) se přidalo 50  $\mu\text{l}$  tyrozinázy (tyrozináza: 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  = 2138 U/ml; zásobní roztok naředěný ve fosfátovém pufru na koncentraci 400  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , výsledná aktivita v reakci 100  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), po promíchání následovala inkubace 2 až 5 min při laboratorní teplotě. Poté se ke vzorkům, kontrole a standardu přidalo 100  $\mu\text{l}$  substrátu L-DOPA (zásobní roztok naředěný ve fosfátovém pufru na koncentraci 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , výsledná koncentrace v reakci 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Absorbance byla změřena při 405 nm (Versa Max Elisa Microplate reader - Molecular Devices) v časové ose 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min. Jako slepý vzorek pro kontrolu samovolné oxidace substrátu, byl použit roztok 50  $\mu\text{l}$  rozpuštědla (voda nebo etanol), 50  $\mu\text{l}$  pufru a 100  $\mu\text{l}$  L-DOPA. Výsledná hodnota tyrozinázové aktivity byla vyjádřena jako inhibiční aktivita sledované látky v porovnání s kontrolou.

Tyrozinázová aktivita rostlinných extraktů byla měřena ve spolupráci s firmou Contipro (Dolní Dobrouč), ve spolupráci s Mgr. I. Dolečkovou, Ph.D.

#### 4.1.6.3. Antiparazitická aktivita

Ke studiu antiparazitické aktivity byly vybrány lyofilizované vodné (BCR 2, P2012) a etanolové (BCL2 P2012; BOR1 P2012) extrakty bergenií.

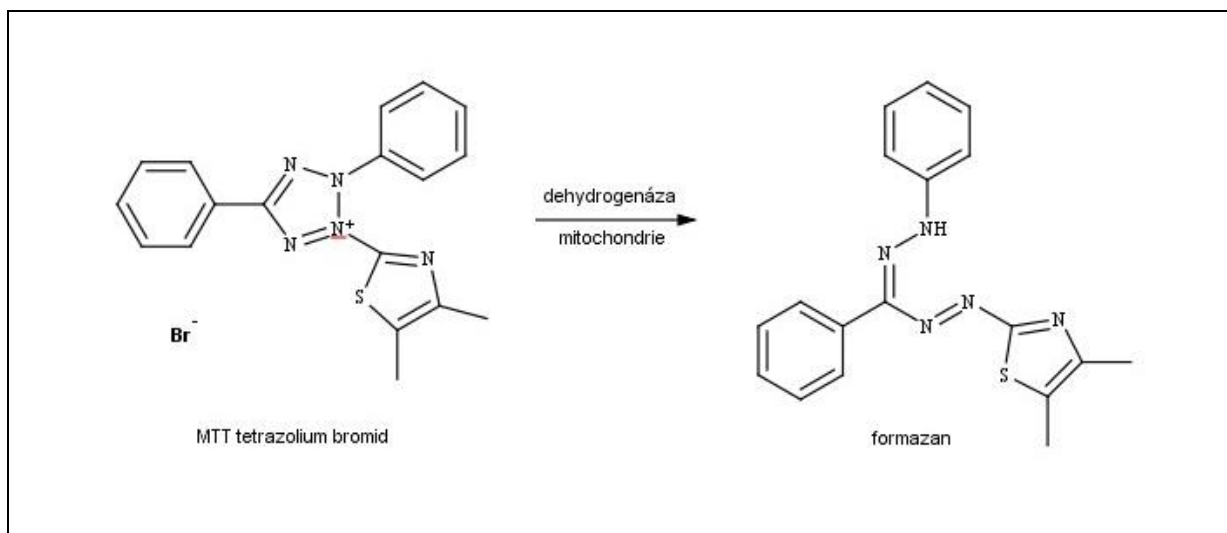
##### 4.1.6.3.1. Sledování vlivu čistých látek a extraktů na morfologii larev *M. vogae*

Ke sledování antiparazitické aktivity listových extraktů z bergenií (*B. crassifolia*, *B. ciliata*, *B. x ornata*) a čistých látek (arbutinu a bergeninu) byly využity larvy plochých červů druhu *Mesocestoides vogae*. Ty byly sterilně odebrány z břišní dutiny pokusných myší. Následně byly promyty PBS a přeneseny sterilně do kultivačních lahvíček (75 ml) vybavených CO<sub>2</sub> filtrem (CO<sub>2</sub> filtr byl použit pouze pro aerobní kultivaci, anaerobní kultivace probíhala v lahvíčkách s plným uzávěrem) s RPMI médiem a antibiotikami (10 ml). Do takto připravených kultivačních lahvíček byly přidány ve vodě rozpuštěné chemicky čisté látky – arbutin a bergenin (pro lepší rozpustnost s přídavkem 10% DMSO) v koncentracích 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (2 mg/10 ml), 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (1g/10ml), 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (0,5mg/10ml). Vodné a etanolové lyofilizované extrakty *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* byly rozpuštěny ve sterilním médiu v koncentraci 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a následně přidány k larvám v kultivačním médiu s výslednou koncentrací 10 mg/10 ml. Takto připravené lahvíčky s larvami byly kultivovány v termostatu při 37°C. Po 5 hodinové, 24 hodinové, 3 denní a 7 denní inkubaci bylo provedeno zhodnocení vlivu testovaných látek na motilitu, změnu tvaru larev a sledování larvicidního účinku. K tomuto účelu byl využit inverzní mikroskop. Vytvořena byla také doprovodná fotodokumentace (viz. Obrazová příloha).

#### 4.1.6.3.2. Test metabolické aktivity (MTT)

Test metabolické aktivity umožňuje zjistit účinek testovaných látek na bazální metabolismus larev (vliv na dýchací řetězec, enzymy, tvorbu ATP na mitochondriích). Jedná se o spektrofotometrické stanovení aktivity enzymů, které redukují MTT (3-(4,5-Dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na modře zabarvený formazan (**Obr. č. 14**). Analogický test je využíván při sledování účinků látek na viabilitu a metabolickou aktivitu respektive tvorbu reaktivních molekul kyslíku v buňkách savců. Cílem testu bylo zjistit, zda přírodní extrakty stimulují nebo potlačují metabolickou aktivitu larev kultivovaných ve fyziologických anaerobních podmínkách (bez přístupu CO<sub>2</sub> při 37°C), a pro porovnání i v aerobních podmínkách.<sup>111)</sup>

K připraveným roztokům arbutinu a bergeniinu (v koncentracích 200 µg.ml<sup>-1</sup>, 100 µg.ml<sup>-1</sup>, 50 µg.ml<sup>-1</sup> a 25 µg.ml<sup>-1</sup>) a extraktům bergenií (v koncentraci 1 mg.ml<sup>-1</sup>) v kultivačním médiu s larvami byl přidán roztok MTT (1 mg.ml<sup>-1</sup>) a inkubován po dobu 4 – 5 hodin. Roztoky byly poté centrifugovány (3 000 ot., 5 min.), médium bylo odsáto vodní vývěvou. Larvy se zvažily na analytických vahách a bylo k nim přidáno 200 µl 10% DMSO, následovala homogenizace pístem. Tyto byly přes noc uschovány, zabalené v alobalu v chladničce. Ráno byla provedena centrifugace při 3 000 ot. po dobu 5 min. a supernatanty se přenesly pipetou na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Absorbance se změřila při 550 nm v přístroji Microplate reader.



**Obrázek č. 14:** Redukce MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na modře zbarvený formazan. Reakce je katalyzována mitochondriální sukcinát dehydrogenázou II. komplexu dýchacího řetězce.

#### 4.1.6.3.3. Stanovení celkových lipidů u larev *Mesocestoides vogae*

Stanovení celkových lipidů extraktů larev, dle metody Mishra a kol.<sup>112)</sup> s drobnou modifikací, probíhalo ve fyziologických anaerobních podmínkách.

Bylo odpipetováno 150  $\mu\text{l}$  z extraktů bergenií ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), arbutinu a bergeninu ( $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) s larvami do 8 ml zkumavek a rozpuštěno ve směsi chloroformu a metanolu. Rozpouštědla byla následně odpařena zahřátím na vodní lázni při  $60^\circ\text{C}$  po dobu 10 min. Ke vzorkům se přidalo 100  $\mu\text{l}$  vody a 2 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Následovala hydrolýza ve vodní lázni při  $100^\circ\text{C}$  po dobu 15 min. Po ochlazení bylo odpipetováno 0,5 ml hydrolyzátu a přidáno 1,25 ml fosfo-vanilínového činidla. Vzorky byly inkubovány při  $37^\circ\text{C}$  po dobu 20 min. Absorbance se měřila při 530 nm. Výsledky byly odečteny z kalibrační křivky a přepočítány na navážku larev. Fosfo-vanilínové činidlo se připravilo v den měření z 60 mg vanilínu, 1 ml etanolu, 9 ml deionizované vody a 40 ml konc.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .



K dokázání přítomnosti lipidů na kryořezech larev *M. vogae* byl využit fluorescenční mikroskop. Preparát byl připraven z larev, které byly ošetřeny n-heptanem (kryoprotekce) a následně byly zmrazené v montovacím médiu pro mikroskopii. Z bločku se připravily řezy (12  $\mu\text{m}$  hrubé) na Kryostatu (Leica), které se lepily na podložní sklíčka a před samotným barvením byly fixovány v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS. K obarvení preparátu sloužila barviva DAPI (pro zvýraznění chromatinu jader) a Nile-RED (pro zvýraznění neutrálních lipidů).

Antiparazitická aktivita rostlinných extraktů s využitím larev *Mesocestoides vogae* byla zkoumána na Parazitologickém ústavu Slovenské Akademie věd v Košicích, ve spolupráci s RNDr. G. Hrčkovou, DrSc.

#### **4.1.6.4. Imunostimulační aktivita**

Touto metodou, upravenou podle práce Cheel <sup>65)</sup>, byl sledován vliv listových lyofilizovaných etanolových extraktů bergénií *B. crassifolia*, *B. ciliata*, *B. x ornata* (BCR 2 P2012, BCL 2 P2012, BOR 1 P2012), na aktivaci CD69 lymfocytů s využitím průtokové cytometrie. Testování probíhalo na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Pro testování byla použita periferní heparinizovaná krev od tří zdravých dárců. 100  $\mu\text{l}$  této krve bylo inkubováno se 100  $\mu\text{l}$  X-vivo média a s testovanými extrakty zředěnými podle vzrůstající koncentrace a kontrolou. Extrakty byly připraveny z 0,8 mg lyofilizátu s 10  $\mu\text{l}$  DMSO (koncentrace v roztoku do 0,5%) a 1 ml X-vivo média. Jako slepý vzorek byl použit roztok 100  $\mu\text{l}$  X-vivo média se 100  $\mu\text{l}$  krve. Pozitivní kontrola byla připravena ze 100  $\mu\text{l}$  krve a 100  $\mu\text{l}$  PHA (phytohemagglutinin v koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  X-vivo média). Jako kontrola byl připraven i 0,5% roztok DMSO. Vzorky byly před vlastní analýzou přefiltrovány přes mikrofiltr (0,2  $\mu\text{m}$ ). Konečné koncentrace testovaných látek byly v rozmezí 0,2 – 0,8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 2 – 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Mikrotitrační destičky byly inkubovány při 37°C po 24 hodin v přítomnosti 5%  $\text{CO}_2$ . Po

inkubaci bylo 40 µl suspenze promícháno s fluorescenčně-labilními protilátkami (CD 69 PE). K analýze byl využit průtokový cytometr Cytomics FC500 (Beckman Coulter), data byla analyzována s využitím CXP analytického softwaru (Coulter Electronic). Aktivace lymfocytů (z toho 90 % T-lymfocytů) byla sledována s pomocí vzrůstající fluorescenční intenzity (MFI), která byla způsobena expresí CD69 na buněčném povrchu. Fluorescenční signály byly zaznamenány logaritmicky jako zesílené signály. Hodnoty aktivace byly vyjádřeny jako aktivační indexy (AI), které byly získány porovnáním fluorescenční intenzity testovaných vzorků a kontroly a stimulačními indexy (SI), které odpovídají poměru hodnot aktivovaného vzorku k negativní kontrole (eliminují tak variabilitu dárců). Pozitivní imunitní buněčná odpověď byla definována jako  $AI \geq 2$ .<sup>114)</sup>

Měření imunostimulační aktivity vybraných rostlinných extraktů bergenií probíhalo na Ústavu klinické imunologie a alergologie Fakultní Nemocnice Hradec Králové ve spolupráci s PharmDr. D. Vokurkovou, Ph.D.

#### **4.1.6.5. Antiagregační aktivita**

Krevní destičky adherují za různých podmínek a v přítomnosti celé řady endogenních látek. Agregace může být indukována přidávkem látek vyvolávajících agregaci do plazmy obohacené destičkami nebo do plné krve. Průběh agregace závisí na koncentraci vápenatých iontů, fibrinogenu, plazmatických faktorech a přítomné antiagregační látce. Jako látka indukující agregaci (agonista agregace) byla použita kyselina arachidonová (AA). Je vhodnou metodou, která umožňuje určit, zda látka přidaná k nativním trombocytům před samotným agonistou agregace ovlivňuje jím následně vyvolaný proces agregace, tedy zda látka působí pro nebo proti-agregačně.<sup>113, 166)</sup>

Vliv listových extraktů bergénií a chemicky čistých látek (arbutinu, bergeninu) na agregaci krevních destiček byl sledován pomocí přístroje Multiplate (Cobas/Roche). K testování byly použity lyofilizované vodné vzorky *B. x ornata* (BOR 1 P2012) a etanolové vzorky *B. crassifolia*, *B. x ornata* a *B. ciliata* (BCR 2 J2012, BOR 1 J2013, BCL 2 P2012), které byly před vlastním měřením rozpuštěny v 10% DMSO na koncentrace 0,25 – 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Antiagregační aktivita byla sledována také u chemicky čistých látek bergeninu a arbutinu v koncentracích 3 – 30 mM. Výsledné hodnoty inhibice agregace byly porovnány se standardem kyselinou acetylsalicylovou (ASA) v koncentracích 0,8 – 244 μM.

Dárci krve pro agregometrii byli nekuřáci, kteří neužívali týden před odběrem žádnou látku ovlivňující funkce trombocytů. Všichni podepsali informační souhlas s odběrem krve a prováděnou studií.

Do skleněné kyvety temperovaného měřicího prostoru agregometru (37°C) bylo přeneseno 300 μL fyziologického roztoku, 300 μL krve a DMSO nebo ASA nebo testovaná látka v objemu 5 μL. Destičky začaly reagovat a změny v transmitanci (agregaci) byly zaznamenány počítačem agregometru. Protože pro agregaci destiček je nutný jejich vzájemný kontakt, magnetické míchadélko zajistilo míchání testovaného vzorku během měření. Sledován byl vliv různých koncentrací testovaných látek na proces agregace. Výsledné hodnoty byly určeny jako maximální míra inhibice agregace nebo jako plocha pod křivkou AUC.

#### **4.1.6.6. Stanovení inhibice COX-1**

Cyklooxygenázy (COX) jsou enzymy působící konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandin H<sub>2</sub>. Prostaglandiny hrají klíčovou roli ve fyziologických a patofyziologických procesech organismu. Existují dvě izoformy tohoto enzymu – COX 1 (cyklooxygenáza 1) a

COX 2 (cyklooxygenáza 2). Aktivitou COX 1 je udržování homeostatických funkcí. COX 1 je považována za konstitutivní enzym (exprimován buňkami trvale), jenž se vyskytuje ve sliznici žaludku, střev, v ledvinách či trombocytech, ovlivňuje tonus cév a reguluje krevní průtok či hraje úlohu v imunitní odpovědi. COX-1 (prostaglandin endoperoxid H syntáza-1, PGHS-1) katalyzuje přeměnu volné kyseliny arachidonové, uvolněné z fosfolipidové membrány prostřednictvím enzymu fosfolipázy A<sub>2</sub>, na prostaglandin PGH<sub>2</sub>. COX-1 je využívána jako nástroj pro studium protizánětlivých účinků rostlinných extraktů a látek. COX 2 je naopak indukovaný enzym, tvořený v buňkách pouze za specifických podmínek. Za normálních okolností jsou koncentrace tohoto enzymu v tkáních minimální, přítomnost ve vyšších koncentracích je prokázána v patologicky změněných tkáních (zánět, nádor).<sup>115 - 117)</sup>

Uvedená metoda stanovení inhibice COX-1 vycházela z COX Inhibitor Screening Assay Kit, Item No. 560131, Cayman Chemical Company, USA, 2012.

Pro stanovení schopnosti inhibice COX-1 byl vybrán lyofilizovaný vodný extrakt *B. x ornata* (BOR 1 P2012), který prokázal nejvyšší antiagregační aktivitu v *in vitro* studii za použití AA jako induktoru agregace, ve finálních koncentracích 1 - 100 μM.

Pro testování byl využit ovčí rekombinantní enzym. Vždy bylo smícháno v reaktivním pufru 20 μl DMSO nebo testované látky s 10 μl hemu (40 μl hemu naředěno v 960 μl reaktivního pufru) a 10 μl COX-1. 60 μl rekombinantního enzymu COX-1 bylo rozpuštěno v 240 μl reakčního pufru. Vzorky byly poté inkubovány 10 minut při 37°C. Inkubační doba byla stejná pro všechny testované vzorky. Vlastní reakce byla zahájena přidáním 10 μl kyseliny arachidonové ke všem testovaným vzorkům. Vzorky byly poté inkubovány 2 minuty při 37°C. Enzymová katalýza byla ukončena přidáním 50 μl 1 M kyseliny chlorovodíkové a 100 μl roztoku SnCl<sub>2</sub> (0,125 g / 2,5 ml HCl). Jako kontrola byl použit roztok s DMSO. Vzorky byly

poté analyzovány pomocí PGs enzyme immunoimetric assay (EIA). Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako procentuální inhibice tvorby PGH<sub>2</sub> (%).

#### **4.1.6.7. Statistická analýza**

Všechny experimenty byly provedeny ve třech až čtyřech opakováních. Do výsledků byla započítána směrodatná odchylka ( $\pm$  SD). Pro statistické zhodnocení výsledků byl použit analytický test ANOVA. Pro určení korelační analýzy a lineární regrese závislosti celkových polyfenolů, arbutinu a bergeninu na klimatických podmínkách a biologické aktivitě byl využit software GraphPad Prism 6 (hodnota  $p < 0,05$ ). Při úpravě metodik pro měření antioxidační aktivity byla provedena také opakovatelnost metod (mezidenní, denní) a stanovena jejich linearita.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1. Stanovení obsahu sekundárních metabolitů

Do stanovení obsahových látek (celkových polyfenolů a arbutinu) bylo zahrnuto 130 vzorků z jarního a podzimního sběru z let 2011 až 2013. Následně bylo určeno 32 statisticky obsahově významných vzorků, které byly zahrnuty do dalších chemických a biologických hodnocení (**Tab. č. 5**). Pro porovnání byl sledován obsah sekundárních metabolitů také v červeně zbarvených listech vybraných bergenií. Všechny získané hodnoty pak byly zahrnuty do porovnání závislosti obsahových látek na biologických aktivitách. *Bergenia x ornata*, hybridní rostlina získaná křížením *B. ciliata* a *B. crassifolia*, byla vůbec poprvé hodnocena na obsah sekundárních metabolitů a biologickou aktivitu. Prozatím pro tento druh nebyla zpracována žádná fytochemická studie.

#### 5.1.1. Stanovení obsahu arbutinu

Celkový obsah arbutinu v listech všech studovaných bergenií (*B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*) byl stanoven dle metodiky uvedené v Českém lékopise 2009.<sup>103)</sup> Hodnoty obsahu arbutinu v sušině se pohybovaly v rozmezí od 24,6 ( $\pm 1,10$ ) do 58,85 ( $\pm 0,71$ ) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. crassifolia*; od 34,2 ( $\pm 0,90$ ) do 51,04 ( $\pm 1,21$ ) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. x ornata* a od 5,9 ( $\pm 0,61$ ) do 9,43 ( $\pm 0,57$ ) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. ciliata* (**Tab. č. 7**, str. 67). Nejvyšší hodnoty obsahu arbutinu byly stanoveny u druhu *B. crassifolia* (58,85  $\pm 0,71$  mg.g<sup>-1</sup>) a *B. x ornata* (51,04  $\pm 1,21$  mg.g<sup>-1</sup>), nejnižší naopak u *B. ciliata* (5,9  $\pm 0,61$  mg.g<sup>-1</sup>). Výsledné hodnoty obsahu arbutinu pro *B. crassifolia* byly o něco nižší než zjistila Árok a kol. (47,9 – 98,3 mg.g<sup>-1</sup>)<sup>35)</sup> a Pozharitskaya a kol. (69,6 mg.g<sup>-1</sup>)<sup>45)</sup>. Jiang a kol.<sup>118)</sup> udává obsah arbutinu v listech *B. purpurascens* v rozmezí od 15,1 – 63,6 mg.g<sup>-1</sup>.

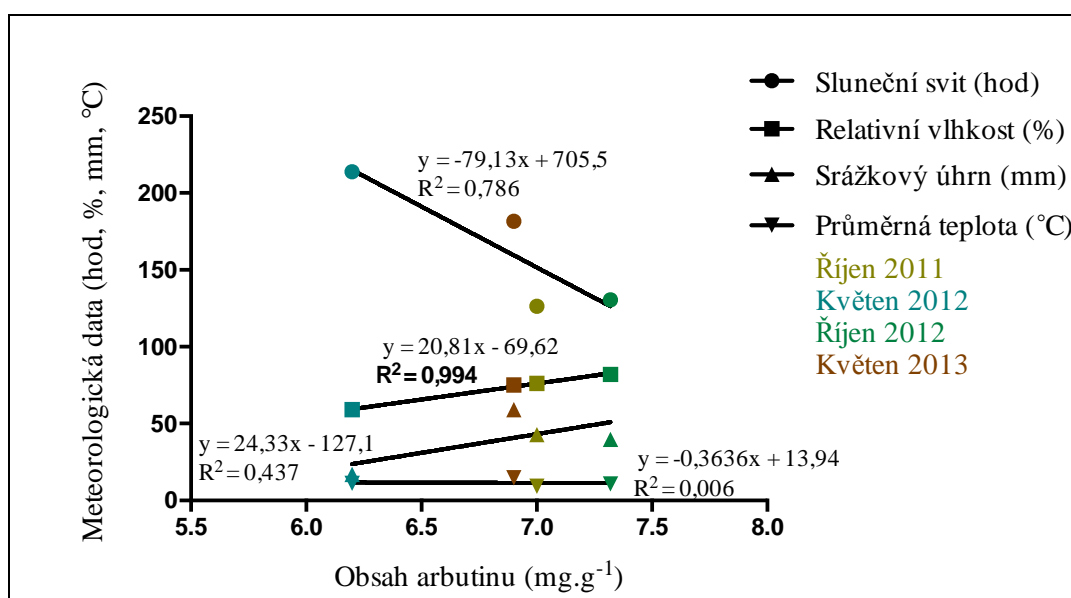
Ze získaných výsledků vyplynulo, že obsah arbutinu v průběhu roku kolísal. Na jaře byla koncentrace arbutinu v listech bergenií nejnižší, na podzim naopak vzrostla. Tato tendence byla pozorována u vzorku č. BCR 1, který byl odebírán vždy z jedné rostliny v průběhu let 2011 až 2013 (podobně jako vzorek BOR 1 a BCL 1). Obsah arbutinu v listech sbíraných na podzim byl 32,41 ( $\pm$  0,14) mg.g<sup>-1</sup> (rok 2011) a 41,70 ( $\pm$  1,01) mg.g<sup>-1</sup> (r. 2012), na jaře pak 31,93 ( $\pm$  0,91) mg.g<sup>-1</sup> (r. 2012) a 25,07 ( $\pm$  1,0) mg.g<sup>-1</sup> (r. 2013) (**Tab. č. 7**).

Jak vyplývá z literatury, podobné kolísání arbutinu v průběhu roku bylo pozorováno nejen u *B. crassifolia*<sup>34)</sup> ale i *Arctostaphylos uva-ursi*.<sup>119)</sup> Vyšší obsah arbutinu zjištěný na podzim, může být ovlivněn i klimatickými podmínkami. Proto byl také zkoumán vliv meteorologických podmínek (**Tab. č. 6**) na obsah arbutinu a polyfenolů u všech studovaných bergenií. Tyto údaje byly důležité pro stanovení nejvhodnějšího druhu bergenie za účelem získávání sekundárních metabolitů pro léčebné využití. Pozitivní korelační závislost mezi obsahem arbutinu a relativní měsíční vlhkostí u druhu *B. ciliata* zobrazuje **Obrázek č. 15** ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 0,994$ ). Závislosti mezi klimatickými podmínkami a obsahem arbutinu u druhů *B. crassifolia* a *B. x ornata* již nejsou tolik průkazné jako u druhu *B. ciliata* (**Obr. č. 16 a 17**).

Obsah arbutinu může být navíc ovlivněn i stářím rostliny. Jak uvádí Lubsandorzhieva a kol.<sup>23, 165)</sup>, množství arbutinu je nejvyšší v jednoletých listech, se stárnutím rostliny postupně klesá. Sledován byl rovněž i vliv teploty sušení (40°C, 50°C) na obsah sekundárních metabolitů (**Tab. č. 7**). Významný rozdíl ve výsledných hodnotách zde však nebyl prokázán.

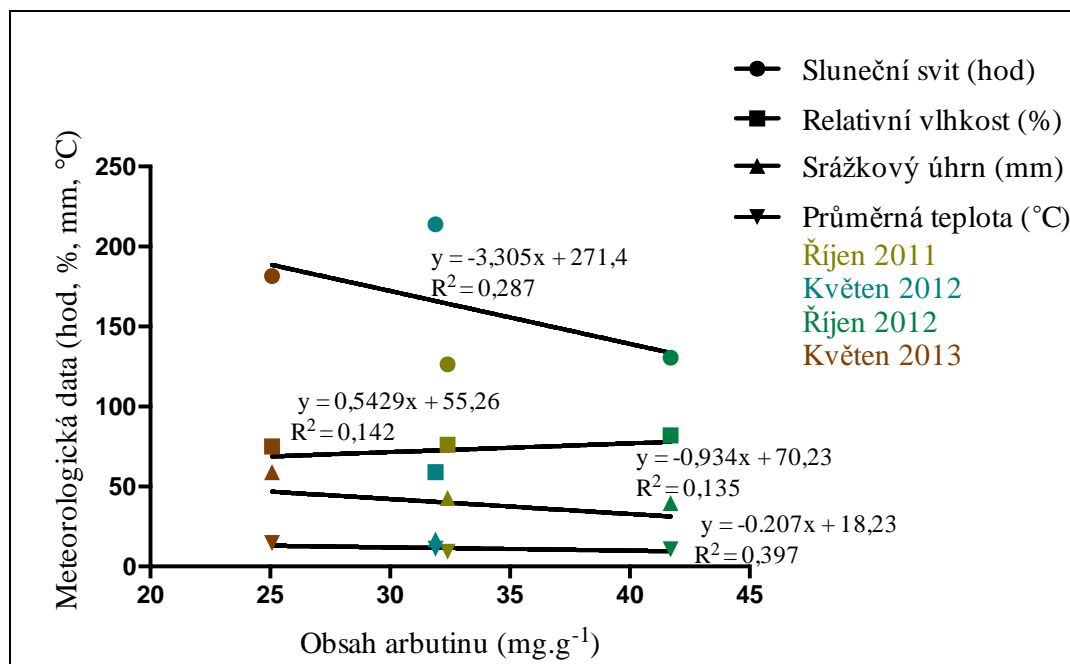
**Tabulka č. 6:** Meteorologické údaje (měsíční průměr) pro sběrné období říjen/květen 2011 - 2013. (Meteorologické údaje ze stanice Českého hydrometeorologického ústavu ČR v Lednici byly poskytnuty pracovníky Zahradnické fakulty Masarykovy univerzity.)

Období sběru	Průměrná teplota (°C)	Vodní srážky (mm)	Sluneční svit (hod)	Relativní vlhkost (%)
Říjen 2011	9,3	42,8	126,4	76,2
Květen 2012	11,1	16,9	213,9	59
Říjen 2012	10,8	39,7	130,6	82
Květen 2013	14,6	59,1	181,5	75

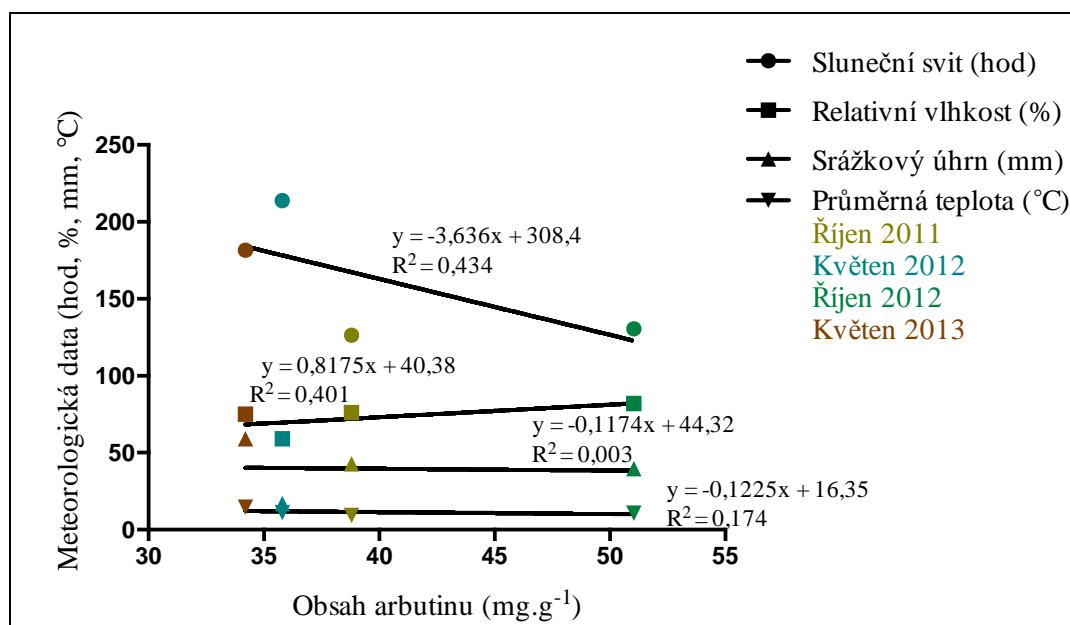


**Obrázek č. 15:** Závislost obsahu arbutinu *B. ciliata* ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.





**Obrázek č. 16:** Závislost obsahu arbutinu *B. crassifolia* ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.



**Obrázek č. 17:** Závislost obsahu arbutinu *B. x ornata* ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.

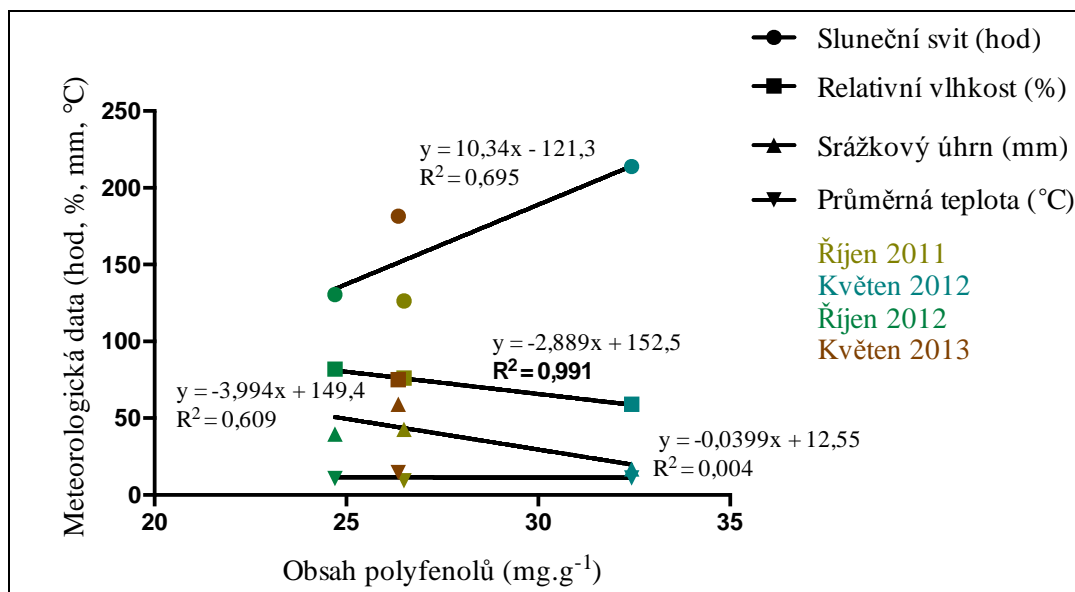
### 5.1.2. Stanovení obsahu celkových polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů v listech druhů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* byl stanoven dle metodiky uvedené v Českém lékopise 2009<sup>104)</sup>. Hodnoty obsahu polyfenolů v sušině se pohybovaly v rozmezí od 24,90 ( $\pm 0,98$ ) do 48,74 ( $\pm 1,14$ ) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. crassifolia*; od 28,63 ( $\pm 1,03$ ) do 49,36 ( $\pm 1,31$ ) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. x ornata* a od 24,70 ( $\pm 0,93$ ) do 32,44 (1,20) mg.g<sup>-1</sup> pro *B. ciliata*. Statisticky nejvyšší obsahy polyfenolů byly zjištěny u druhů *B. x ornata* (49,36  $\pm 1,31$  mg.g<sup>-1</sup>) a *B. crassifolia* (48,74  $\pm 1,14$  mg.g<sup>-1</sup>), nejnižší u *B. ciliata* (24,70  $\pm 0,93$  mg.g<sup>-1</sup>). Výsledná množství celkových polyfenolů zjištěná u *B. crassifolia* odpovídají výsledkům uvedených v práci Árok a kol. (37,0 – 50,1 mg.g<sup>-1</sup>).<sup>35)</sup> Obsah polyfenolů v listech bergenií se měnil v průběhu roku. Jak je patrné u vzorku č. BCR 1, obsah polyfenolů byl, podobně jako u arbutinu, nejvyšší na podzim a v průběhu jarních měsíců poklesl (**Tab. č. 7**).

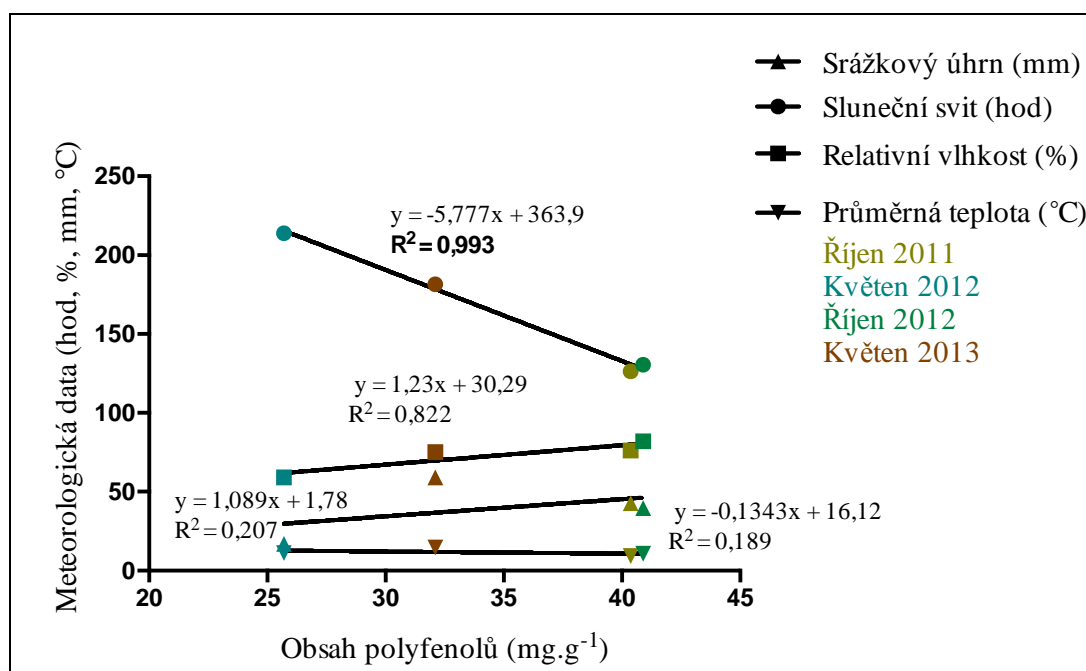
Vliv na obsah sekundárních metabolitů má také aktuální vývojová fáze rostlin. V porovnání s vegetativním stádiem, se listové extrakty z rostlin v generativním stádiu vyznačují poklesem obsahu fenolických látek. Obsah těchto látek se mění v závislosti na vývoji rostliny.<sup>120)</sup> Jak udává Lisiewska a kol.<sup>121)</sup> obsah polyfenolů vzrůstá s věkem rostliny.

Podobně jako u arbutinu, byl sledován vliv klimatických podmínek na obsah polyfenolů v listech bergenií. Závislost mezi meteorologickými podmínkami za všechna sledovaná období a celkovým obsahem polyfenolů pro *B. ciliata* zobrazuje **Obrázek č. 18** ( $p < 0,05$ ). Pozitivní korelační závislost byla stanovena mezi obsahem polyfenolů a relativní měsíční vlhkostí vzduchu ( $R^2 = 0,991$ ). K významné závislosti dochází i mezi obsahem polyfenolů a měsíčním úhrnem srážek. U ostatních bergenií nejsou závislosti na relativní vlhkosti a srážkovém úhrnu natolik patrné (**Obr. č. 19 a 20**). U *B. crassifolia* však vychází pozitivní korelační závislost mezi obsahem polyfenolů a průměrným počtem hodin slunečního svitu ( $R^2 = 0,993$ ). Závislost mezi obsahem polyfenolů a sluneční radiací uvádí již ve své práci Toor a kol.<sup>122)</sup>

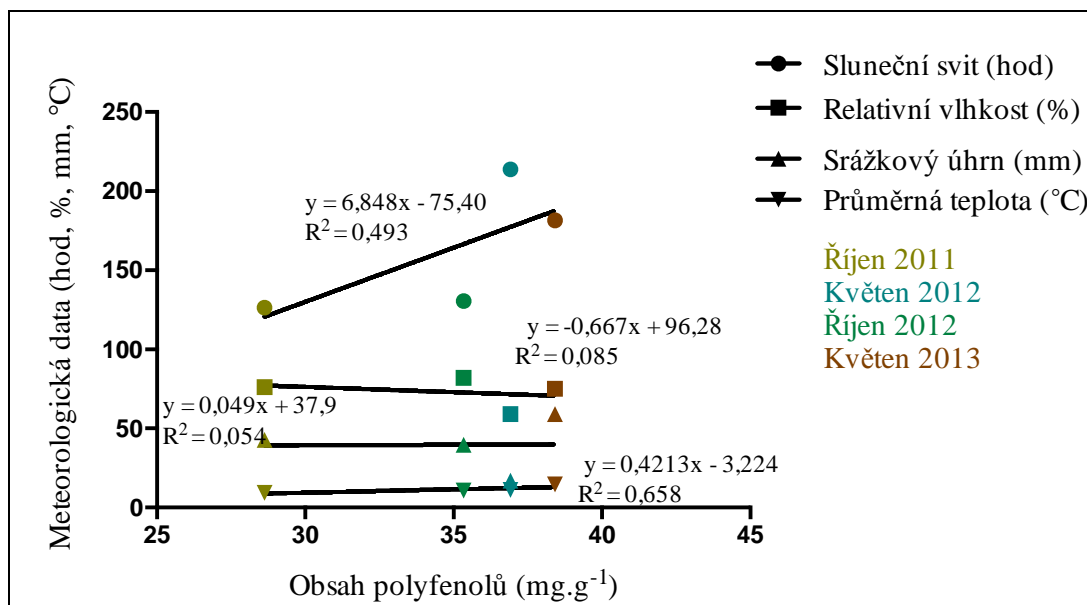
Dle prací Borges a kol.<sup>123)</sup> a Sampaio a kol.<sup>124)</sup> ovlivňují množství přítomných hydrolyzovatelných tříslovin nejen srážky, ale také přítomné půdní živiny. Vliv environmentálních faktorů, jako je složení půdy, průměrná teplota, srážky a UV záření, na obsah fenolických látek uvedli již Kouki a kol.<sup>125)</sup>, Monteiro a kol.<sup>126)</sup>, Gobbo-Neto a kol.<sup>127)</sup> Obsah hydrolyzovatelných tříslovin může být přímo ovlivněn nejen environmentálními změnami, ale také se mění v závislosti na vývoji rostliny, podobně jako u arbutinu<sup>128)</sup>. Obsah fenolických látek přitom přímo ovlivňuje kvalitu rostlinného materiálu pro léčebné využití.<sup>129)</sup> Významný vliv na obsah polyfenolů v rostlinách mají růstové živiny a mikroprvky jako je dusík, vápník, mangan a draslík. Rostliny s vyšším obsahem vápníku disponují vyšší odolností proti nemocem a dochází u nich ke zvýšení syntézy fenolických látek za účelem udržení této rezistence. Také přítomnost draslíku snižuje přítomnost rostlinných chorob. Pokud se ho však rostlině nedostává, může tento nedostatek nahradit zvýšenou syntézou hydrolyzovatelných tříslovin a zvýšit tak svoji obranu proti patogenům.<sup>123)</sup> Také nedostatek manganu vede k akumulaci fenolických sloučenin v rostlinných tkáních. Několik studií dokazuje přímý vliv manganu na syntézu fenolických látek (flavonoidů, tříslovin a ligninu) prostřednictvím cesty kyseliny šikimové.<sup>130, 131)</sup> Jak ukazují tyto studie, významný vliv na obsah fenolických látek včetně polyfenolů má také lokalita sběru rostlinného materiálu.



**Obrázek č. 18:** Závislost obsahu celkových polyfenolů *B. ciliata* (mg.g<sup>-1</sup>) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.



**Obrázek č. 19:** Závislost obsahu celkových polyfenolů *B. crassifolia* (mg.g<sup>-1</sup>) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.



**Obrázek č. 20:** Závislost obsahu celkových polyfenolů *B. x ornata* ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.

### 5.1.3. Stanovení obsahu bergeninu

Celkový obsah bergeninu v listových extraktech *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* (celkem 32 vzorků) byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC s UV detektorem), dle upravené metodiky Reddy a kol.<sup>105)</sup> a Singh a kol.<sup>106)</sup> Množství bergeninu bylo odečteno z kalibrační křivky sestavené ze sedmi různých koncentrací standardního bergeninu (**Obr č. 8**). Naměřené hodnoty bergeninu v sušině se pohybovaly od  $0,13 (\pm 0,05)$  do  $5,7 (\pm 0,14) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u *B. crassifolia*; od  $3,97 (\pm 0,05)$  do  $6,23 (\pm 0,09) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u *B. x ornata* a od  $0,23 (\pm 0,05)$  do  $3,21 (\pm 0,10) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  u *B. ciliata*. Statisticky nejvyšší obsah bergeninu byl stanoven u hybridu *B. x ornata* ( $6,23 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), který byl na obsah bergeninu zkoumán vůbec poprvé. Následován *B. crassifolia* ( $5,70 \pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a *B. ciliata* ( $3,21 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Nejnižší hodnoty byly určeny u vzorků druhu *B. crassifolia* ( $0,13 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a *B. ciliata* ( $0,23 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Boros a kol. <sup>132)</sup> uvedl ve své práci velmi podobný obsah bergeninu v listech *B. crassifolia* v rozmezí od 0,25 do 5,34 mg.g<sup>-1</sup>. Reddy a kol. <sup>105)</sup> stanovil obsah bergeninu u druhu *B. ligulata* od 1,3 mg.g<sup>-1</sup> (v listech) do 9,1 mg.g<sup>-1</sup> (v oddencích). Jeho obsah v listech a stoncích byl přitom až 8 krát nižší než v oddencích. Singh a kol. <sup>106)</sup> odhalil vyšší množství bergeninu v oddencích *B. stracheyi* (32,7 mg.g<sup>-1</sup>) a *B. ciliata* (32,8 mg.g<sup>-1</sup>) oproti *B. ligulata* (24,2 mg.g<sup>-1</sup>). Také Dhalwal a kol. <sup>133)</sup> uvedl obsah bergeninu v oddencích *B. ciliata* vyšší než v jiných částech rostliny (listy: 1,4 mg.g<sup>-1</sup>; oddenky: 7,2 mg.g<sup>-1</sup>). K podobným hodnotám obsahu bergeninu v listech *B. ciliata* dospěl také Dharmender a kol. (2,2 mg.g<sup>-1</sup>). <sup>134)</sup> Výsledné hodnoty z našeho stanovení obsahu bergeninu v listech tří sledovaných bergénií jsou vyšší, než uvádí literatura. Rozdíly ve stanoveném obsahu bergeninu mohou být způsobeny rozdílnými klimatickými podmínkami. Ve sledovaných vzorcích byl patrný vyšší obsah bergeninu, podobně jako u polyfenolů a arbutinu, v listech sbíraných na podzim (**Tab. č. 7**). Jak uvádí Srivastava a kol. <sup>135, 136)</sup>, biosyntéza bergeninu vzrůstá i se stoupající nadmořskou výškou. Jedná se o reakci rostliny na dané environmentální podmínky.

**Tabulka č. 7:** Výsledné hodnoty obsahu arbutinu, celkových polyfenolů a bergeninu v zelených a červených listech u druhů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013 (statisticky nejvyšší hodnoty jsou vyznačeny červeně).

Druh	Vzorek	Barva listů	Termín sběru	Teplota sušení °C	Obsah arbutinu mg.g <sup>-1</sup> ± SD	Obsah polyfenolů mg.g <sup>-1</sup> ± SD	Obsah bergeninu mg.g <sup>-1</sup> ± SD
<i>B. crassifolia</i>	BCR 1	z	P 2011	40	32,41 ± 0,14	40,37 ± 0,91	0,83 ± 0,05
	BCR 2	z	P 2011	40	27,2 ± 0,16	43,9 ± 0,90	0,13 ± 0,05
	BCR 3	z	P 2011	50	24,64 ± 1,10	48,74 ± 1,14	5,1 ± 0,22
	BCR 1	z	J 2012	50	31,93 ± 0,91	25,7 ± 0,40	0,4 ± 0,14
	BCR 2	z	J 2012	50	28,70 ± 0,72	24,9 ± 0,98	1,2 ± 0,28
	BCR 3	z	J 2012	50	25,11 ± 0,63	32,3 ± 0,85	4,77 ± 0,42
	BCR 4	z	J 2012	50	37,3 ± 0,78	26,71 ± 1,00	0,8 ± 0,42
	BCR 1	z	P 2012	50	41,70 ± 1,01	40,9 ± 1,11	0,3 ± 0,05
	BCR 2	z	P 2012	50	33,3 ± 1,05	33,1 ± 1,04	0,5 ± 0,41
	BCR 2	č	P 2012	50	24,78 ± 0,22	29,36 ± 0,98	0,13 ± 0,05
	BCR 3	z	P 2012	50	36,8 ± 0,51	32,38 ± 1,23	5,13 ± 0,05
	BCR 3	č	P 2012	50	29,77 ± 1,00	31,91 ± 0,56	5,7 ± 0,14
	BCR 5	z	P 2012	50	44,25 ± 0,44	35,17 ± 1,65	4,55 ± 0,05
	BCR 5	č	P 2012	50	51,21 ± 0,91	36,53 ± 1,09	5,23 ± 0,09
	BCR 6	z	P 2012	50	58,85 ± 0,71	39,31 ± 0,69	3,73 ± 0,09
	BCR 1	z	J 2013	50	25,07 ± 1,00	32,10 ± 0,23	0,49 ± 0,22
	BCR 4	z	J 2013	50	39,21 ± 1,11	25,21 ± 0,40	0,53 ± 0,26
	BCR 5	z	J 2013	50	51,22 ± 0,91	26,74 ± 0,28	3,43 ± 0,05
	BCR 6	z	J 2013	50	34,6 ± 1,00	31,26 ± 0,30	0,92 ± 0,01
	<i>B. ciliata</i>	BCL 1	z	P 2011	40	7,00 ± 1,74	26,5 ± 1,21
BCL 1		z	J 2012	50	6,20 ± 0,41	32,44 ± 1,20	1,0 ± 0,22
BCL 2		z	P 2012	50	7,84 ± 0,55	25,64 ± 0,19	0,23 ± 0,05
BCL 1		z	P 2012	50	7,32 ± 1,00	24,70 ± 0,93	2,83 ± 0,17
BCL 1		č	P 2012	50	9,43 ± 0,57	29,68 ± 0,61	3,21 ± 0,10
BCL 2		z	J 2013	50	5,90 ± 0,61	30,25 ± 0,31	3,13 ± 0,05
BCL 1		z	J 2013	50	6,90 ± 0,80	26,35 ± 0,65	0,57 ± 0,05
<i>B. x ornata</i>	BOR 1	z	P 2011	40	38,80 ± 1,00	28,63 ± 1,03	6,23 ± 0,09
	BOR 1	z	J 2012	50	35,80 ± 0,61	36,92 ± 1,20	4,67 ± 0,33
	BOR 2	z	J 2012	50	51,02 ± 0,89	49,36 ± 1,31	5,53 ± 0,76
	BOR 1	z	P 2012	50	51,04 ± 1,21	35,34 ± 1,23	4,37 ± 0,05
	BOR 1	č	P 2012	50	36,48 ± 0,61	30,14 ± 0,92	3,97 ± 0,05
	BOR 1	z	J 2013	50	34,20 ± 0,90	38,42 ± 1,02	4,9 ± 0,28

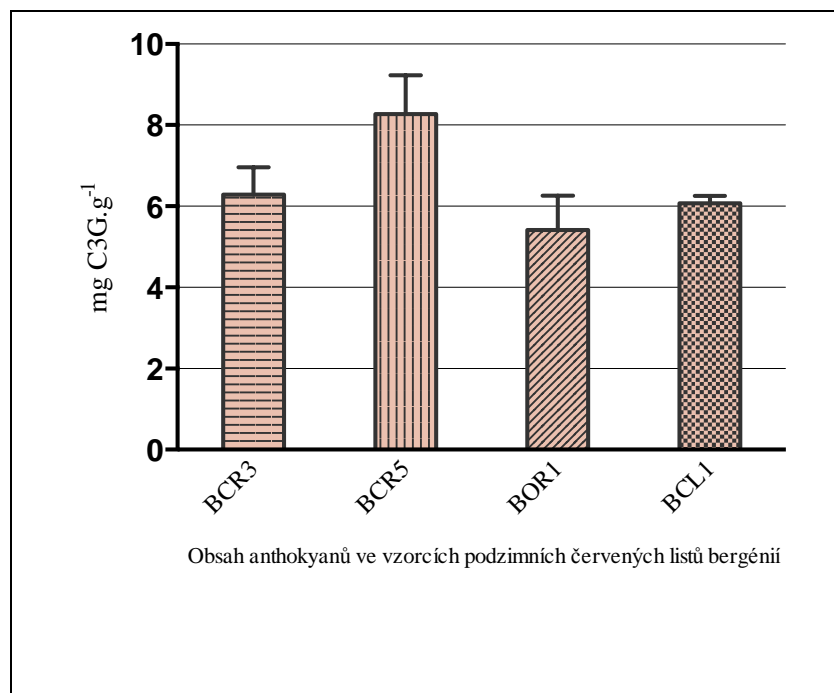
#### 5.1.4. Stanovení obsahu anthokyanů

Stanovení obsahu anthokyanů bylo provedeno pH – diferenční metodou. Z hodnot měření absorbance kalibračních roztoků kyanidinu-3-*O*- $\beta$ -glukosidu (C3G) při vlnových délkách 350 – 600 nm proti slepému vzorku (pufr) byl vygenerován graf závislosti absorbance na vlnové délce. Automatickým programem pak byla vyhodnocena diferenční křivka, jako rozdíl absorbancí barevné a bezbarvé formy kalibračních roztoků (**Obr. č. 10**). Výsledné hodnoty odpovídaly ploše pod diferenční křivkou AUC. Z hodnot ploch pod křivkou při různých koncentracích byla sestavena kalibrační křivka pro výpočet obsahu anthokyanů ve vzorcích. Výsledný obsah anthokyanů byl vyjádřen v ekvivalentu kyanidin-3-*O*- $\beta$ -glukosidu, v mg C3G.g<sup>-1</sup> rostlinného materiálu.

Pro stanovení obsahu anthokyanů byly vybrány červené listy bergenií z podzimního sběru 2012 (BCR 3, BCR 5, BOR 1 a BCL 1). Nejvyšší obsah anthokyanů v sušině byl stanoven v červených listech *B. crassifolia* (8,30 ± 0,08 mg C3G.g<sup>-1</sup>), následován *B. ciliata* (6,10 ± 0,01 mg C3G.g<sup>-1</sup>) a *B. x ornata* (5,41 ± 0,06 mg C3G.g<sup>-1</sup>), (**Obr. č. 21**).

Haslam <sup>137)</sup> izoloval proanthokyanidiny z oddenků *B. crassifolia* a *B. cordifolia*. Prozatím však neexistují žádné studie, které by porovnávaly obsah anthokyanů v listech či oddencích různých druhů bergenií.





**Obrázek č. 21:** Průměrné koncentrace anthokyanů v listových extraktech červených listů *B. crassifolia* (BCR 3 a 5), *B. x ornata* (BOR 1) a *B. ciliata* (BCL 1) vyjádřené v mg C3G.g<sup>-1</sup> rostlinného materiálu.

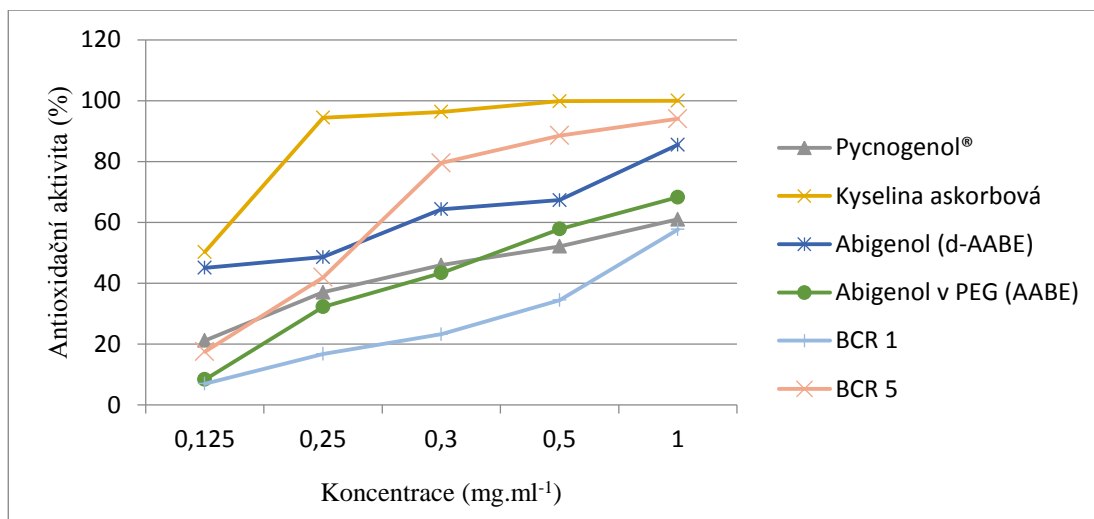
## 5.2. Biologická aktivita

### 5.2.1. Antioxidační a antiradikálová aktivita

Antioxidační a antiradikálová aktivita byla stanovena podle upravených metodik dle práce Krakar. <sup>108)</sup> Pro všechny metody (DPPH, ABTS, NADH, FRAP) byla také stanovena jejich linearita a opakovatelnost (denní a mezi-denní). Antioxidační a antiradikálová aktivita byla testována u 32 vybraných vzorků červených a zelených listů bergénií ze všech sběrných období z let 2011 až 2013.

#### 5.2.1.1. Metoda DPPH

Syntetický radikál DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) patří mezi nejběžněji využívané látky pro stanovení antiradikálové aktivity přírodních sloučenin. Pro tuto metodiku byla stanovena její opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (denní: 12,04 %, mezidenní: 17,34 %) a linearita. Na **Obrázku č. 22** je znázorněna závislost antiradikálové aktivity (v %) na vzrůstající koncentraci standardů (Pycnogenol<sup>®</sup>, suchý extrakt abigenol, abigenol rozp. v PEG, kyselina askorbová) a listových vodných extraktů *B. crassifolia* (BCR 1 a 5, P2012). Extrakt BCR 5 z červených listů přitom vykazoval mnohonásobně vyšší aktivitu než vzorek ze zelených listů BCR 1 a blížil se aktivitě kyseliny askorbové. Rozdíl mohl být způsoben obsahem antiradikálově aktivních anthokyanů, které byly u vzorku z červených listů BCR 5 prokázány. Testované extrakty vykazovaly rozdílné hodnoty antiradikálové aktivity při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) jak je patrné z **Tabulky č. 8**. Antiradikálová aktivita byla nejvyšší u *B. crassifolia* a pohybovala se od 20,67 (± 2,1) do 54,94 (± 0,4) %. Následována aktivitou *B. x ornata* (19,61 (± 0,2) až 39,99 (± 0,7) %) a *B. ciliata* (13,13 (± 0,8) až 28,83 (± 1,6) %). Vysokou aktivitu *B. ciliata* a *B. crassifolia* proti syntetickému radikálu DPPH uvádějí ve svých výsledcích již Uddin a kol. <sup>138)</sup>, Rajkumar a kol. <sup>69)</sup>, Pozharitskaya a kol. <sup>45)</sup> a Bagul a kol. <sup>139)</sup>

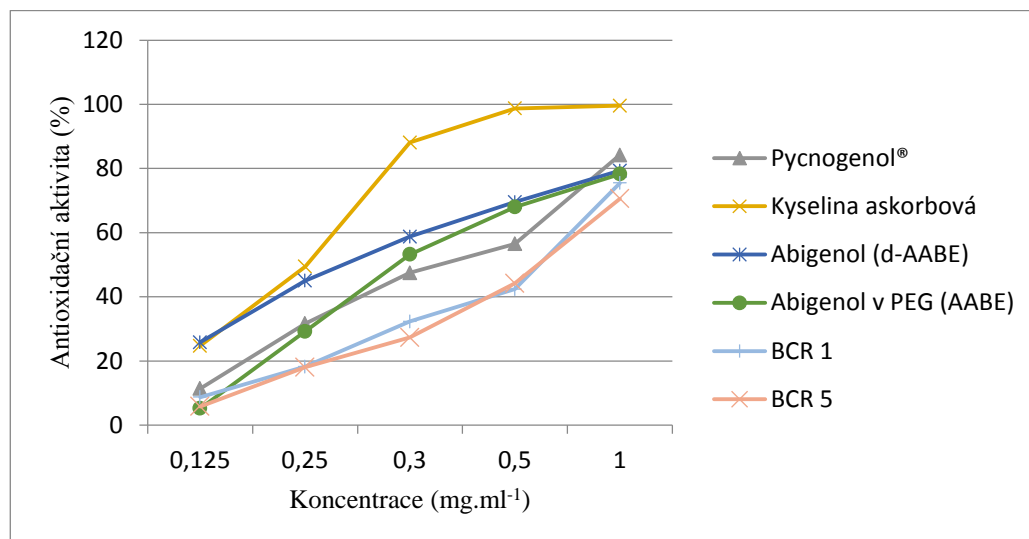


**Obrázek č. 22:** Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou DPPH na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011 a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).

#### 5.2.1.2. Metoda ABTS

Syntetický radikál ABTS (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) patří podobně jako DPPH mezi nejčastěji využívané látky pro stanovení antiradikálové aktivity. Pro tuto metodiku byla stanovena její opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (denní: 10,95 %, mezidenní: 11,75 %) a linearita. Na **Obrázku č. 23** je znázorněna závislost antiradikálové aktivity (v %) na vzrůstající koncentraci standardů (Pycnogenol<sup>®</sup>, suchý extrakt abigenol, abigenol v PEG, kyselina askorbová) a listových vodných extraktů zelených (BCR 1) a červených listů (BCR 5) *B. crassifolia*. Extrakty z bergenií se blížily aktivitě Pycnogenolu. Testované extrakty vykazovaly rozdílné hodnoty antiradikálové aktivity při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) jak je patrné z **Tabulky č. 8**. Antiradikálová aktivita byla nejvyšší u *B. crassifolia* (12,63 (± 0,9) až 44,23 (± 0,7) %), následována *B. x ornata* (24,12 (± 0,8) až 42,24 (1,2) %) a *B. ciliata* (4,46 (± 1,1) až 19,24 (± 1,1) %). Jak vyplývá z literatury,

lepší schopnost zhášet  $ABTS^+$  radikál (z 30 – 90 %) vykazují extrakty z oddenků bergénií, konkrétně z *B. purpurascens*, jak dokládá práce Bajracharya a kol. <sup>140)</sup>

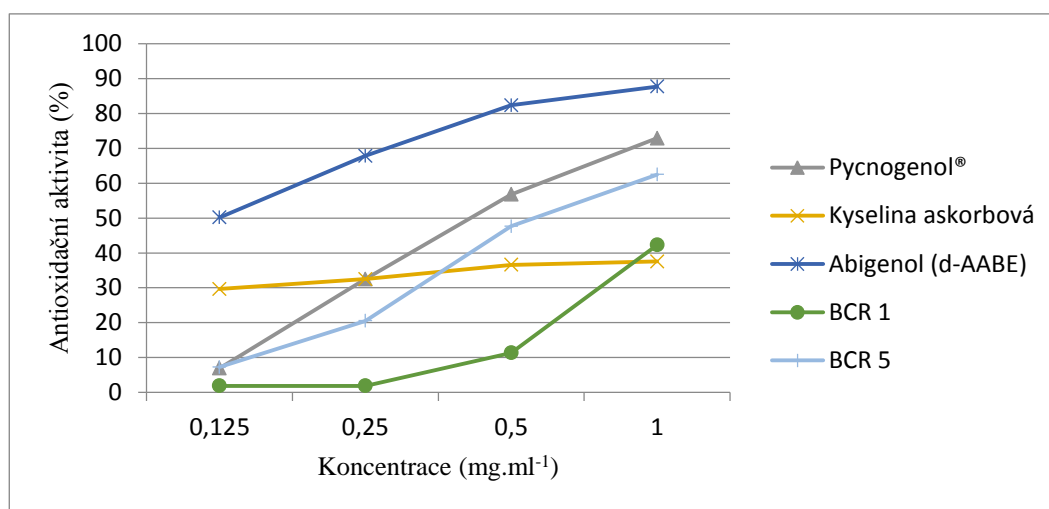


**Obrázek č. 23:** Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou ABTS na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergénií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011 a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).

### 5.2.1.3. Metoda NADH

Také pro tuto metodiku byla stanovena její opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (denní: 20,66 %, mezidenní: 14,37 %) a linearita. Vzhledem k vysokým odchylkám lze tuto metodu považovat za nejméně průkaznou při stanovování antiradikálové aktivity. Na **Obrázku č. 24** je znázorněna závislost antiradikálové aktivity NADH (v %) na vzrůstající koncentraci standardů (Pycnogenol<sup>®</sup>, suchý extrakt abigenol, abigenol rozp. v PEG, kyselina askorbová) a listových vodných extraktů zelených (BCR 1) a červených listů (BCR 5) *B. crassifolia*. Extrakty z bergénií se blížily aktivitě Pycnogenolu s tím, že extrakt z červených listů BCR 5 opět prokázal vyšší aktivitu (podobně jako u metody DPPH). Všechny testované extrakty vykazovaly rozdílné hodnoty aktivity při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) jak je

patrné z **Tabulky č. 8**. Nejvyšších hodnot inhibice superoxidového radikálu dosahovaly extrakty *B. crassifolia* (26,12 ( $\pm$  1,5) až 54,21 ( $\pm$  0,9) %), následovány *B. x ornata* (29,27 ( $\pm$  1,5) až 36,23 (1,0) %) a *B. ciliata* (15,95 ( $\pm$  1,3) až 35,73 ( $\pm$  0,3) %). Jak uvádí Mandal a kol.<sup>141)</sup> *B. ciliata* vykazuje silnou antiradikálovou aktivitu a je schopna inhibovat superoxidový radikál až ze 48,91 %, o něco méně než kvercetin (72,67 %).



**Obrázek č. 24:** Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou NADH na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011) a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).

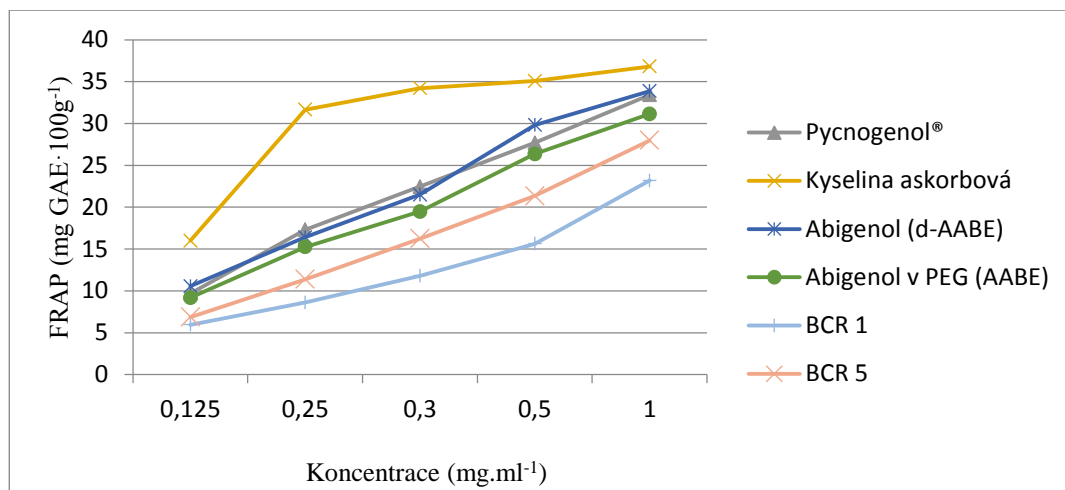
**Tabulka č. 8:** Antiradikálová aktivita extraktů zelených a červených listů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*, z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013, stanovená metodami DPPH, ABTS a NADH (v % ± SD). Aktivita extraktů byla porovnávána při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>). Nejvyšší hodnoty aktivity jsou barevně vyznačeny.

Druh	Vzorek	Barva listů	Termín sběru	Teplota sušení °C	DPPH %	ABTS %	NADH %
<i>B. crassifolia</i>	BCR 1	z	P 2011	40	28,85 ± 1,2	42,42 ± 1,3	32,48 ± 0,6
	BCR 2	z	P 2011	40	54,94 ± 0,4	31,51 ± 1,1	42,67 ± 1,9
	BCR 3	z	P 2011	50	27,17 ± 1,9	20,01 ± 1,8	40,47 ± 1,2
	BCR 1	z	J 2012	50	40,66 ± 0,6	12,63 ± 0,9	42,45 ± 1,2
	BCR 2	z	J 2012	50	35,05 ± 1,3	18,96 ± 0,7	26,12 ± 1,5
	BCR 3	z	J 2012	50	28,24 ± 1,8	17,47 ± 1,2	35,72 ± 0,6
	BCR 4	z	J 2012	50	32,44 ± 1,9	15,56 ± 0,9	28,76 ± 0,9
	BCR 1	z	P 2012	50	54,07 ± 0,6	22,65 ± 0,1	39,71 ± 0,9
	BCR 2	z	P 2012	50	29,83 ± 1,7	15,89 ± 0,7	37,02 ± 1,5
	BCR 2	č	P 2012	50	25,47 ± 1,9	22,82 ± 1,4	31,21 ± 0,4
	BCR 3	z	P 2012	50	34,19 ± 0,9	34,75 ± 2,1	50,87 ± 0,7
	BCR 3	č	P 2012	50	30,4 ± 1,3	19,57 ± 1,6	36,14 ± 1,2
	BCR 5	z	P 2012	50	42,53 ± 0,7	27,14 ± 0,6	44,27 ± 0,1
	BCR 5	č	P 2012	50	48,08 ± 0,7	44,23 ± 0,7	54,21 ± 0,9
	BCR 6	z	P 2012	50	24,42 ± 1,4	26,45 ± 0,7	44,27 ± 0,1
	BCR 1	z	J 2013	50	47,57 ± 0,4	18,73 ± 0,9	34,23 ± 1,2
	BCR 4	z	J 2013	50	22,81 ± 0,9	21,98 ± 1,1	28,29 ± 1,1
	BCR 5	z	J 2013	50	20,67 ± 2,1	25,24 ± 1,0	27,69 ± 0,9
	BCR 6	z	J 2013	50	34,36 ± 0,7	15,57 ± 0,8	29,89 ± 1,5
	<i>B. ciliata</i>	BCL 1	z	P 2011	40	13,13 ± 0,8	9,45 ± 2,1
BCL 1		z	J 2012	50	28,83 ± 1,6	17,86 ± 1,2	27,72 ± 1,3
BCL 2		z	P 2012	50	22,2 ± 0,4	18,42 ± 1,0	35,73 ± 0,3
BCL 1		z	P 2012	50	16,92 ± 1,4	8,99 ± 0,5	25,63 ± 1,9
BCL 1		č	P 2012	50	21,87 ± 1,8	4,46 ± 1,1	34,17 ± 1,2
BCL 2		z	J 2013	50	25,91 ± 0,2	19,24 ± 1,1	23,02 ± 1,1
BCL 1		z	J 2013	50	17,23 ± 1,3	12,45 ± 1,0	18,76 ± 1,9
<i>B. x ornata</i>	BOR 1	z	P 2011	40	19,61 ± 0,2	42,24 ± 1,2	29,31 ± 1,8
	BOR 1	z	J 2012	50	39,99 ± 0,7	33,13 ± 1,5	30,41 ± 1,3
	BOR 2	z	J 2012	50	32,59 ± 0,9	28,39 ± 1,9	36,23 ± 1,0
	BOR 1	z	P 2012	50	23,57 ± 1,1	33,65 ± 0,9	29,27 ± 1,5
	BOR 1	č	P 2012	50	27,03 ± 1,7	29,02 ± 2,3	34,94 ± 1,6
	BOR 1	z	J 2013	50	36,12 ± 1,7	24,12 ± 0,8	29,98 ± 1,2

#### 5.2.1.4. Metoda FRAP

Metoda FRAP je využívána k vyjádření celkové antioxidační kapacity a redukčních schopností testované látky. Také pro tuto metodiku byla stanovena její opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (denní: 1,88 %, mezidenní: 6,72 %) a linearita. Vzhledem k velmi dobré opakovatelnosti je tato metoda nejprůkaznější. Na **Obrázku č. 25** je znázorněna závislost antioxidační aktivity (vyjádřená v mg GAE.100g<sup>-1</sup>) na vzrůstající koncentraci standardů (Pycnogenol<sup>®</sup>, suchý extrakt abigenol, abigenol rozp. v PEG, kyselina askorbová) a listových vodných extraktů zelených (BCR 1) a červených listů (BCR 5) *B. crassifolia*. Extrakty z bergenií se blížily aktivitě abigenolu a Pycnogenolu. Testované extrakty vykazovaly rozdílné hodnoty antioxidační aktivity při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) jak je patrné z **Tabulky č. 9**. Nejvyšších hodnot antioxidační aktivity dosahovaly extrakty *B. crassifolia* (4,13 (± 0,80) až 21,48 (± 0,24) mg GAE.100g<sup>-1</sup>), následovány *B. x ornata* (12,46 (± 0,31) až 15,17 (± 1,00) mg GAE.100g<sup>-1</sup>) a *B. ciliata* (5,48 (± 0,73) až 15,63 (± 0,21) mg GAE.100g<sup>-1</sup>).

Jak uvádí Rajkumar a kol. <sup>69)</sup>, extrakt získaný z *B. ciliata* má silnou schopnost inhibovat komplex Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>, srovnatelně jako dibutyl-hydroxy-toluen (BHT). Aggarwal a kol. <sup>142)</sup> uvádí ve své studii silnou redukční sílu bergeninu srovnatelnou s komerčně dostupným antioxidantem tokoferolem.



**Obrázek č. 25:** Závislost stanovené antioxidační aktivity metodou FRAP vyjádřené v mg GAE.100g<sup>-1</sup> na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011) a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).



**Tabulka č. 9:** Antioxidační aktivita extraktů zelených a červených listů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*, z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013, stanovená metodou FRAP (vyjádřená v mg GAE.100g<sup>-1</sup> ± SD). Aktivita extraktů byla porovnávána při stejné koncentraci (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>). Vyšší hodnoty aktivity jsou vyznačeny barevně.

Druh	Vzorek	Barva listů	Termín sběru	Teplota sušení °C	FRAP mg GAE.100g <sup>-1</sup>
<i>B. crassifolia</i>	BCR 1	z	P 2011	40	14,31 ± 0,87
	BCR 2	z	P 2011	40	12,23 ± 0,74
	BCR 3	z	P 2011	50	14,68 ± 0,89
	BCR 1	z	J 2012	50	12,16 ± 0,40
	BCR 2	z	J 2012	50	12,43 ± 0,47
	BCR 3	z	J 2012	50	10,01 ± 0,90
	BCR 4	z	J 2012	50	10,04 ± 0,66
	BCR 1	z	P 2012	50	13,48 ± 0,75
	BCR 2	z	P 2012	50	11,32 ± 0,07
	BCR 2	č	P 2012	50	13,33 ± 1,52
	BCR 3	z	P 2012	50	15,92 ± 0,87
	BCR 3	č	P 2012	50	13,05 ± 0,63
	BCR 5	z	P 2012	50	15,63 ± 0,36
	BCR 5	č	P 2012	50	21,48 ± 0,24
	BCR 6	z	P 2012	50	14,17 ± 0,67
	BCR 1	z	J 2013	50	8,44 ± 0,12
	BCR 4	z	J 2013	50	6,70 ± 0,16
	BCR 5	z	J 2013	50	4,13 ± 0,80
	BCR 6	z	J 2013	50	8,43 ± 0,21
<i>B. ciliata</i>	BCL 1	z	P 2011	40	6,77 ± 0,07
	BCL 1	z	J 2012	50	11,08 ± 0,49
	BCL 2	z	P 2012	50	15,63 ± 0,21
	BCL 1	z	P 2012	50	10,03 ± 0,70
	BCL 1	č	P 2012	50	12,36 ± 0,50
	BCL 2	z	J 2013	50	6,17 ± 0,74
	BCL 1	z	J 2013	50	5,48 ± 0,73
<i>B. x ornata</i>	BOR 1	z	P 2011	40	13,43 ± 0,81
	BOR 1	z	J 2012	50	15,17 ± 1,00
	BOR 2	z	J 2012	50	12,46 ± 0,31
	BOR 1	z	P 2012	50	14,42 ± 0,90
	BOR 1	č	P 2012	50	13,53 ± 0,55
	BOR 1	z	J 2013	50	13,66 ± 0,44

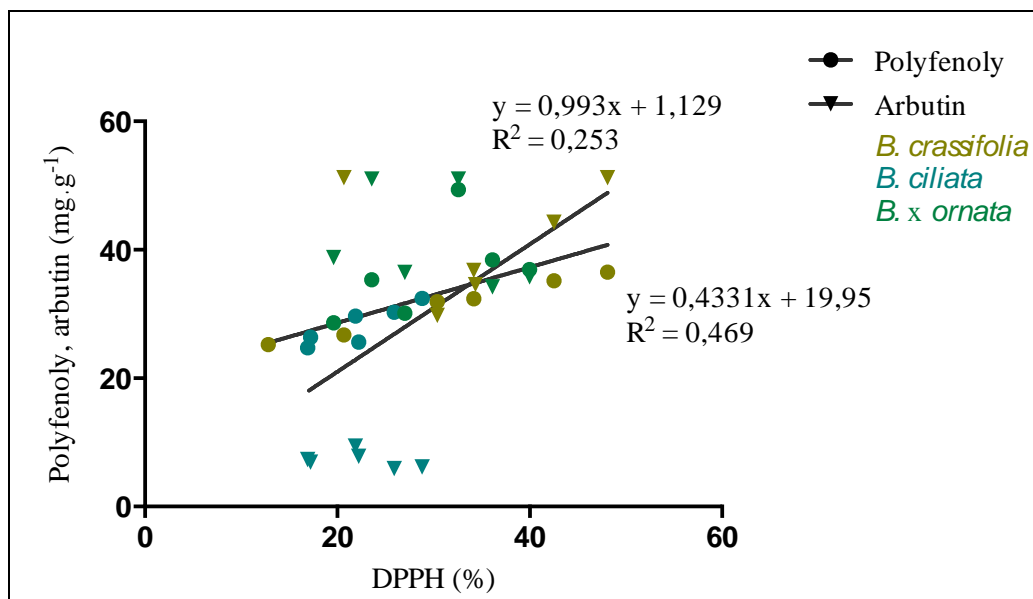
### 5.2.1.5. Stanovení závislosti antiradikálové aktivity na obsahu sekundárních metabolitů

Mnohé vědecké studie uvádějí silnou závislost mezi obsahem fenolických látek a antiradikálovou aktivitou. <sup>143 – 145, 167, 168)</sup> Statisticky významná a pozitivní korelace byla stanovena mezi všemi použitými metodami měření antiradikálové a antioxidační aktivity (DPPH, ABTS, NADH, FRAP) a obsahem sekundárních metabolitů (arbutinu, polyfenolů a bergeninu). Pro metodu DPPH byla stanovena nejtěsnější závislost mezi antiradikálovou aktivitou a obsahem celkových polyfenolů ( $R^2 = 0,469$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 26**), následovala závislost na obsahu bergeninu ( $R^2 = 0,350$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 27**). Nejmenší závislost na aktivitě zde vykazoval obsah arbutinu ( $R^2 = 0,253$ ,  $p < 0,05$ ). Naopak u metody ABTS byla zjištěna nejprůkaznější statistická závislost mezi zjištěnou aktivitou a obsahem bergeninu ( $R^2 = 0,614$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 29**) a arbutinu ( $R^2 = 0,602$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 28**). Statistická závislost mezi obsahem arbutinu a antiradikálovou aktivitou byla prokázána i metodou NADH ( $R^2 = 0,474$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 30**). Také vyšší obsah bergeninu je důvodem vyšší inhibice superoxidového radikálu, jak ukazuje **Obrázek č. 31** ( $R^2 = 0,387$ ,  $p < 0,05$ ). Extrakty bergenií mají schopnost redukovat ze vzorku také komplex  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$ , jak bylo prokázáno metodou FRAP, kterou se stanovuje celková antioxidační aktivita. Statistická závislost na antioxidační aktivitě byla průkazná pro bergenin ( $R^2 = 0,588$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 33**) a arbutin ( $R^2 = 0,470$ ,  $p < 0,05$ ), (**Obr. č. 32**).

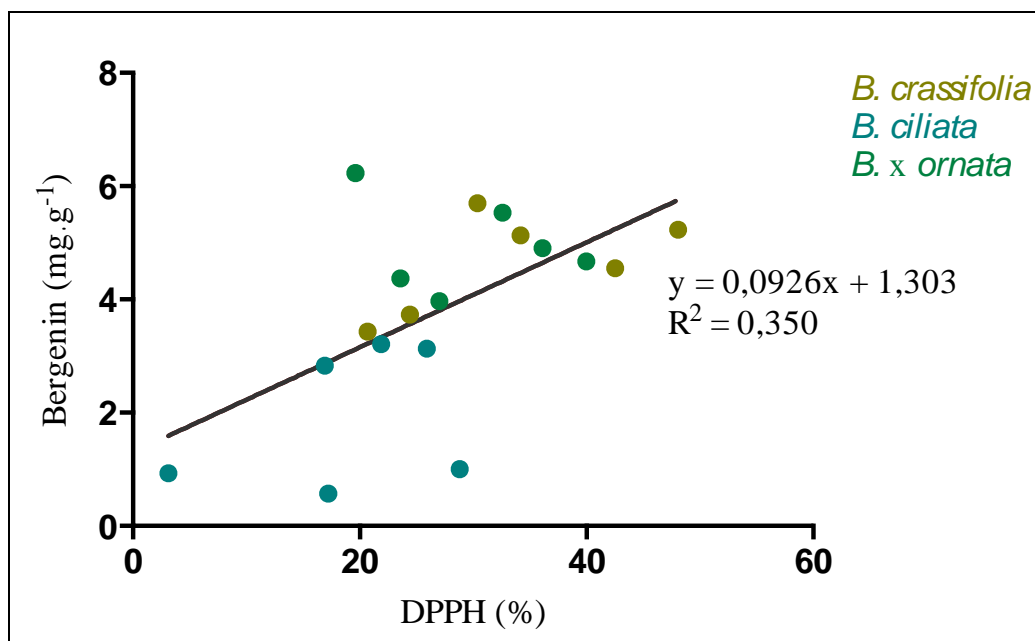
Výsledné hodnoty z měření antioxidační aktivity (metodou FRAP) vzorků zelených listů BCR 1, BCL 1 a BOR 1, byly porovnány s výsledky ze stanovení obsahu sekundárních metabolitů. Sledována přitom byla nejen závislost mezi aktivitou a obsahem fenolických látek, ale také závislost na daném sběrovém období. Z tohoto porovnání vyplynulo, že vyššímu obsahu sekundárních metabolitů v podzimních měsících odpovídá i zvýšená antioxidační aktivita. Nejprůkazněji je to patrné u vzorku *B. crassifolia* (BCR 1), jak je zobrazeno na **Obrázku č. 34**, méně pak u vzorku *B. ciliata* (BCL 1) a *B. x ornata* (BOR 1), (**Obr. č. 35 a 36**).

Z těchto výsledků je zřejmé, že fenolické sekundární metabolity přímo ovlivňují schopnost extraktů bergenií eliminovat radikály. Již Rajkumar a kol.<sup>69)</sup> uvedl statisticky významnou závislost mezi celkovým obsahem fenolických látek u *B. ciliata* a antiradikálovou aktivitou proti DPPH a hydroxylovému radikálu ( $R^2 = 0,902$  a  $0,994$ ,  $p < 0,05$ ).

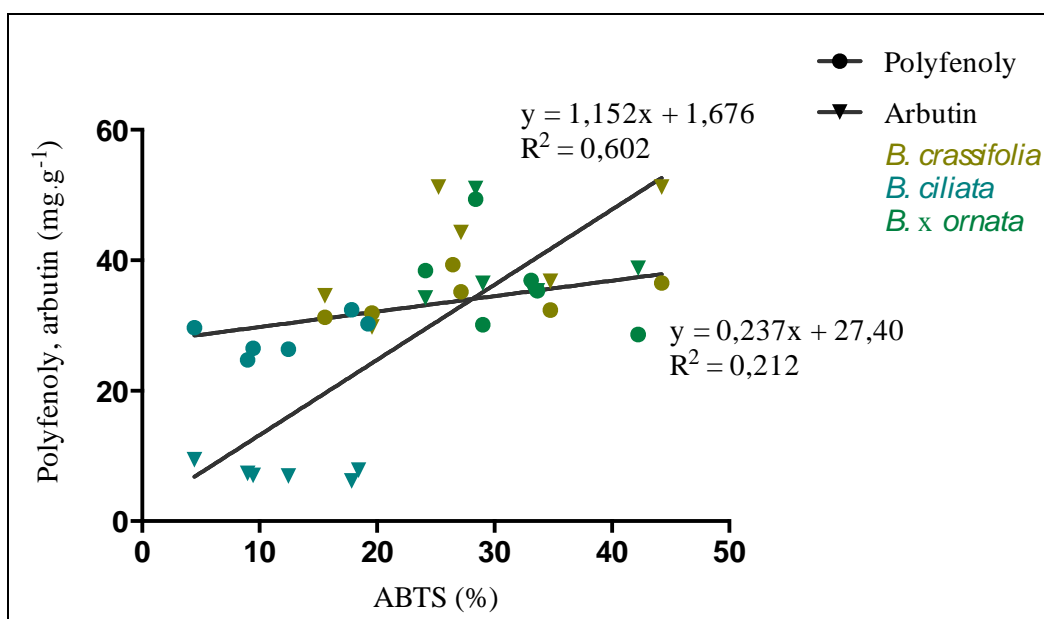
Z výše uvedeného statistického porovnání výsledných hodnot vyplývá, že antiradikálová aktivita listových extraktů bergenií je ovlivněna, nejen přítomností bergeninu, arbutinu a polyfenolů, ale i dalšími látkami. Jak stanovil Roselli a kol.<sup>146)</sup>, vyšší antiradikálovou aktivitu než bergenin a arbutin vykazovaly u *B. cordifolia* sloučeniny typu (+)-katechin 3-O-gallát, (+)-katechin 3,5-di-O-gallát a 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukopyranosid. Aktivita může být ovlivněna i dalšími sekundárními metabolity. Pozharitskaya a kol.<sup>45)</sup> uvádí, že antiradikálová aktivita listových extraktů *B. crassifolia* je přímo úměrná přítomnosti fenolických látek. Nejvyšší aktivitu přitom vykazují kyselina gallová, arbutin, kyselina ellagová a hydrochinon (kyselina gallová > arbutin > kyselina ellagová > hydrochinon). Také Shilova a kol.<sup>147)</sup> uvádí závislost mezi fenolickými látkami obsaženými v listových extraktech *B. crassifolia* a antioxidační aktivitou. Nejvyšší aktivitu přitom vykazují hydrochinon, kvercetin a kyselina gallová.



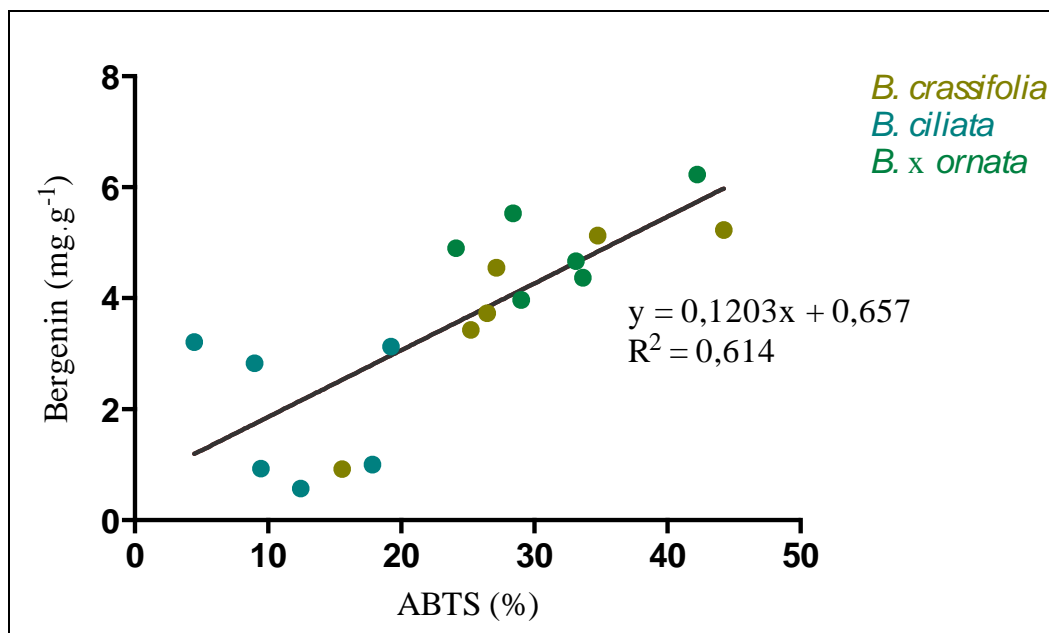
**Obrázek č. 26:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou DPPH na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



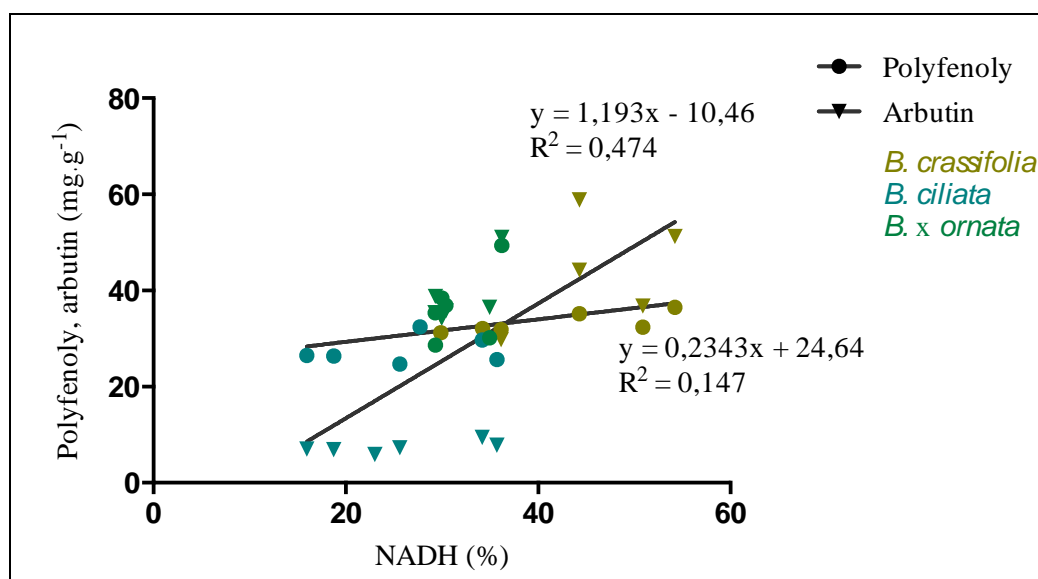
**Obrázek č. 27:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou DPPH na obsahu bergeninu pro vybrané vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



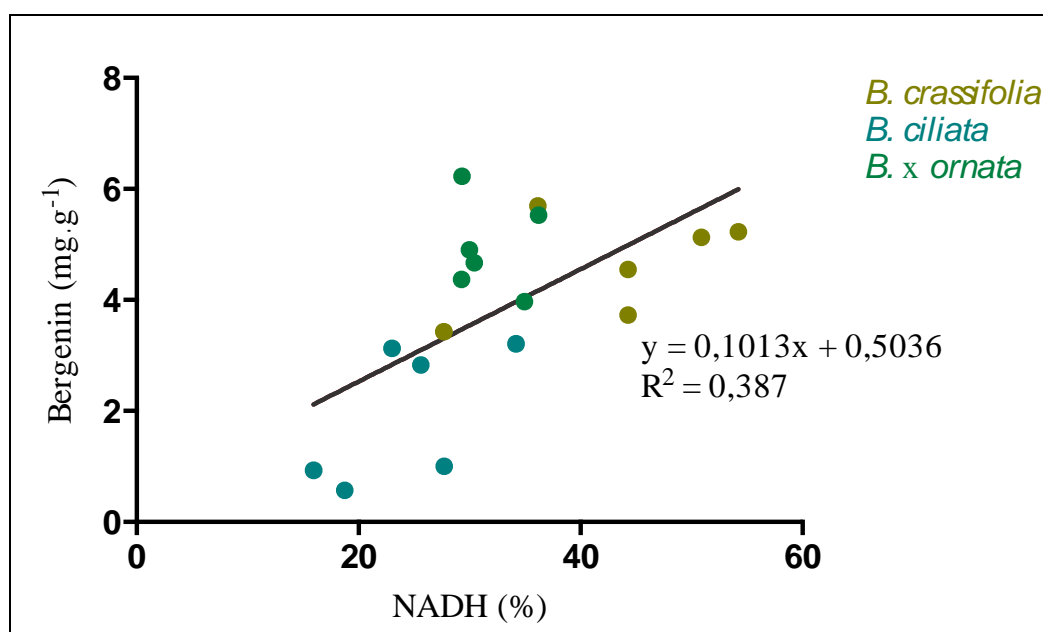
**Obrázek č. 28:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou ABTS na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



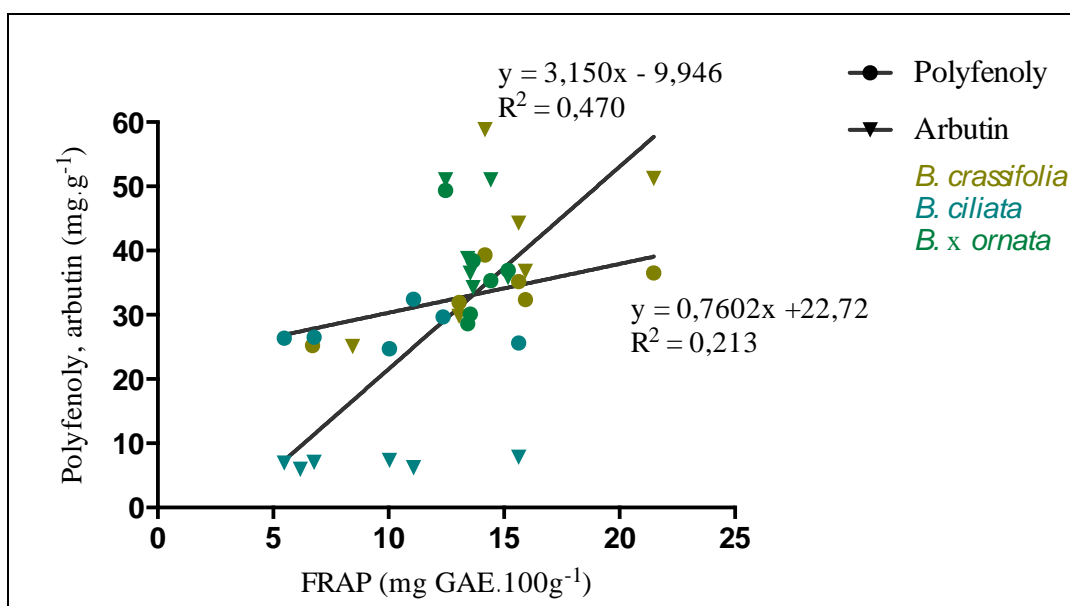
**Obrázek č. 29:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou ABTS na obsahu bergeninu pro vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



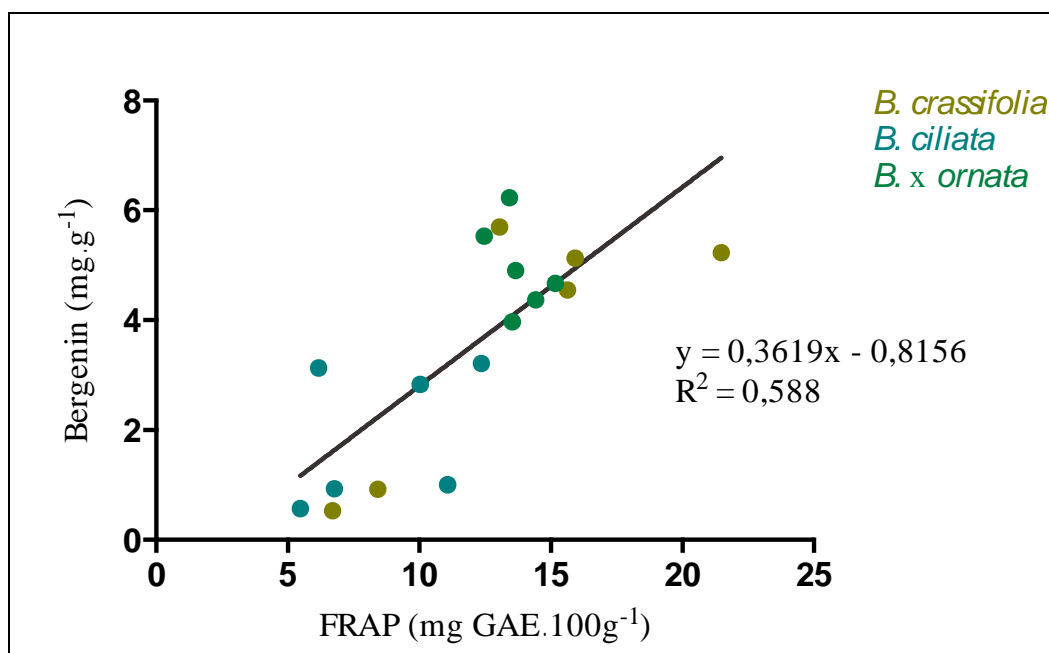
**Obrázek č. 30:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou NADH na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



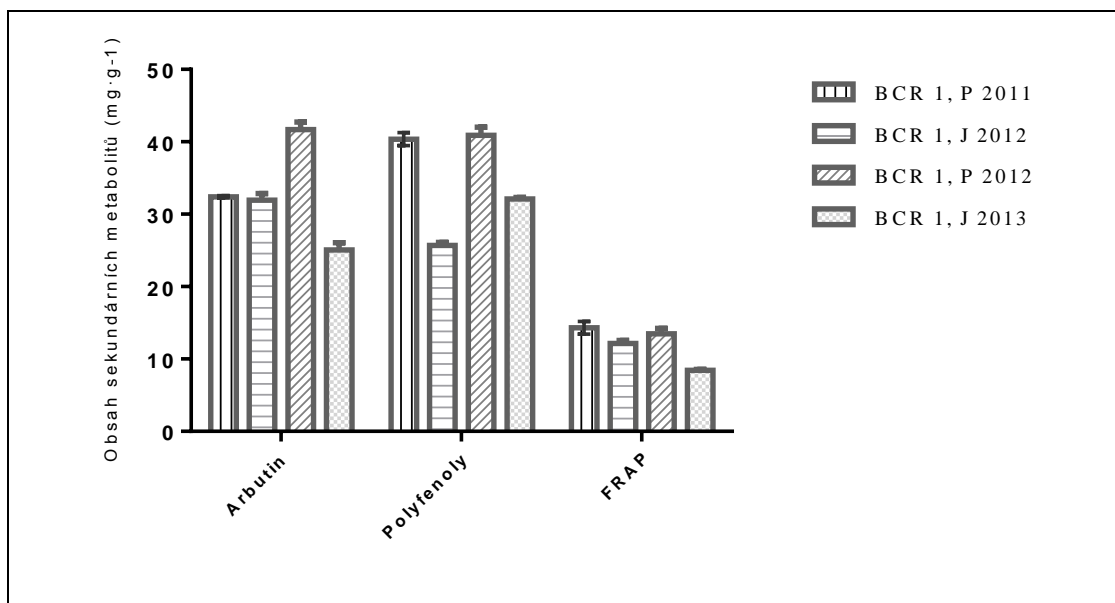
**Obrázek č. 31:** Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou NADH na obsahu bergeninů pro vzorky *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



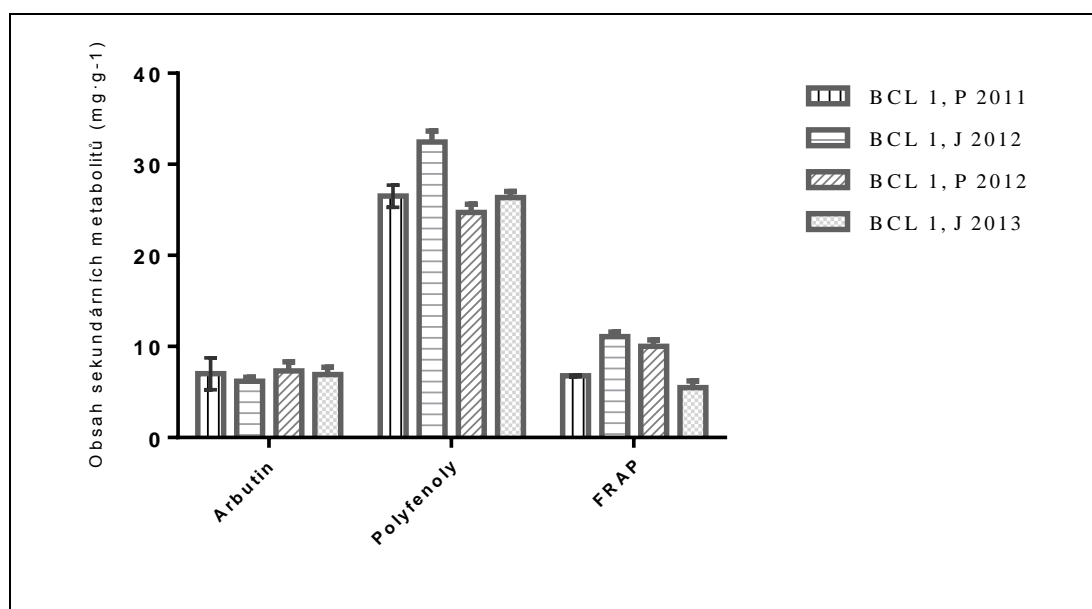
**Obrázek č. 32:** Závislost antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů u *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.



**Obrázek č. 33:** Závislost antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP na obsahu bergenuinu u *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata*.

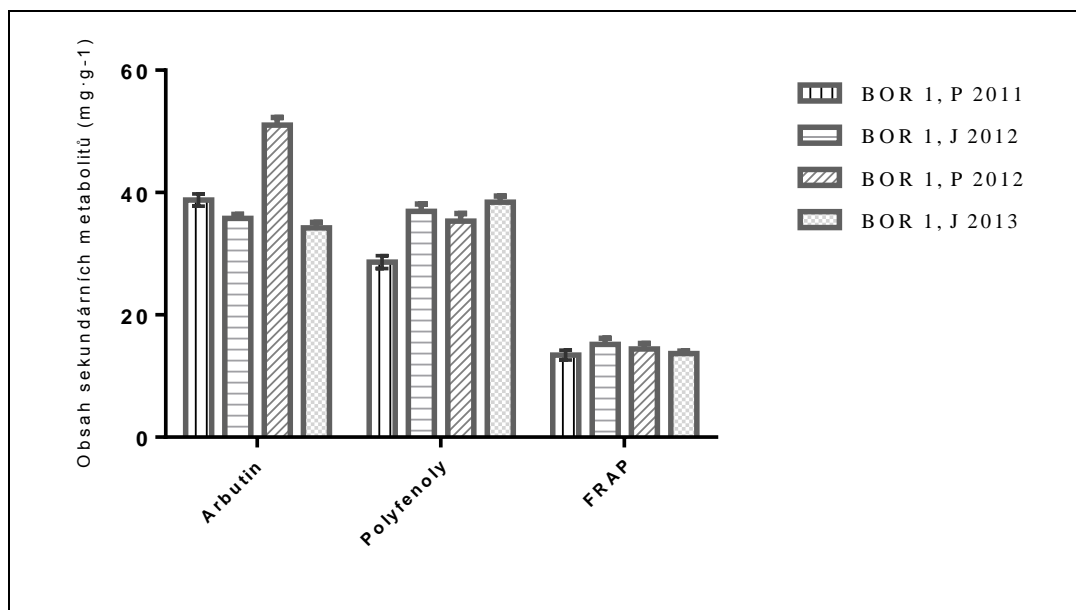


**Obrázek č. 34:** Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku *B. crassifolia* BCR 1, který byl odebíráán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J - jaro).



**Obrázek č. 35:** Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku *B. ciliata* BCL 1, který byl odebíráán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J - jaro).





**Obrázek č. 36:** Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku *B. ornata* BOR 1, který byl odebrán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J - jaro).

### 5.2.2. Tyrozinázová aktivita

Na základě prokázané přítomnosti arbutinu v listech *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* bylo provedeno stanovení inhibice enzymu houbové tyrozinázy. K tomuto účelu byly použity vodné a etanolové extrakty bergenií (vzorky BCR 3, BCL 1, BOR 1; vše z podzimního sběru 2012) v koncentracích 31, 63, 125 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jako standard byla použita kyselina citrónová. Výsledná hodnota tyrozinázové aktivity byla vyjádřena jako inhibiční aktivita sledované látky v porovnání s kontrolou (kontrola je rovna 1). Výsledky jsou průměrem ze tří až čtyř stanovení.

Nejvyšší pokles aktivity houbové tyrozinázy způsobil v porovnání se standardem kyselinou citrónovou (0,70 %) nejkonzentrovanejší etanolový extrakt *B. x ornata* (250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 0,67 ( $\pm$

0,11) %). Významné inhibice tyrozinázy dosáhl také etanolový extrakt *B. ciliata*. Aktivita tyrozinázy postupně klesala s rostoucí koncentrací extraktů, (**Tab. č. 10**). Etanolové extrakty tří studovaných bergenií vykazovaly velmi podobnou schopnost inhibovat tyrozinázu. Při porovnání inhibice enzymu tyrozinázy u červených a zelených listů *B. crassifolia* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (zelené listy – 0,76 ( $\pm$  0,08) %; červené listy – 0,77 ( $\pm$  0,06) %). Z výsledných hodnot vyplynulo, že vyšší inhibice tyrozinázy dosáhly etanolové extrakty (**Obr. č. 37**). Vodné extrakty bergenií (**Tab. č. 11**) naopak průkaznou tyrozinázovou aktivitu nevykazovaly (**Obr. č. 38**).

Jak vyplývá z literatury, podobnou inhibici jako arbutin vykazuje také hydrochinon a kvercetin, látky taktéž přítomné v listových extraktech bergenií (**Tab. č. 4**).<sup>148, 149</sup> Ačkoliv je arbutin ve vodě dobře rozpustný, hydrochinon a kvercetin jsou látky ve vodě, na rozdíl od etanolu, téměř nerozpustné. To může být důvodem proč vyšší inhibice aktivity houbové tyrozinázy dosáhly etanolové extrakty v porovnání s vodnými, u kterých nebyla tato schopnost prokázána. Taktéž nebyla prokázána statistická závislost mezi zjištěnými hodnotami obsahu arbutinu a inhibicí aktivity tyrozinázy. To také nasvědčuje tomu, že pokles aktivity tyrozinázy mají na svědomí i další chemické sloučeniny.

Tyrozináza (monofenol monooxygenáza) využívá molekulárního kyslíku k hydroxylaci L-tyrozinu na o-difenol-3,4-fenylalanin (DOPA) a oxidaci DOPA na dopachinon, který je prekurzorem eumelaninu a feomelaninu. Dopachinon je spontánně převeden na leukodopachrom, následně na dopachrom a po sérii oxidačně-redukčních reakcí na monomerní prekurzor 5,6-dihydroxyindol (DHI) a DHI-2-karboxylovou kyselinu (DHICA). V případě, že dopachrom nepodléhá spontánní dekarboxylaci na DHI, je enzymaticky převeden na DHICA, která je pak oxidována prostřednictvím TRP 1. DHICA a DHI následně polymerizují a tvoří eumelanin.<sup>150</sup> Studie Tada a kol.<sup>151</sup> odhalila, že

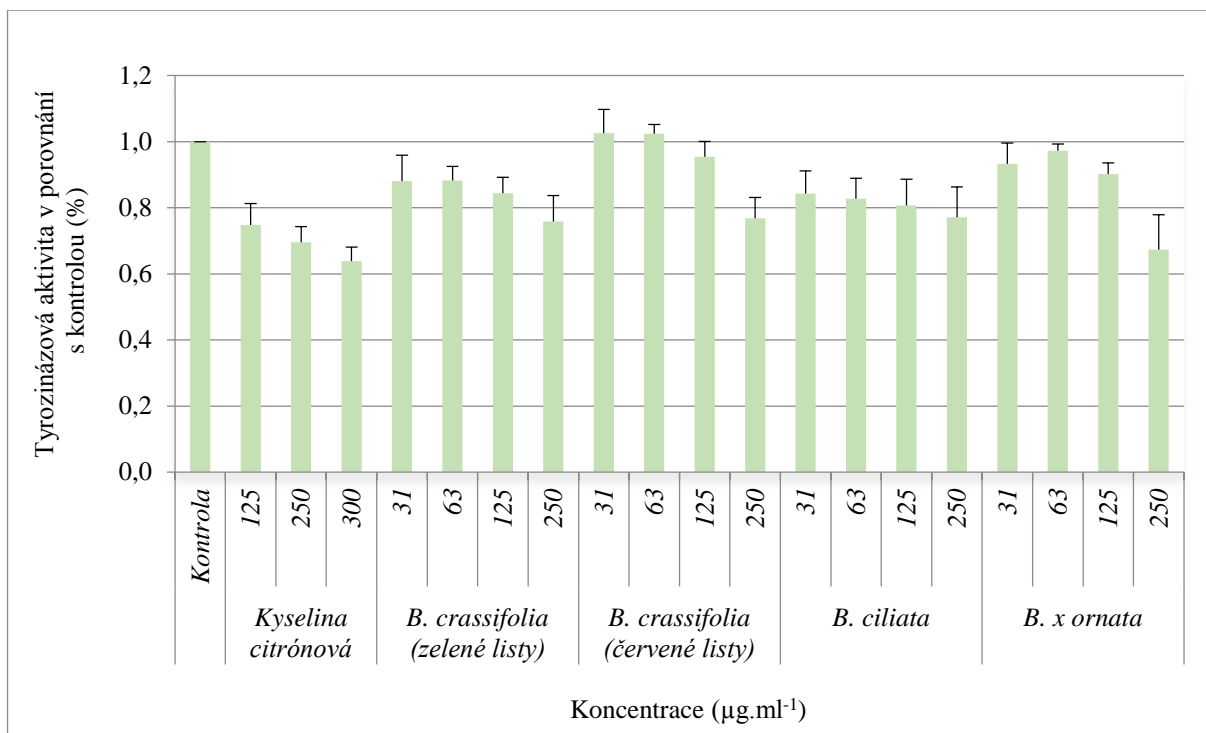
v průběhu katalytické přeměny L-tyrozinu na dopachinon jsou produkovány hydroxylové radikály. Tyrozinázové inhibitory tak mohou ovlivnit oxidativní změny v kůži inhibováním právě těchto radikálů. Arbutin má schopnost inhibovat nejen oxidaci L-DOPA, ale také hydroxylaci L-tyrozinu, zmírňuje tak oxidativní stres vyvolaný melanogenezí. Navíc má protizánětlivé účinky a zmírňuje kožní zánět způsobený vystavením pokožky UV radiaci.<sup>151)</sup> Qin a kol.<sup>148)</sup>, uvádí rozdílnou aktivitu arbutinu proti monofenol monooxygenáze a difenol monooxygenáze, která katalyzuje oxigenaci monofenolů (tyrozinu) na difenoly a dále oxidaci difenolů na chinony. Arbutin inhiboval enzymatickou aktivitu monofenoloxxygenázy, difenolázovou aktivitu houbové tyrozinázy však spíše povzbuzoval. Schopnost arbutinu inhibovat melanogenezi dokázal s pomocí *ex vivo* tkáňových kultur kožních buněk i Lim a kol.<sup>97)</sup> K dalším látkám, které mají schopnost inhibovat tyrozinázovou aktivitu patří aromatické kyseliny či kyselina kojová.<sup>148, 149)</sup>

**Tabulka č. 10:** Výsledky inhibice aktivity houbové tyrozinázy etanolových extraktů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* a standardu kyseliny citrónové (v porovnání s kontrolou, která je rovna 1). Výsledná hodnota je průměrem ze 4 stanovení (TYR01 - 04).

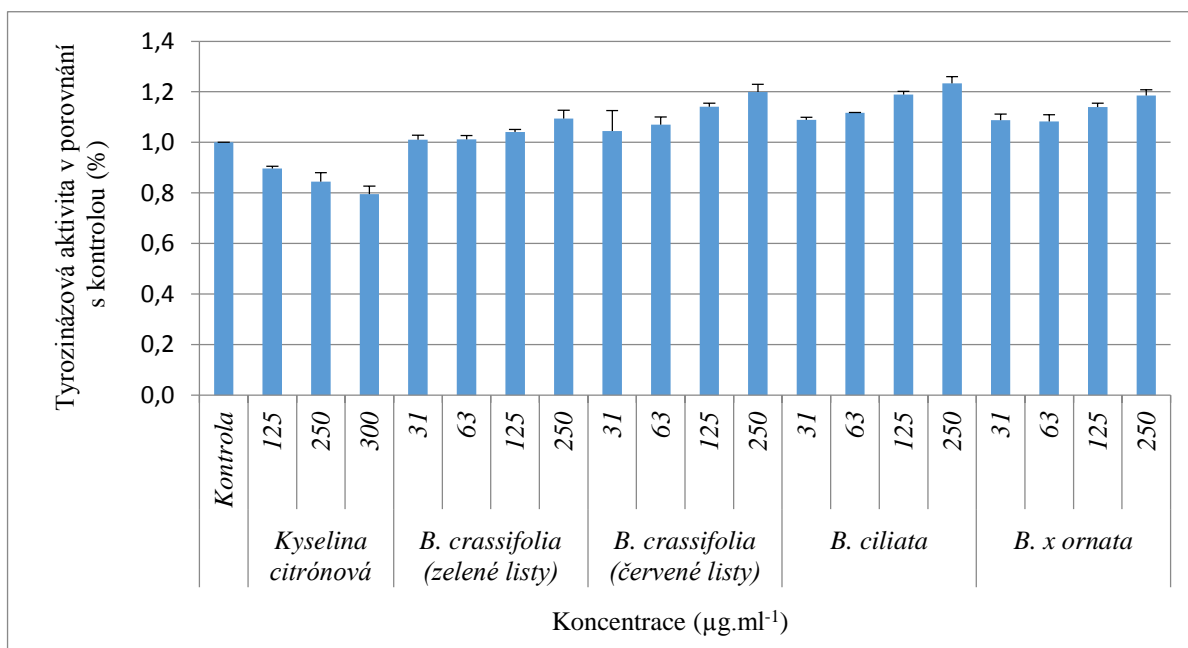
	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	TYR01 (A)	TYR02 (A)	TYR03 (A)	TYR04 (A)	Průměr $\pm$ SEM (%)
<b>Kontrola</b> (L-DOPA)	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00 $\pm$ 0,00
<b>Standard</b> (Kyselina citrónová)	125	0,61	0,68	0,89	0,82	0,75 $\pm$ 0,06
	250	0,56	0,75	0,76	0,72	0,70 $\pm$ 0,05
	300	0,74	0,61	0,53	0,67	<b>0,64 <math>\pm</math> 0,04</b>
<i><b>B. crassifolia</b></i> (zelené listy)	31	0,92	0,77	0,75	1,09	0,88 $\pm$ 0,08
	63	0,89	0,85	0,79	0,99	0,88 $\pm$ 0,04
	125	0,80	0,89	0,74	0,95	0,84 $\pm$ 0,05
	250	0,72	0,77	0,58	0,96	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,08</b>
<i><b>B. crassifolia</b></i> (červené listy)	31	1,10	1,04	0,82	1,14	1,03 $\pm$ 0,07
	63	1,07	1,07	0,98	0,97	1,02 $\pm$ 0,03
	125	0,92	1,06	1,00	0,84	0,95 $\pm$ 0,05
	250	0,67	0,85	0,65	0,90	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,06</b>
<i><b>B. ciliata</b></i>	31	0,86	0,87	0,65	0,99	0,84 $\pm$ 0,07
	63	0,82	0,87	0,66	0,95	0,83 $\pm$ 0,06
	125	0,74	0,80	0,65	1,03	0,81 $\pm$ 0,08
	250	0,67	0,72	0,65	1,04	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,09</b>
<i><b>B. x ornata</b></i>	31	1,02	0,95	0,75	1,01	0,93 $\pm$ 0,06
	63	1,00	1,01	0,93	0,95	0,97 $\pm$ 0,02
	125	0,86	1,00	0,87	0,87	0,90 $\pm$ 0,03
	250	0,49	0,71	0,53	0,95	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,11</b>

**Tabulka č. 11:** Výsledky inhibice aktivity houbové tyrozinázy vodných extraktů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* a standardu kyseliny citrónové. Výsledná hodnota je průměrem ze 3 stanovení (TYR01 - 03).

	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	TYR01 (A)	TYR02 (A)	TYR03 (A)	Průměr $\pm$ SEM (%)
<b>Kontrola (L-DOPA)</b>	100	1,00	1,00	1,00	1,00 $\pm$ 0,00
<b>Standard (Kyselina citrónová)</b>	125	0,91	0,90	0,88	0,90 $\pm$ 0,01
	250	0,91	0,80	0,82	0,84 $\pm$ 0,04
	300	0,84	0,81	0,73	0,79 $\pm$ 0,03
<b><i>B. crassifolia</i> (zelené listy)</b>	31	1,05	0,99	0,99	1,01 $\pm$ 0,02
	63	1,04	1,01	0,99	1,01 $\pm$ 0,01
	125	1,06	1,03	1,03	1,04 $\pm$ 0,01
	250	1,16	1,08	1,04	1,09 $\pm$ 0,03
<b><i>B. crassifolia</i> (červené listy)</b>	31	0,88	1,11	1,14	1,05 $\pm$ 0,08
	63	1,01	1,10	1,10	1,07 $\pm$ 0,03
	125	1,12	1,14	1,17	1,14 $\pm$ 0,01
	250	1,14	1,24	1,22	1,20 $\pm$ 0,03
<b><i>B. ciliata</i></b>	31	1,07	1,09	1,11	1,09 $\pm$ 0,01
	63	1,12	1,12	1,12	1,12 $\pm$ 0,00
	125	1,16	1,21	1,20	1,19 $\pm$ 0,01
	250	1,19	1,28	1,24	1,23 $\pm$ 0,03
<b><i>B. x ornata</i></b>	31	1,04	1,11	1,11	1,09 $\pm$ 0,02
	63	1,04	1,07	1,13	1,08 $\pm$ 0,03
	125	1,11	1,14	1,17	1,14 $\pm$ 0,02
	250	1,15	1,18	1,23	1,19 $\pm$ 0,02



**Obrázek č. 37:** Porovnání poklesu aktivity houbové tyrozinázy u etanolových extraktů z bergenií a standardu kyseliny citrónové (v porovnání s kontrolou, která je rovna 1). Aktivita tyrozinázy postupně klesá s rostoucí koncentrací extraktů a standardu.



**Obrázek č. 38:** Stanovení poklesu tyrozinázové aktivity u vodných extraktů bergenií a standardu kyseliny citrónové.

### 5.2.3. Antiparazitická aktivita

Larvální stádium (tetrahydridium) druhu *Mesocestoides corti* (tasemnice) bylo poprvé izolováno z ještěrek <sup>169)</sup> a po systematickém určení a zařazení bylo přejmenováno na *M. vogae*. <sup>170)</sup> Jedinci *M. vogae* se rozmnožují nepohlavně dělením v játrech a peritoneální dutině různých hostitelů (hlodavci, masožravci, ptáci, plazi) a někdy migrují do plic a ledvin. Anatomicky se skládají z tegumentu (povrch těla), parenchymu (pojivová tkáň), přísavek, svaloviny, nervové a exkreční soustavy (protonefridie). Několik imunocytochemických studií odhalilo, že larvy mají velmi dobře vyvinutý nervový systém s přítomnými signálními molekulami, jako jsou acetylcholin, serotonin, neuropeptid F a glutamát. <sup>171, 172)</sup> Larvální pohyb zajišťuje svalovina skládající se ze tří vrstev a umožňující longitudinální, diagonální a cirkulární pohyb. <sup>173)</sup> Larvální stádium *M. vogae* je experimentálním modelem pro zjišťování vlivu drog na nervosvalovou aktivitu. <sup>152)</sup>

V této studii byl sledován vliv chemicky čistých látek obsažených v listech bergenií (arbutin, bergenin) a vliv vodných (BCR 2, P2012) a etanolových (BOR 1, BCL 2 P2012) lyofilizovaných extraktů *B. crassifolia*, *B. x ornata* a *B. ciliata* na tvar a motilitu (pohyb) larev *M. vogae* v anaerobních podmínkách, které jsou přirozené pro tkáňové helminty jako jsou larvy tasemnic. Cílem bylo prokázat či vyvrátit larvicidní účinek těchto látek.

Morfologické změny larev byly sledovány pomocí inverzního mikroskopu po 4 až 24 hodinové a 3 až 7 denní inkubaci. Fotodokumentace se nachází v kapitole Obrazová příloha. Pro porovnání byla připravena kontrola s obsaženým médiem bez přidaných testovaných látek (**Obr. č. 62**). Ihned po přidání čistého bergeninu a arbutinu byly patrné okamžité změny v pohybu larev. Bergenin způsobil vyšší motilitu, některé z larev byly schopné dělení (**Obr. č. 63**). Motilita larev postupně klesala, ale i po 3 denní inkubaci larev v médiu s obsaženým bergeninem byl patrný intenzivnější pohyb (**Obr. č. 68**). Arbutin měl také vliv na vyšší

motilitu larev, která byla závislá na použité koncentraci vzorku a s klesající koncentrací klesala (**Obr. č. 64**). Extrakty bergenií vykazovaly nárůst motility larev po 5 až 6 hodinách inkubace. U některých exemplářů larev byl po přidání testovaných látek do média, pozorován nepřírozený atypický tvar (**Obr. č. 65, 66**). Pouze ojediněle byl zachycen mrtvý jedinec (**Obr. č. 67**). Nepřírozený zvrásnělý povrch larev po 3 denní inkubaci v médiu s arbutinem zobrazuje **Obrázek č. 69**. Ačkoli se po 7 denní inkubaci začaly objevovat v médiu s arbutinem či bergeninem patologické tvary larev *M. vogae* (**Obr. č. 71 - 73**), celkově testované přírodní látky úmrtnost larev nezvýšily, spíše naopak povzbudily jejich aktivitu. Ani extrakty bergenií neprokázaly toxické působení na larvy *M. vogae* (**Obr. č. 70**).

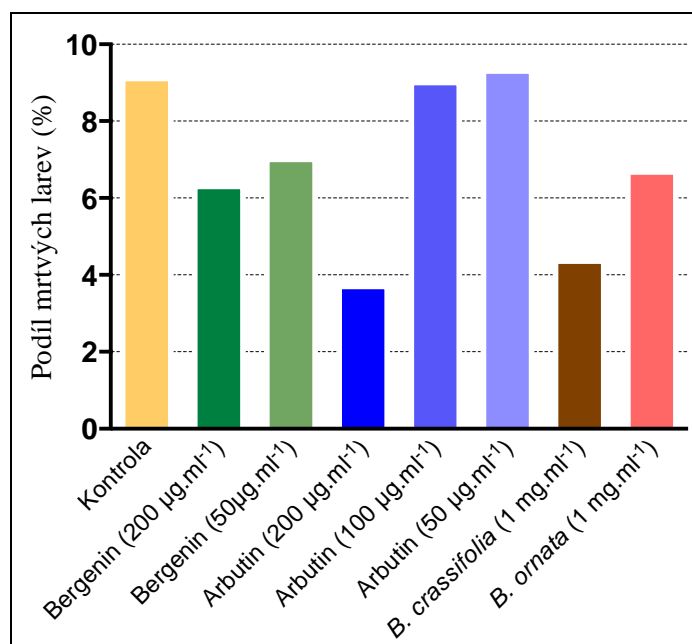
Po ukončení 7 denní kultivace byl stanoven podíl mrtvých a živých larev a určena látka s prokazatelně příznivým účinkem na larvy *M. vogae* (**Tab. č. 12**). Arbutin ovlivnil největší měrou přežívání larev při koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (3,77 %). Z extraktů byl pak nejúčinnější vodný extrakt *B. crassifolia* v koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (4,36 %). Prokazatelně pozitivní vliv testovaných látek na přežívání larev v porovnání s kontrolou (čisté médium) ukazuje **Obrázek č. 39**. Larvicidní účinek vodných a etanolových extraktů bergenií, ani bergeninu a arbutinu nebyl prokázán. Naopak tyto látky přispívají k vyšší aktivitě a životaschopnosti larev *M. vogae*.



**Tabulka č. 12:** Účinek inkubace s látkami/extrakty na přežívání larev *Mesocestoides vogae* v anaerobních podmínkách v médiu RPMI (objem média 10 ml, doba inkubace 7 dní, 37°C).

Vysvětlivky: *B. crassifolia* – vodný extrakt; *B. x ornata* – etanolový extrakt.

Testovaná látka	Koncentrace	Počet všech larev	Počet mrtvých larev	Podíl v %
Kontrola (médiu)	-	603	55	9,12
Bergenin	200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	316	20	6,3
Bergenin	50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	370	26	7,0
Arbutin	200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	397	15	<b>3,77</b>
Arbutin	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	298	27	9,06
Arbutin	50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	492	46	9,3
<i>B. crassifolia</i>	1 $\text{mg.ml}^{-1}$	298	13	<b>4,36</b>
<i>B. x ornata</i>	1 $\text{mg.ml}^{-1}$	314	21	6,68



**Obrázek č. 39:** Účinek 7 denní inkubace s testovanými látkami (bergeninu, arbutinu a extraktů *B. crassifolia* a *B. x ornata*) na přežívání larev *Mesocestoides vogae* v anaerobních podmínkách.

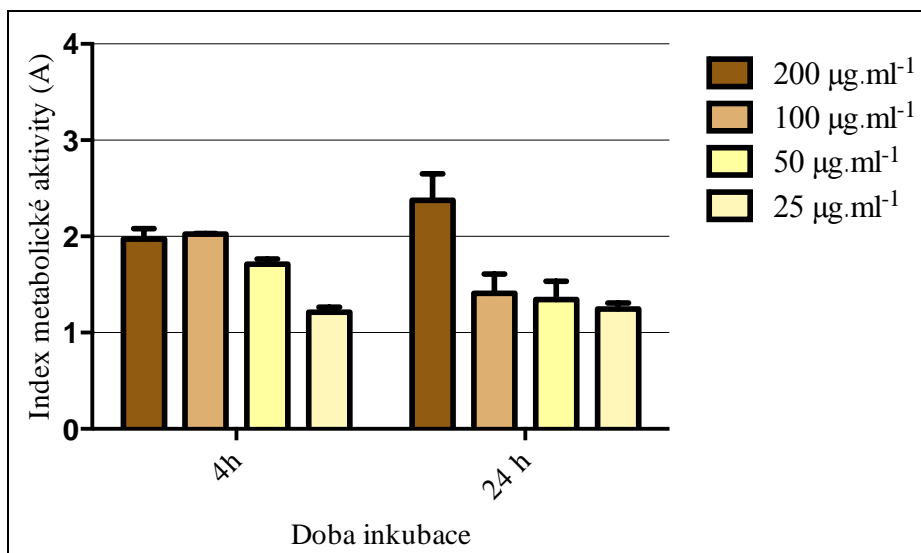
### 5.2.3.1. Test metabolické aktivity

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) test slouží ke stanovení aktivity enzymů, které jsou schopny redukovat MTT na fialově zbarvený formazan. Tento nerozpustný formazan je poté rozpuštěn v DMSO. Výsledná absorbance roztoku odpovídá indexu metabolické aktivity. Hlavní aplikací této metody je sledování viability a proliferace buněk. Využívá se však také k určení cytotoxicity. Cílem tohoto testu bylo stanovit, zda testované látky stimulují nebo potlačují metabolickou aktivitu larev kultivovaných v anaerobních i aerobních podmínkách.

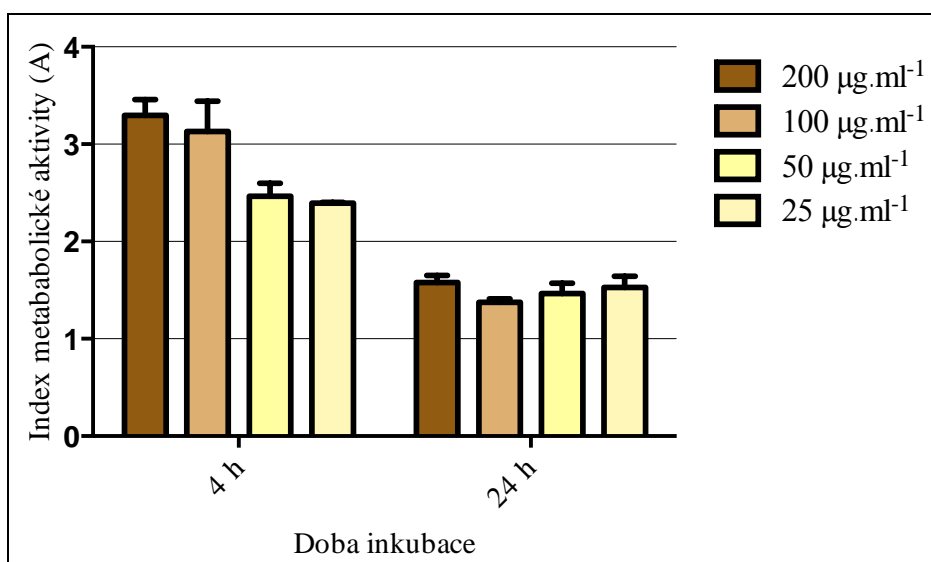
Bergenin v koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  vykazoval nejvyšší metabolickou aktivitu v anaerobních podmínkách po 4 hodinové inkubaci s larvami *M. vogae* (**Obr. č. 41**). Po 24 hodinové inkubaci se aktivita výrazně propadla. Podobný, i když ne tak výrazný, účinek na metabolickou aktivitu larev vykazoval i arbutin v koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  po 24 hodinové inkubaci (**Obr. č. 40**). V aerobních, pro larvy nepřirozených, podmínkách byla taktéž pozorována zvýšená metabolická aktivita v roztoku bergeninu o koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (**Obr. č. 43**). Tato aktivita se však po 24 hodinové inkubaci výrazně propadla. Vliv na zvýšení metabolické aktivity měl i roztok arbutinu o koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (**Obr. č. 42**). Index metabolické aktivity se výrazně zvýšil po přidání listových extraktů bergenií k larvám *M. vogae* v aerobních podmínkách, nejvíce u etanolového extraktu *B. x ornata* ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Po 24 hodinové inkubaci se aktivita opět výrazně propadla (**Obr. č. 44**).

U vnitřních parazitů se rozvinula řada specifických fyziologických funkcí nutných pro život v anaerobním prostředí hostitele. Každý vnitřní parazit přitom prochází určitým životním cyklem a musí být schopen přizpůsobit se životu také v aerobním prostředí. Nejdůležitějším faktorem pro přežití je jejich energetický metabolismus a schopnost dýchacího řetězce adaptovat se rozdílným podmínkám. V takovém systému hrají mitochondrie parazitů různé role a jsou schopny se morfologicky přizpůsobit aktuální potřebě. Předchozí studie ukázaly

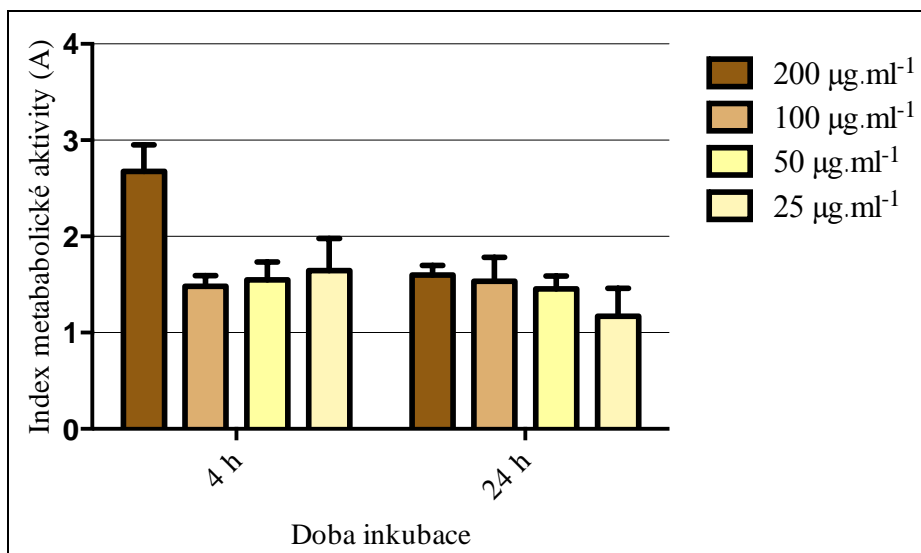
význam druhého komplexu dýchacího řetězce v energetickém metabolismu parazitů.<sup>153)</sup> Fosfoenolpyruvát karboxykinázo (PEPCK) – sukcinátová cesta (anaerobní glykolýza) produkuje ATP v prostředí se sníženým obsahem kyslíku. První polovina této dráhy, při které vzniká fosfoenolpyruvát (PEP), probíhá podobně jako u savců. Aerobní metabolismus zahrnuje přeměnu PEP na pyruvát prostřednictvím pyruvát kinázy a rozklad CO<sub>2</sub> a vody přes acetyl koenzym A a Krebsův citrátový cyklus. Naproti tomu u parazitů je CO<sub>2</sub> vázán na fosfoenolpyruvát karboxykinázu za vzniku oxalacetátu. Oxalacetát je přeměněn na malát (malát dehydrogenázou) a transportován do mitochondrií, kde je přeměněn na pyruvát a fumarát. V závěrečném kroku této přeměny pak NADH uvolněné při vzniku pyruvátu, redukuje fumarát na sukcinát. Tuto reakci katalyzuje systém NADH-fumarát reduktázy, který zajišťuje anaerobní elektronový transport v mitochondriích parazitů.<sup>153, 154)</sup> A právě sukcinát je donorem elektronů při intracelulární redukcí MTT na formazan prostřednictvím mitochondriální sukcinát dehydrogenázy II. komplexu dýchacího řetězce.<sup>155)</sup> Tuto reakci mohou ovlivnit také enzymy katalyzující přeměnu NAD(P)H na endoplazmatickém retikulu. Metoda MTT je založena na schopnosti mitochondriálních enzymů životaschopných buněk transformovat MTT tetrazolium bromid na formazan.<sup>111)</sup> Získané hodnoty metabolické aktivity korespondují s aktuální adaptací dýchacího řetězce *M. vogae* na měnící se podmínky prostředí a odrážejí případný oxidativní stres a toxicitu. Toxicita testovaných látek a listových extraktů nebyla MTT testem prokázána. Naopak došlo k výraznému zvýšení metabolické aktivity ihned po přidání těchto látek do média. Tyto látky tak zapříčinily aktivaci dýchacího řetězce. Po delší inkubaci došlo k výraznému snížení této aktivity, to mohlo být způsobeno oxidativně-metabolickým stresem. Vliv testovaných přírodních látek na metabolismus a dýchací řetězec *M. vogae* je předmětem dalšího výzkumu. Cílem studia přírodních látek je najít tu, která by byla schopna selektivně blokovat některý z enzymů, narušila tak metabolismus a způsobila smrt parazitů.



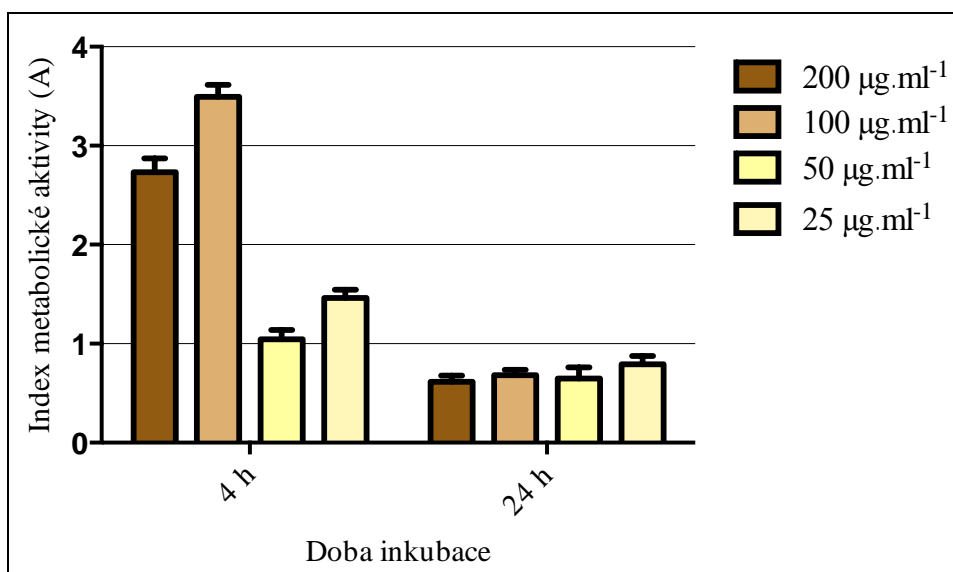
**Obrázek č. 40:** Vliv různých koncentrací čistého arbutinu na metabolickou aktivitu (vyjádřená jako index metabolické aktivity v porovnání s neovlivněnými larvami, kde je index 1) larev *Mesocostoides vogae* v anaerobních podmínkách.



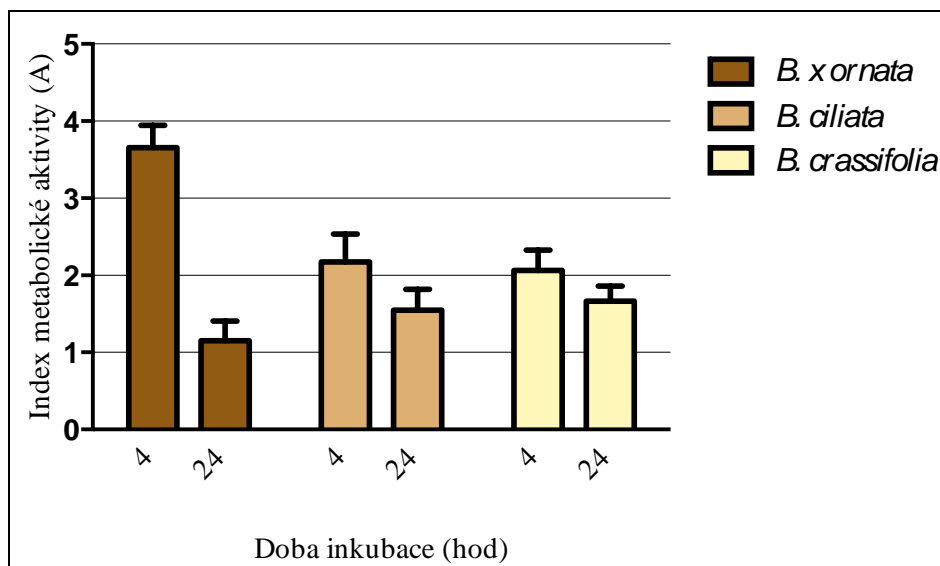
**Obrázek č. 41:** Vliv různých koncentrací čistého bergeninů na metabolickou aktivitu larev *Mesocostoides vogae* v anaerobních podmínkách.



**Obrázek č. 42:** Vliv různých koncentrací čistého arbutinu na metabolickou aktivitu larev *Mesocostoides vogae* v aerobních podmínkách.



**Obrázek č. 43:** Vliv různých koncentrací čistého bergeninů na metabolickou aktivitu larev *Mesocostoides vogae* v aerobních podmínkách.



**Obrázek č. 44:** Účinek extraktů bergenií (vodného *B. crassifolia*; etanolových *B. ciliata* a *B. x ornata*) na metabolickou aktivitu larev *Mesocestoides vogae* v aerobních podmínkách.

### 5.2.3.2. Stanovení celkových lipidů u larev *Mesocestoides vogae*

Lipidy mají velký význam jako energeticky bohaté rezervní látky. Při příjmu živin nad normální spotřebu se tuky ukládají a v období nedostatečného příjmu potravy se odbourávají. Prvním krokem je štěpení tuků lipázami na glycerol a mastné kyseliny. Štěpné produkty lipidů jsou dále metabolizované. Glycerol slouží k syntéze sacharidů, mastné kyseliny se odbourávají  $\beta$ -oxidací. Úloha tuků v metabolismu plochých červů je však stále nejasná.<sup>156</sup>  
<sup>157)</sup> Metabolické studie tak mohou přinést významná zjištění o mechanismu působení potenciálních antiparazitických léčiv.

Stanovení koncentrace lipidů v larvách *M. vogae* bylo provedeno v anaerobních (přirozených) podmínkách (**Tab. č. 13**). Testované čisté látky arbutin a bergenin v koncentraci 50, 100 a 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  snížily přítomnost lipidů v larvách nejprůkazněji po 3 denní inkubaci (**Obr. č. 46**). Nejméně byla koncentrace lipidů v larvách ovlivněna po 5 hodinové inkubaci (**Obr. č. 45**). Po

7 denní inkubaci koncentrace lipidů opět stoupla (**Obr. č. 47**). Vliv listových extraktů *B. crassifolia*, *B. ciliata* a *B. x ornata* na koncentraci lipidů v buňkách larev byl sledován po 5 hodinové a 7 denní inkubaci. Nejprůkaznější vliv na snížení koncentrace lipidů měly extrakty po 5 hodinové inkubaci s larvami (**Obr. č. 48**). Po 7 denní inkubaci začalo množství lipidů opět stoupat (**Obr. č. 49**).

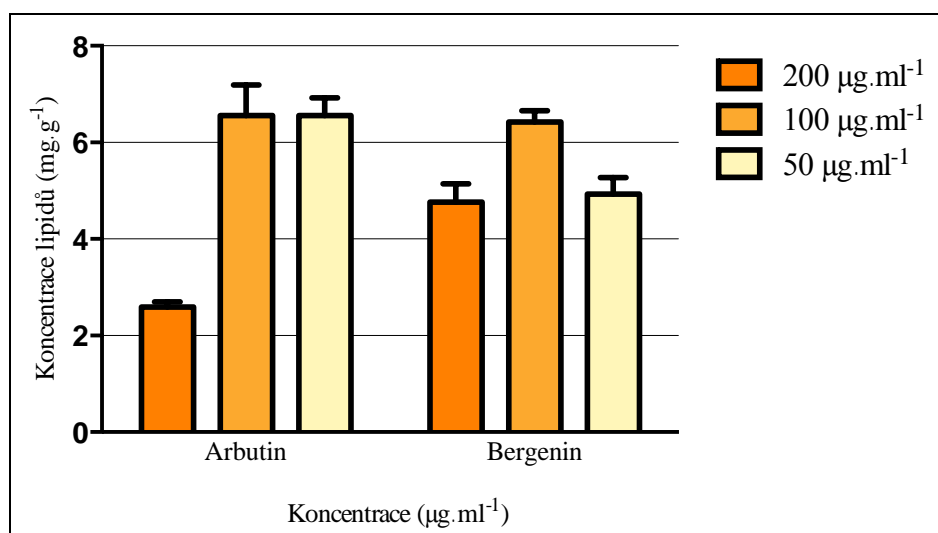
K důkazu přítomnosti lipidů v larvách *M. vogae* byly využity připravené kryořezy larev s modře zvýrazněným chromatinem (jádra buněk) a červeně zbarvenými lipidy, výsledný záznam z fluorescenčního mikroskopu je na **Obrázku č. 74 a 75** (viz Obrazová příloha).

Alternativní energetické zdroje jsou používány různými druhy tasemnic pro přežití v rozdílných podmínkách prostředí.<sup>156)</sup> Využití mastných kyselin a fosfolipidů jako energetického zdroje pro zvýšení produkce ATP, v případě nedostatku glukózy u druhu *Spirometra erinacei* popsal již Fukushima a kol.<sup>158)</sup> Důležitým regulátorem v metabolismu lipidů je neurotransmitter serotonin syntetizovaný z tryptofanu. Serotonin nejprve indukuje geny  $\beta$ -oxidace a poté lipidy jeho účinek redukuje. Serotonin tak přímo ovlivňuje akumulaci lipidů v periferních tkáních.<sup>157, 159)</sup> Byla také zjištěna jeho přímá spojitost s motilitou larev *M. vogae* – se vzrůstající motilitou larev se jeho koncentrace zvyšuje, tím navozuje geny  $\beta$ -oxidace.<sup>152)</sup>  $\beta$ -oxidace je důležitým zdrojem energie a vede k postupné oxidaci mastných kyselin až na acetyl koenzym A. Vyšší aktivita má za následek redukci přítomných lipidů. Koncentrace lipidů v larvách *M. vogae* tak přímo souvisí s jejich viabilitou a motilitou, tedy s jejich aktuálním energetickým metabolismem. Testované přírodní látky a listové extrakty bergénií způsobily snížení koncentrace lipidů, což vedlo k jejich vyšší motilitě a vzrostla také jejich metabolická aktivita. Po několikadenní inkubaci však koncentrace lipidů poklesla a s tím souvisel i pokles metabolické aktivity. Na pokles endogenních lipidů může mít vliv prokázaná antioxidační aktivita testovaných látek.

**Tabulka č. 13:** Stanovení koncentrace lipidů v larvách druhu *Mesocestoides vogae* po 5 hodinové, 3 denní a 7 denní inhibici.

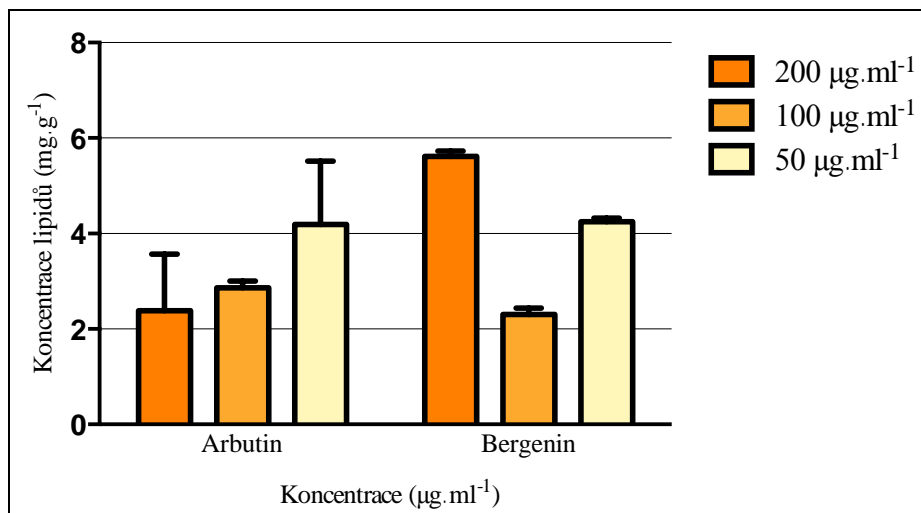
Vysvětlivky: *B. crassifolia* – vodný extrakt; *B. x ornata*, *B. ciliata* – etanolový extrakt.

Látka	Koncentrace	Koncentrace lipidů ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SD}$ )		
		inkubace 5 hodin	inkubace 3 dny	inkubace 7 dní
Arbutin	$200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$2,59 \pm 0,11$	$2,38 \pm 0,84$	$6,80 \pm 0,54$
	$100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$6,56 \pm 0,63$	$2,86 \pm 0,1$	$4,25 \pm 0,27$
	$50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$6,56 \pm 0,36$	$4,19 \pm 0,94$	$6,05 \pm 0,44$
Bergenin	$200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$4,76 \pm 0,38$	$5,54 \pm 0,46$	$5,50 \pm 0,26$
	$100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$6,42 \pm 0,24$	$2,21 \pm 0,29$	$5,36 \pm 0,43$
	$50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$4,93 \pm 0,34$	$4,20 \pm 0,47$	$4,75 \pm 0,37$
<i>B. crassifolia</i>	$1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$4,93 \pm 0,36$	-	$3,85 \pm 0,45$
<i>B. x ornata</i>	$1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$5,24 \pm 0,38$	-	$6,88 \pm 0,44$
<i>B. ciliata</i>	$1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$5,54 \pm 0,21$	-	$5,62 \pm 0,33$

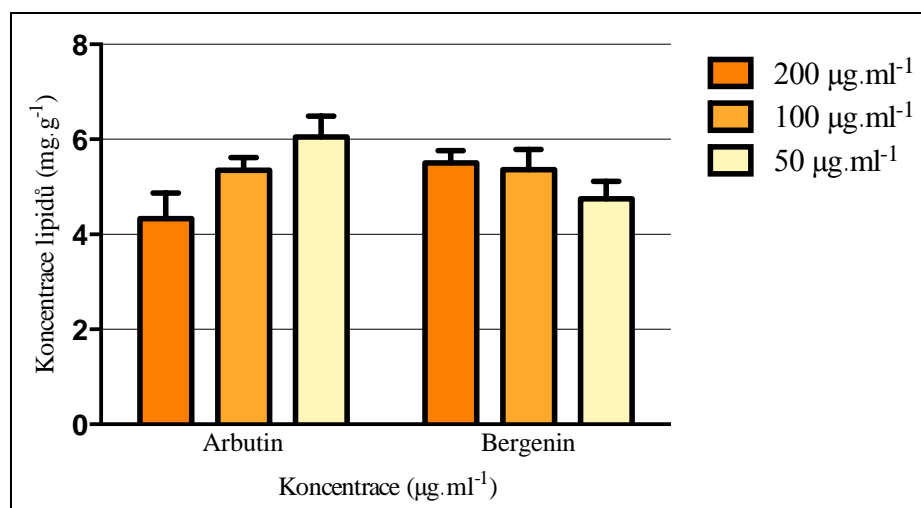


**Obrázek č. 45:** Vliv čistých látek arbutinu a bergeninů na koncentraci lipidů v buňkách larev po 5 hodinové inkubaci.

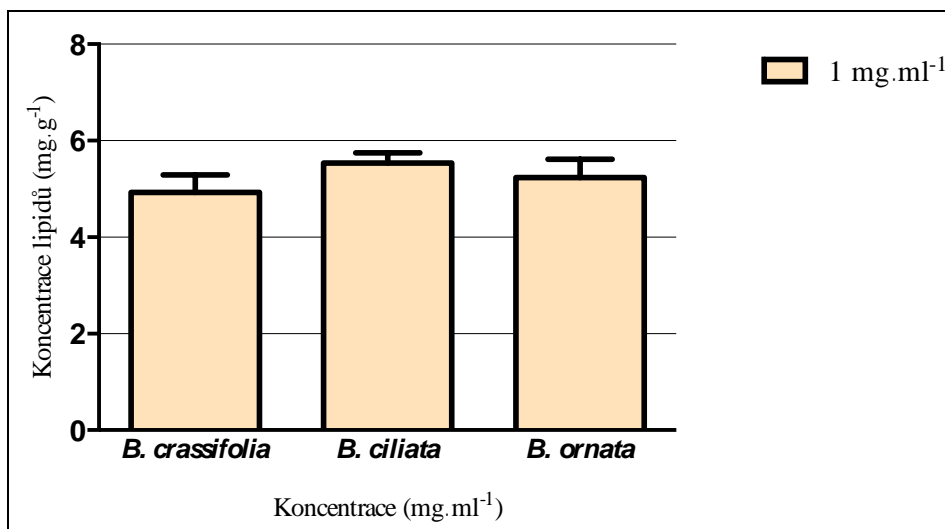




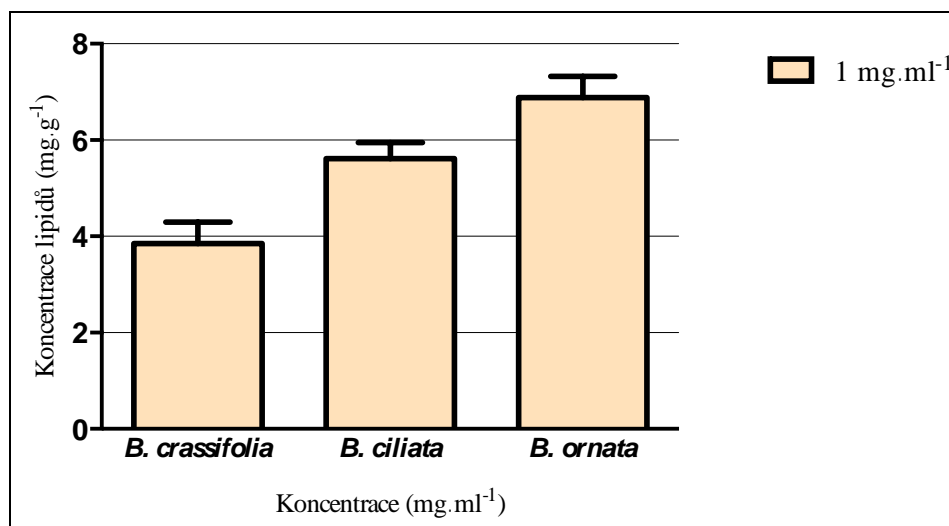
**Obrázek č. 46:** Vliv čistých látek arbutinu a bergeninu na koncentraci lipidů v buňkách larev po 3 denní inkubaci.



**Obrázek č. 47:** Vliv čistých látek arbutinu a bergeninu na koncentraci lipidů v buňkách larev po 7 denní inkubaci.



**Obrázek č. 48:** Vliv listových extraktů bergenií na koncentraci lipidů v buňkách larev po 5 hodinové inkubaci. (Vysvětlivky: *B. crassifolia* – vodný extrakt; *B. x ornata*, *B. ciliata* – etanolový extrakt.)

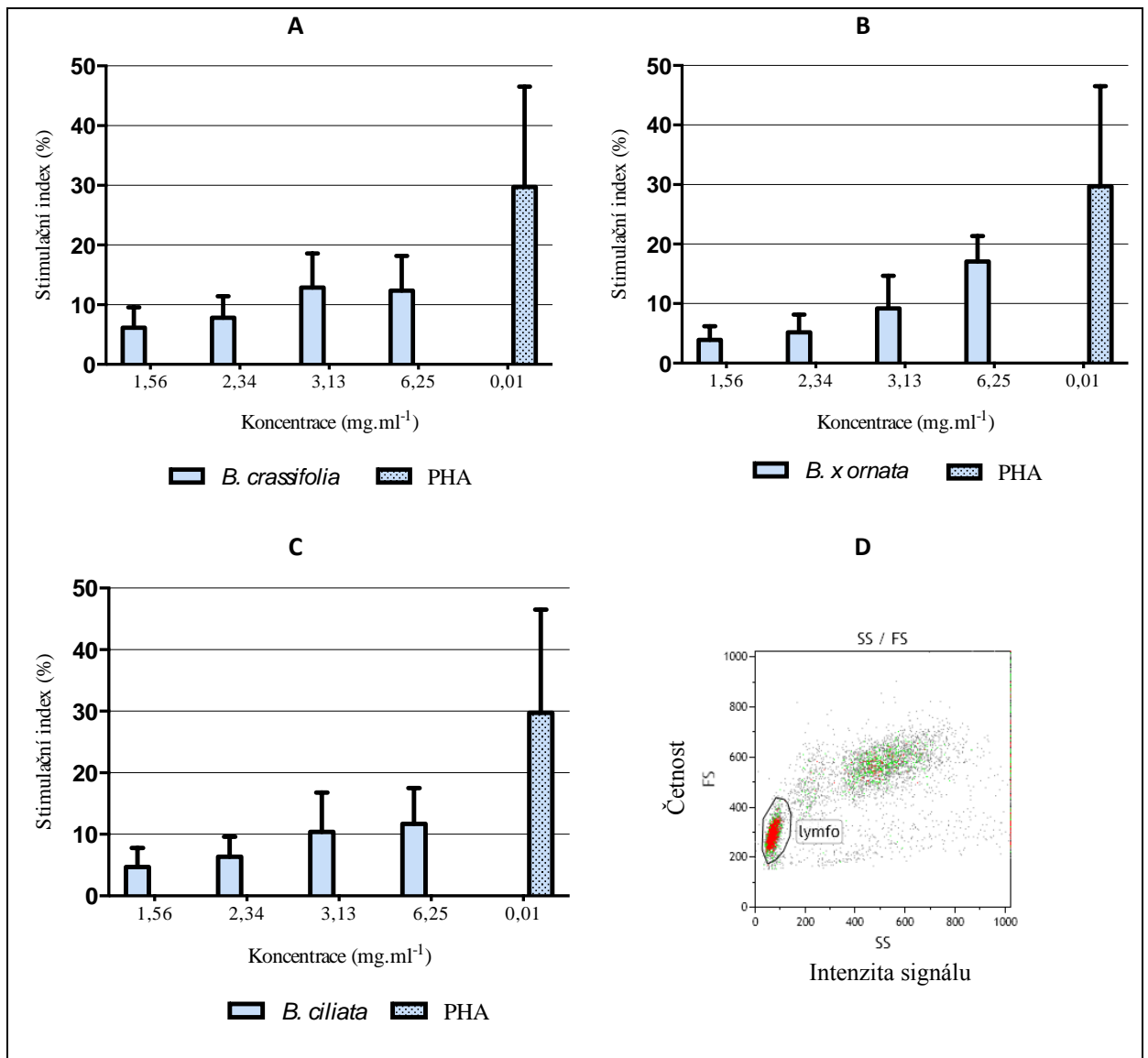


**Obrázek č. 49:** Vliv listových extraktů bergenií na koncentraci lipidů v buňkách larev po 7 denní inkubaci. (Vysvětlivky: *B. crassifolia* – vodný extrakt; *B. x ornata*, *B. ciliata* – etanolový extrakt.)

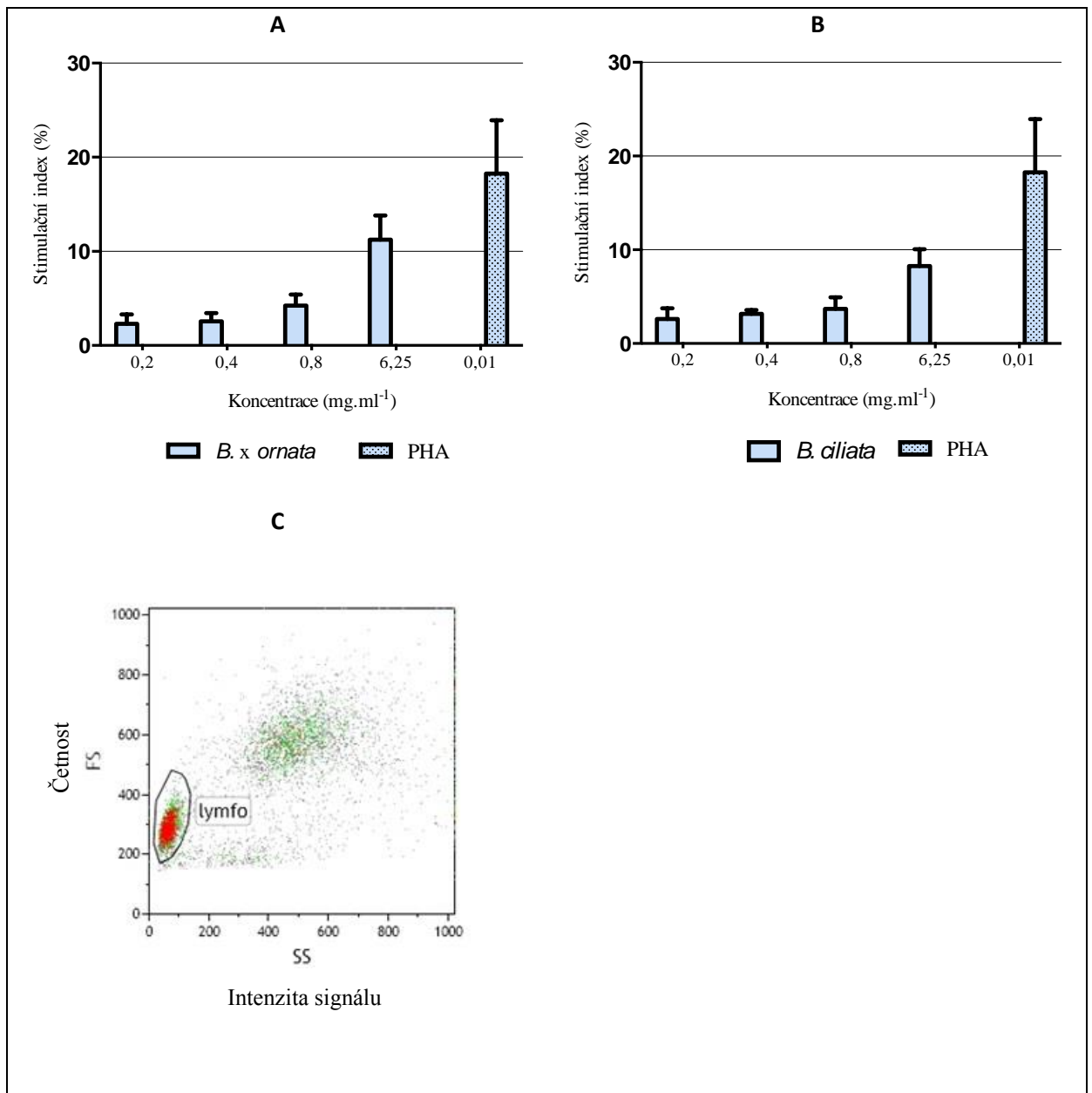
#### 5.2.4. Imunostimulační aktivita

Transmembránový glykoprotein CD69 je časný aktivační antigen, který zprostředkovává časné transmembránové signály. Maximální exprese dosahuje už po 18 až 24 hodinách po stimulaci. CD69 má velký význam v imunitní odpovědi.<sup>65)</sup> V této studii byl zkoumán vliv lyofilizovaných listových etanolových extraktů bergenií (BCR 2, BCL 2, BOR 1 P2012) na aktivaci lymfocytů pomocí exprese CD69 metodou průtokové cytometrie. Aktivaci buněk došlo ke vzrůstu množství na ně navázaných protilátek. Jejich aktivace pak byla sledována s pomocí vzrůstající fluorescenční intenzity. Extrakty bergenií podstatně stimulovaly expresi CD69 na lymfocytech v konečné koncentraci 3,13 a 6,25 mg.ml<sup>-1</sup>. Naopak vyšší koncentrace extraktů 25; 50 a 12,5 mg.ml<sup>-1</sup> byly pro buňky toxické a nestimulovaly tak expresi CD69. Nízké koncentrace (0,2 – 0,8 mg.ml<sup>-1</sup>) byly naopak pro stimulaci exprese CD69 příliš slabé (**Obr. č. 51**). Hodnoty stimulačních indexů extraktů *B. crassifolia* (**Obr. č. 50A**) a *B. x ornata* (**Obr. č. 50B**) se významně statisticky nelišily. Nejvyšší aktivace lymfocytů dosáhl extrakt *B. x ornata* při koncentraci 6,25 mg.ml<sup>-1</sup> (**Obr. 50B, 51A**). Histogramy na **Obrázku č. 52** zachycují statisticky významnou stimulaci exprese CD69 na lymfocytech pomocí listových extraktů bergenií v koncentracích 1,56 – 6,25 mg.ml<sup>-1</sup>, v porovnání se slepým vzorkem (X-vivo médium) a pozitivní kontrolou (PHA).

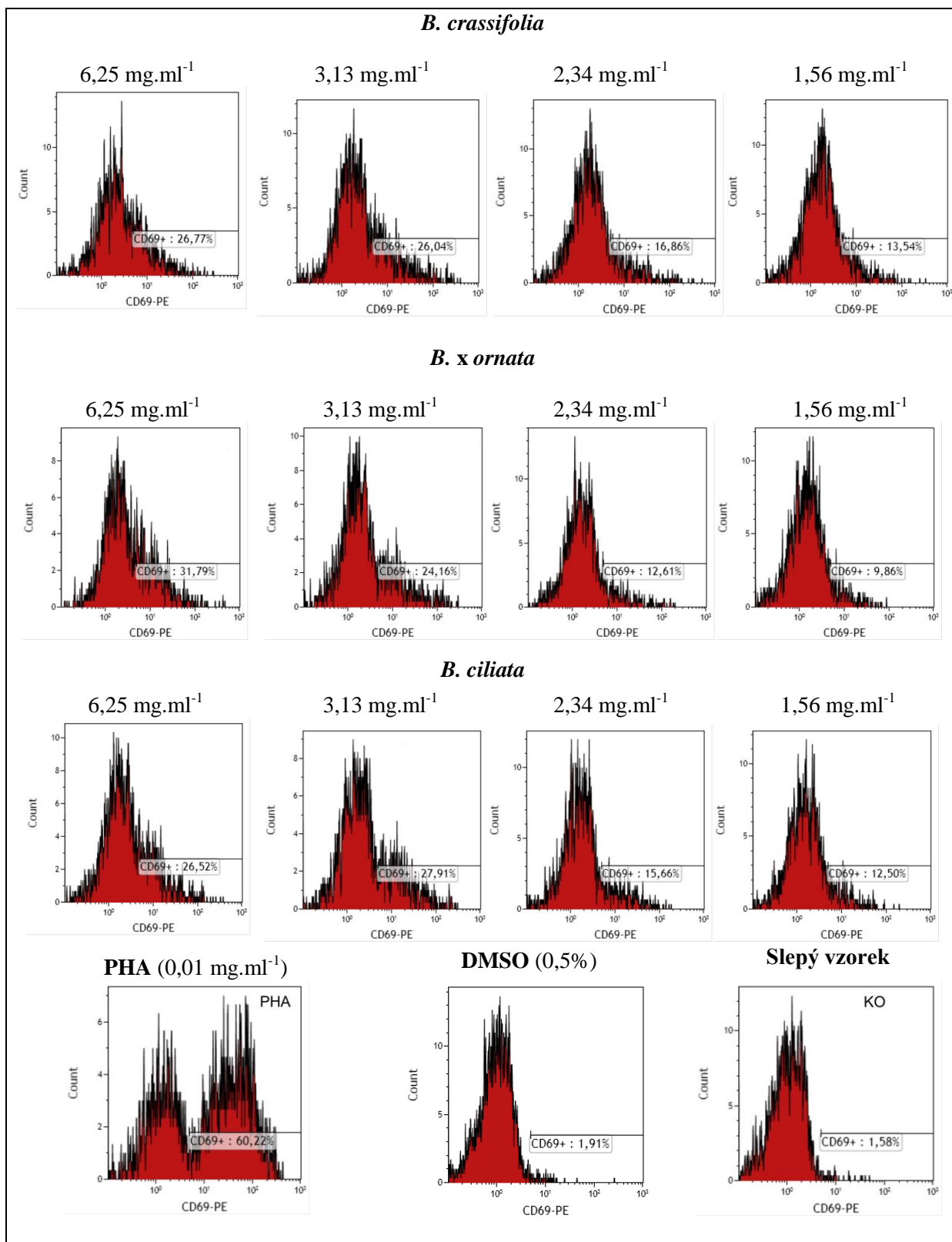
Jak vyplývá z literatury, neexistuje prozatím žádná studie, která by porovnávala vliv extraktů bergenií na aktivaci lymfocytů. Jak uvádí Popov a kol.<sup>57)</sup>, prokazatelný imunostimulační účinek a fagocytickou aktivitu vykazuje polysacharid izolovaný z listů *B. crassifolia* bergenan. V práci Nazir a kol.<sup>74)</sup> byl prokázán imunomodulační účinek bergeninu a norbergeninu na TH1 (zánětové TH buňky schopné přímé aktivity) a TH2 (aktivace B-lymfocytů) lymfocyty.



**Obrázek č. 50:** Účinek extraktů bergenií o konečné koncentraci 1,56 – 6,25 mg.ml<sup>-1</sup> *B. crassifolia* (A), *B. x ornata* (B) a *B. ciliata* (C) na aktivaci lymfocytů odpovídající expresi CD69. Z důvodu eliminace variability dárců jsou výsledné hodnoty vyjádřeny pomocí stimulačních indexů (%). Jako pozitivní kontrola byl použit phytohemaglutinin (PHA). Hodnoty jsou průměrem ze tří experimentů ± SD. Lymfocyty byly identifikovány na základě přímého rozptylu (FS) a bočního rozptylu (SS). Aktivované buňky (lymfocyty) byly identifikovány v cirkulárním gatu (D).



**Obrázek č. 51:** Účinek extraktů bergénií o konečné koncentraci 0,2 – 6,25 mg.ml<sup>-1</sup> *B. x ornata* (A) a *B. ciliata* (B) na aktivaci lymfocytů odpovídající expresi CD69. Z důvodu eliminace variability dárců jsou výsledné hodnoty vyjádřeny pomocí stimulačních indexů (%). Jako pozitivní kontrola byl použit phytohemagglutinin (PHA). Hodnoty jsou průměrem ze tří experimentů ± SD. Lymfocyty byly identifikovány na základě přímého rozptylu (FS) a bočního rozptylu (SS). Aktivované buňky (lymfocyty) byly identifikovány v cirkulárním gatui (C).

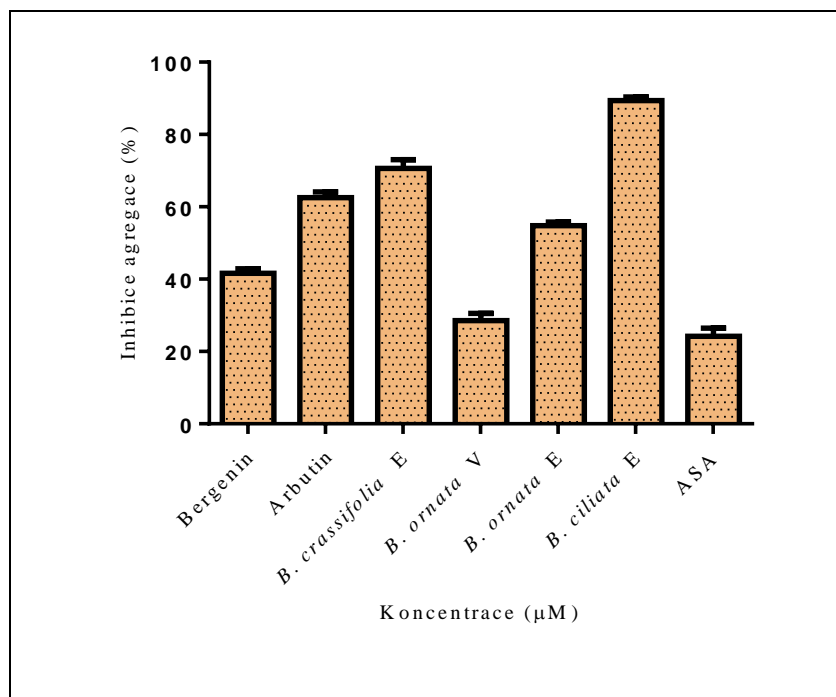


**Obrázek č. 52:** Závislost aktivace lymfocytů na koncentraci etanolových extraktů bergenií (1,56 – 6,25 mg.ml<sup>-1</sup>). Histogramy zachycují expresi CD69 (%) na povrchu lymfocytů v porovnání s pozitivní kontrolou (PHA), slepým vzorkem (X-vivo médium) a DMSO.

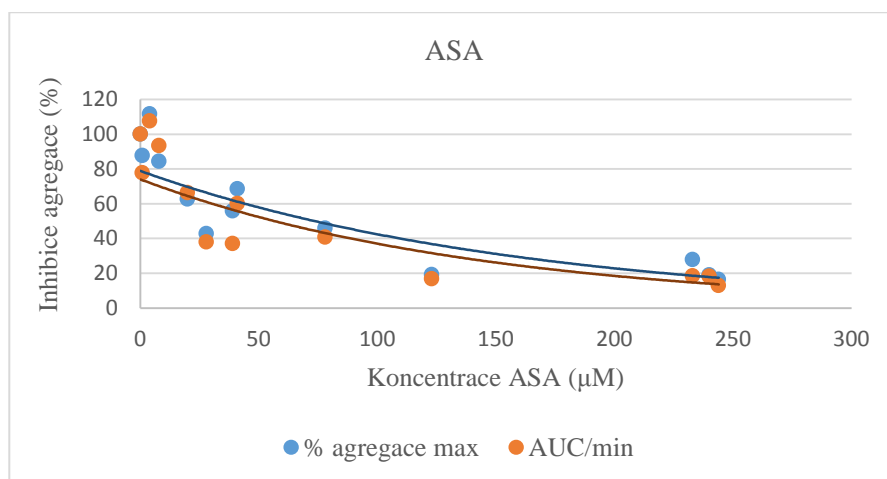
### 5.2.5. Antiagregační aktivita

Antiagregační aktivita byla sledována u chemicky čistých látek bergeninu a arbutinu a u etanolových (BCR 2 J2012, BOR 1 J2013, BCL 2 P2012) a vodných (BOR 1 P2012) lyofilizovaných extraktů bergenií (*B. crassifolia*, *B. x ornata* a *B. ciliata*). Pro porovnání míry inhibice agregace sloužila jako standard kyselina acetylsalicylová (ASA). Na **Obrázku č. 53** je zobrazeno porovnání míry maximální inhibice agregace u všech testovaných vzorků ve srovnání se standardem při stejné koncentraci. Arbutin a etanolové extrakty bergenií nezpůsobily signifikantní snížení agregace trombocytů. Bergenin byl schopen inhibovat agregaci trombocytů na 41,64 ( $\pm$  0,97) %, při finální koncentraci 200  $\mu$ M. Z extraktů byl nejúčinnější vodný lyofilizovaný extrakt *B. x ornata*, který signifikantně snížil agregaci trombocytů na 28,53 ( $\pm$  0,96) %. Byl analogicky účinný s kyselinou acetylsalicylovou (24,17  $\pm$  1,02 %). Závislost inhibice agregace na vzrůstající koncentraci ( $\mu$ M) kyseliny acetylsalicylové a bergeninu zobrazuje **Obrázek č. 54** a **55**. Závislost míry inhibice agregace krevních destiček na koncentraci vodného extraktu *B. x ornata* zobrazuje **Obrázek č. 56**.

Schopnost bergeninu inhibovat agregaci trombocytů indukovanou kyselinou arachidonovou uvádí již Alkadi a kol.<sup>160)</sup> Bergenin přitom inhiboval agregaci trombocytů na 27,2 ( $\pm$  0,56) až 75,3 ( $\pm$  0,7) %. Jak udává Lee a kol.<sup>161)</sup> derivát bergeninu 11-*O*-(4'-*O*-methylgalloyl)-bergenin je schopen inhibovat agregaci trombocytů ještě silněji než kyselina acetylsalicylová. Antiagregační schopnosti vykazují také ostatní látky vyskytující se v bergeniích jako je kyselina gallová nebo metyl gallát.<sup>162)</sup>

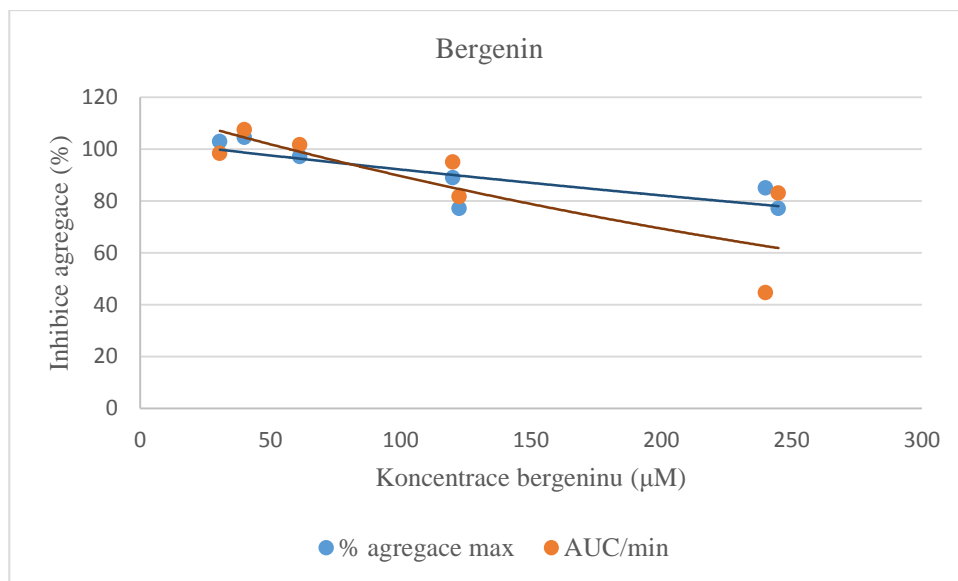


**Obrázek č. 53:** Porovnání maximální inhibice agregace (%) testovaných vzorků s kyselinou acetylsalicylovou (ASA). V porovnání jsou zahrnuty chemicky čisté látky bergenin a arbutin, z extraktů bergenií pak etanolové (E) a vodné (V) roztoky *B. crassifolia*, *B. x ornata* a *B. ciliata*. Inhibice agregace byla stanovena pomocí porovnání plochy pod křivkou AUC.

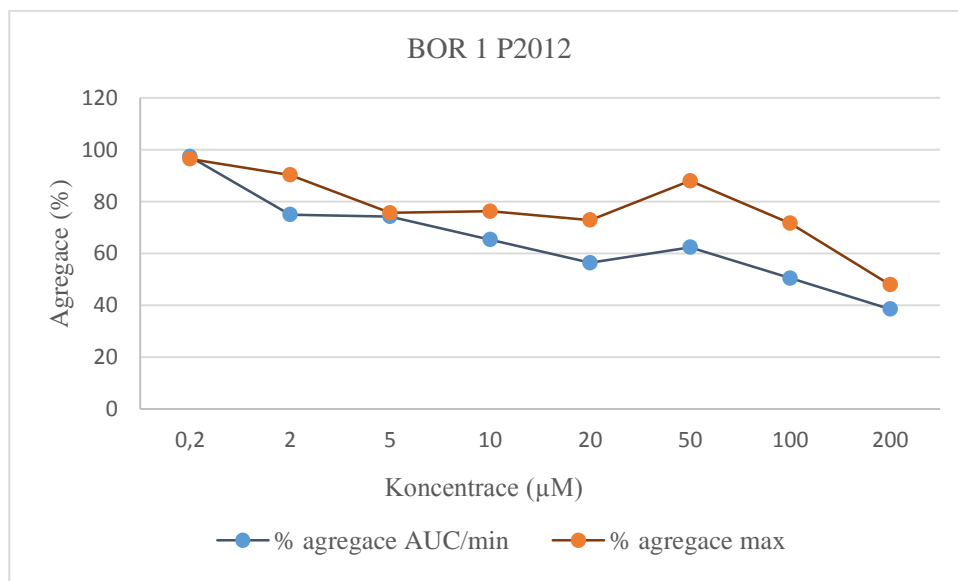


**Obrázek č. 54:** Závislost inhibice agregace trombocytů na koncentraci kyseliny acetylsalicylové (%).





**Obrázek č. 55:** Závislost inhibice agregace trombocytů na koncentraci bergeninů (%).



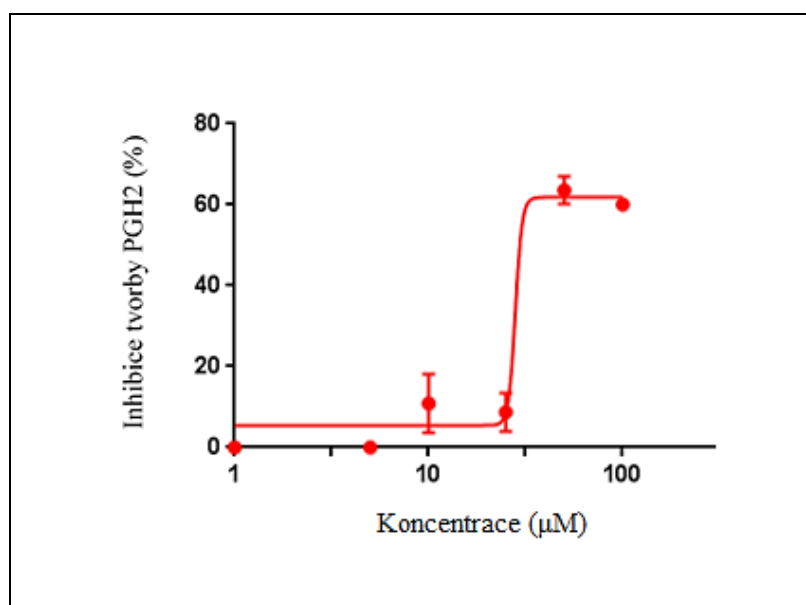
**Obrázek č. 56:** Závislost inhibice agregace na koncentraci vodného extraktu *B. x ornata* (%).

### 5.2.6. Stanovení inhibice COX-1

Pro *in vitro* stanovení schopnosti inhibice cyklooxygenázy COX-1 a prokázání možného protizánětlivého působení byl zvolen lyofilizovaný vodný extrakt *B. x ornata* (BOR 1 P2012), který prokázal nejvyšší schopnost inhibovat trombocyty (antiagregační aktivitu) v *in vitro* studii za použití AA jako induktoru agregace.

Extrakt *B. x. ornata* prokázal schopnost inhibovat tvorbu PGH<sub>2</sub>. Byla určena závislost inhibice tvorby PGH<sub>2</sub> na finální koncentraci extraktu (1 – 100 μM), vyjádřená jako procentuální inhibice PGH<sub>2</sub> (%), viz **Obrázek č. 57**. Vodný extrakt *B. x ornata* inhiboval tvorbu PGH<sub>2</sub> při finální maximální koncentraci 100 μM na 60,68 (± 1,05) %.

Enzymy COX-1 a COX-2 jsou důležité pro hledání nových protizánětlivých léčiv spojených s biosyntézou prostaglandinů. Dle práce Nunomura a kol.<sup>117)</sup> byl testován v *in vitro* studii inhibiční účinek bergeninu získaného z *Endopleura uchi* proti enzymu COX-1. Bergenin zde však nevykazoval žádný inhibiční účinek na tvorbu PGH<sub>2</sub>.



**Obrázek č. 57:** Závislost inhibice tvorby PGH<sub>2</sub> na finální koncentraci vodného extraktu *B. x ornata* (%).

### 5.3. Celkové shrnutí

Bergénie jsou jedny z nejvíce využívaných rostlin v tradiční čínské a indické medicíně. Využití nalézají již po staletí při léčbě různých onemocnění. V této práci byl zhodnocen obsah sekundárních metabolitů ve třech taxonech rostlin rodu *Bergenia* - *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. a *Bergenia x ornata* Stein. v závislosti na jejich biologických aktivitách. Hybrid rostliny *B. x ornata* byl vůbec poprvé hodnocen na obsah fenolických látek a biologickou aktivitu. Sledována byla nejen závislost sekundárních metabolitů na biologické aktivitě, ale také závislost mezi jejich obsahem a aktuálními klimatickými podmínkami.

V extraktech zelených a červených listů bergénií byl stanoven obsah arbutinu, celkových polyfenolů, bergeninu a anthokyanů v sušině. Nejvyšší obsah fenolického glykosidu arbutinu byl stanoven v listech druhu *B. crassifolia* ( $58,85 \pm 0,71 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a *B. x ornata* ( $51,04 \pm 1,21 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Výsledné hodnoty byly o něco nižší, než zmiňují literární zdroje. Árok a kol.<sup>35)</sup> a Pozharitskaya a kol.<sup>45)</sup> udávají obsah arbutinu v listech *B. crassifolia* v rozmezí 69,6 až 98,3  $\text{mg.g}^{-1}$ . Ze získaných výsledků vyplynulo, že obsah arbutinu v průběhu roku kolísá. Na jaře je jeho obsah v listech nejnižší, na podzim naopak vzrůstá. Podobné kolísání arbutinu v průběhu roku zaznamenal v listech *Arctostaphylos uva-ursi* již Parejo a kol.<sup>119)</sup>, (viz kapitola 5.1.1.).

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl stanoven u druhů *B. x ornata* ( $49,36 \pm 1,31 \text{ mg.g}^{-1}$ ) a *B. crassifolia* ( $48,74 \pm 1,14 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Výsledná množství polyfenolů u *B. crassifolia* odpovídají výsledkům Árok a kol.<sup>35)</sup>, (viz kapitola 5.1.2.). Statisticky nejvyšší obsah bergeninu byl stanoven v listech *B. x ornata* ( $6,23 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Podobné množství bergeninu stanovil v listech *B. crassifolia* i Boros a kol.<sup>132)</sup>, (viz kapitola 5.1.3.). Obsah polyfenolů a bergeninu byl podobně jako u arbutinu nejvyšší u vzorků listů sbíraných na

podzim. Jak bylo prokázáno korelačními analýzami, obsah sekundárních metabolitů je závislý na aktuálních klimatických podmínkách, především na vlhkosti a úhrnu srážek.

Statisticky významné a pozitivní korelace byly stanoveny mezi obsahem fenolických látek a výsledky z měření antiradikálové a antioxidační aktivity (pomocí metod DPPH, ABTS, NADH a FRAP). Vyššímu obsahu arbutinu, polyfenolů a bergeninu v podzimních měsících odpovídala zvýšená antioxidační aktivita.<sup>174, 175</sup> Nejprůkazněji to bylo patrné u druhu *B. crassifolia*. Z těchto výsledků je zřejmé, že fenolické sekundární metabolity přímo ovlivňují antioxidační a antiradikálovou aktivitu, (viz kapitola 5.2.1.5.). K vyšší aktivitě přispívají také anthokyany, obsažené v červených podzimních listech bergenií. Jejich obsah v bergeniích se pohybuje od 5,41 ( $\pm$  0,06) do 8,30 ( $\pm$  0,08) mg C3G.g<sup>-1</sup>. Jak ukázalo porovnání antiradikálové aktivity (stanovené metodami DPPH a NADH) extraktů bergenií a standardů, extrakty z červených listů vykazovaly mnohonásobně vyšší aktivitu v porovnání s extrakty ze zelených listů. U metody DPPH se přitom tyto extrakty blížily aktivitě kyseliny askorbové, (viz kapitola 5.2.1.1.).

Na základě prokázané přítomnosti arbutinu v listech bergenií, byla sledována schopnost jejich extraktů inhibovat enzym houbové tyrozinázy. Inhibiční aktivita tyrozinázy byla prokázána u etanolových extraktů, a to především u extraktu *B. x ornata* a *B. ciliata*. Korelační závislost mezi obsahem arbutinu a inhibicí aktivity tyrozinázy však nebyla prokázána. To nasvědčuje tomu, že pokles aktivity tyrozinázy mají na svědomí i další chemické látky. Jak uvádí literatura, podobnou inhibici jako arbutin vykazuje i jeho aglykon hydrochinon a flavonoid kvercetin.<sup>148, 149</sup>, (viz kapitola 5.2.2.).

Při testování antiparazitické aktivity byl sledován vliv arbutinu, bergeninu a vodných a etanolových extraktů bergenií na tvar a motilitu larev tasemnic druhu *Mesocestoides vogae*. Larvicidní účinek těchto látek však nebyl prokázán. Testované přírodní látky naopak úmrtnost

larev potlačily (v porovnání s kontrolou) a povzbudily jejich aktivitu. Pozitivní vliv na metabolismus a životaschopnost larev měl především arbutin (v koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a extrakt zelených listů *B. crassifolia*. Sledován byl také vztah mezi metabolickou aktivitou a obsahem celkových lipidů v larvách. Získané hodnoty metabolické aktivity korespondují s aktuální adaptací dýchacího řetězce *M. vogae* na měnící se podmínky prostředí. Nejvyšší metabolickou aktivitu přitom vykazoval bergenin (v koncentracích 100 a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a extrakt *B. x ornata*. Také koncentrace lipidů v larvách přímo souvisí s jejich viabilitou a motilitou. Testované přírodní látky zapříčinily snížení koncentrace lipidů a tím povzbudily jejich metabolickou aktivitu. Na pokles endogenních lipidů a zvýšení metabolické aktivity může mít vliv antioxidační aktivita testovaných látek, (viz kapitola 5.2.3.). Extrakt *B. crassifolia*, který ze všech testovaných extraktů, nejvíce povzbudil motilitu larev, byl také antioxidačně neaktivnější u všech metod stanovení antiradikálové a antioxidační aktivity. Prozatím neexistuje žádná studie, která by se zabývala antiparazitickou aktivitou extraktů bergenií proti druhu *M. vogae* a zároveň sledovala vztah mezi metabolickou aktivitou a obsahem celkových lipidů.

Při výzkumu imunostimulační aktivity byl zkoumán vliv etanolových extraktů bergenií na aktivaci lymfocytů. Extrakty bergenií podstatně stimulovaly expresi CD69 na lymfocytech v koncentracích 3,13 a  $6,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jak vyplývá z literatury vliv na imunostimulační aktivitu může mít především obsah bergeninů v extraktech bergenií.<sup>74)</sup>, (viz kapitola 5.2.4.). Prozatím však nebyla prokázána schopnost extraktů různých druhů bergenií aktivovat lymfocyty.

Antiagregační aktivita byla sledována u bergeninů, arbutinu a vodných a etanolových extraktů listů bergenií. Bergenin byl schopen inhibovat agregaci trombocytů na  $41,64 \pm 0,97 \%$ . Z extraktů byl nejúčinnější vodný lyofilizovaný extrakt *B. x ornata*, který signifikantně snížil agregaci trombocytů na  $28,53 \pm 0,96 \%$  a byl analogicky účinný se standardem kyselinou

acetylsalicylovou ( $24,17 \pm 1,02$  %). Jak uvádějí některé literární zdroje, za antiagregační účinek extraktu *B. x ornata* mohou být zodpovědné látky jako je bergenin, kyselina gallová či metyl gallát.<sup>161, 162)</sup> (viz kapitola 5.2.5.). Toto by odpovídalo i nejvyšší prokázané antiagregační aktivitě extraktu listů *B. x ornata*, sbíraných na podzim, kdy obsah těchto látek výrazně stoupá. Stejný extrakt byl účinný i při stanovení inhibice cyklooxygenázy (COX-1). Extrakt *B. x ornata* prokázal schopnost inhibovat tvorbu prostaglandinu PGH<sub>2</sub> na  $60,68 \pm 1,05$  %, (viz kapitola 5.2.6.).

## 6. ZÁVĚR

Pro studium obsahových látek a biologických aktivit byly vybrány tři taxony rostlin rodu *Bergenia* – *Bergenia crassifolia*, *B. ciliata* a hybrid získaný jejich křížením *B. x ornata*. Tyto rostliny jsou hojně využívány v terapii různých onemocnění a jsou důležitou součástí tradiční medicíny asijských zemí. Mají tak velký potenciál pro jejich terapeutické využití.

Dílčí cíle této práce byly následující:

- Byla provedena rozsáhlá rešerše literatury týkající se obsahových látek, biologických aktivit a tradičního využití rostlin rodu *Bergenia*. Tato zjištění byla důležitá pro výběr vhodných metod pro testování biologické aktivity.
- V extraktech zelených a červených listů bergenií byl stanoven obsah arbutinu, celkových polyfenolů, bergeninu a anthokyanů. Obsah jednotlivých sekundárních metabolitů byl celkově nejvyšší u druhů *B. crassifolia* a *B. x ornata*, nejnižší naopak u *B. ciliata*. Obsah fenolických látek přitom v průběhu roku kolísal. Nejvyšší obsahy arbutinu, polyfenolů a bergeninu byly zjištěny u listů sbíraných na podzim.

- Prokázána byla závislost obsahu fenolických látek na klimatických podmínkách (především na vlhkosti a úhrnu srážek).
- Ze stanovení antioxidační a antiradikálové aktivity vyplynulo, že sekundární fenolické metabolity přímo ovlivňují schopnost extraktů bergenií eliminovat volné radikály.
- Etanolové extrakty bergenií prokázaly schopnost inhibovat aktivitu houbové tyrozinázy. Korelační závislost mezi obsahem arbutinu a inhibicí aktivity tyrozinázy však nebyla prokázána. Na pokles aktivity tyrozinázy tak mají vliv i další chemické sloučeniny obsažené v listech bergenií.
- Při studiu antiparazitické aktivity extraktů bergenií nebyl prokázán jejich larvicidní účinek proti larvám druhu *Mesocestoides vogae*. Testované přírodní látky naopak úmrtnost larev potlačily a povzbudily jejich metabolickou aktivitu. Cílem tohoto výzkumu bylo lépe porozumět metabolickým pochodům vnitřních parazitů.
- Studium imunostimulační aktivity extraktů bergenií byla prokázána výrazná stimulace exprese CD69 na lymfocytech. Nejúčinněji přitom aktivoval lymfocyty extrakt *B. x ornata* v koncentracích 3,13 a 6,25 mg.ml<sup>-1</sup>.
- Antiagregační aktivita byla prokázána u bergeninu a extraktu *B. x ornata*, který signifikantně snížil agregaci trombocytů. Tento extrakt byl účinný i při stanovení schopnosti inhibovat tvorbu prostaglandinu PGH<sub>2</sub>.
- Nejvyšší potenciál pro léčebné využití mají ze všech tří taxonů testovaných bergenií druhy *B. crassifolia* a *B. x ornata*. Obě rostliny obsahují velmi podobná množství stanovovaných sekundárních metabolitů. Zatímco *B. crassifolia* prokázala nejvyšší antioxidační a antiradikálovou aktivitu, *B. x ornata* byla nejúčinnější při studiu imunostimulační a antiagregační aktivity a při stanovení inhibice COX-1.

## 7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

AA – kyselina arachidonová

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)

ASA – kyselina acetylsalicylová

BCL – *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb.

BCR – *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch

BOR – *Bergenia x ornata* Stein.

CD69 – transmembránový glykoprotein

COX (1, 2) – cyklooxygenáza

C3G – kyanidin-3-*O*-glukosid

DHI – 5,6-dihydroxyindol

DHICA – DHI-2-karboxylová kyselina

DMSO – dimetylsulfoxid

DOPA – *o*-difenol-3,4-fenylalanin

DPPH – 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl

FRAP – ferric reducing antioxidant power

GAE – ekvivalent kyseliny gallové

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazolium bromid

NADH –  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid

NBT – nitrotetrazoliová modř

PEG – polyetylen glykol

PEP – fosfoenolpyruvát

PBS – phosphate buffer saline

PGH<sub>2</sub> – prostaglandin

PHA – phytohemaglutinin

PMS – 5-metylfenazinium-metyl-sulfát



## 8. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA



**Obrázek č. 58:** *B. crassifolia*, *B. x ornata* a *B. ciliata* vypěstované na zahradě Zahradnické fakulty Mendelovy Univerzity v Lednici. Rostliny byly vysazeny v roce 2005. Každá rostlina je přesně označena popisným štítkem.



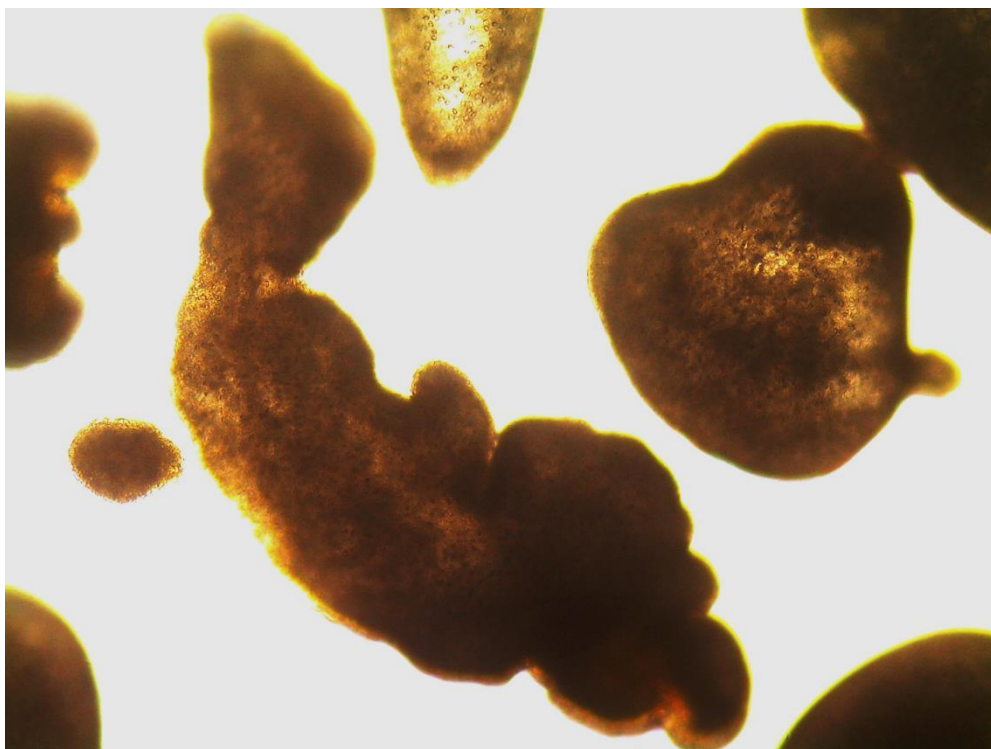
**Obrázek č. 59:** Podzimní do červena zbarvené listy *B. crassifolia*.



Obrázek č. 60: *B. crassifolia* na zahradě Zahradnické fakulty Mendelovy Univerzity v Lednici.



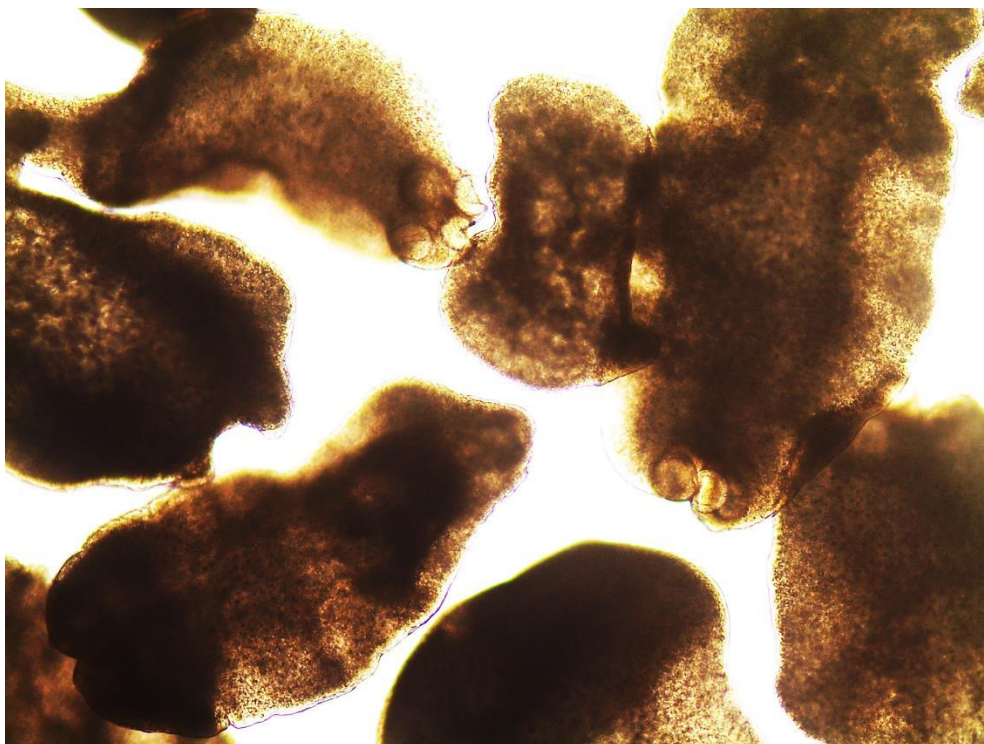
Obrázek č. 61: Detail květu *Bergenia crassifolia*.



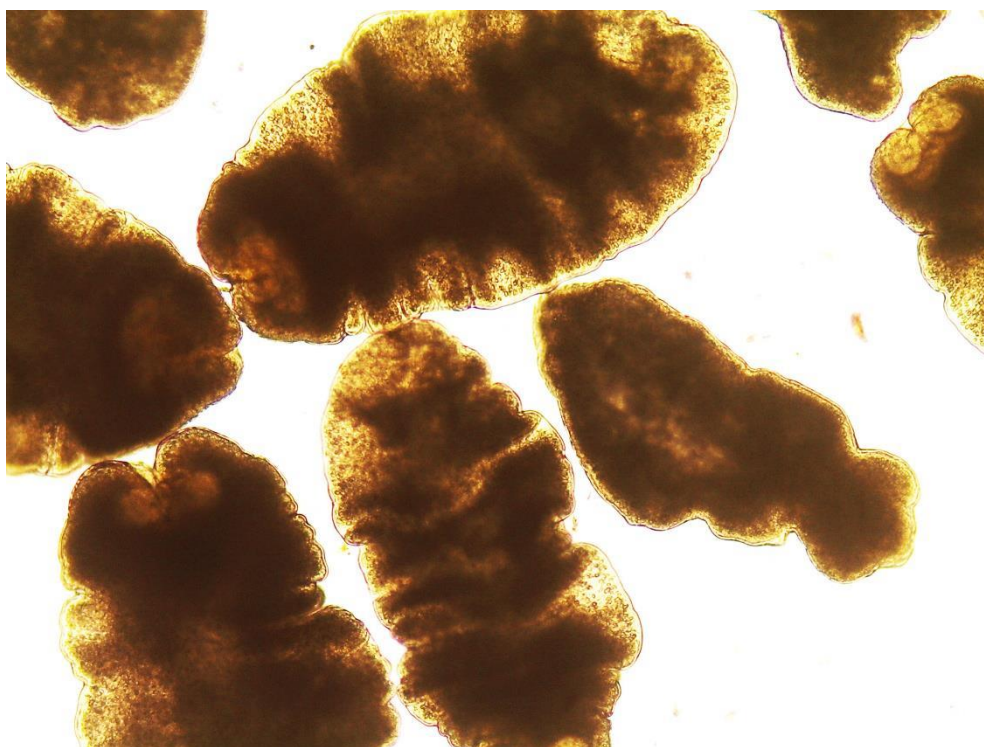
**Obrázek č. 62:** Přirozený tvar larev *M. vogae* v médiu bez přidaných testovaných látek na antiparazitickou aktivitu (kontrola), po 4 hodinové inkubaci při 37°C v anaerobních podmínkách (zvětšení 400x).



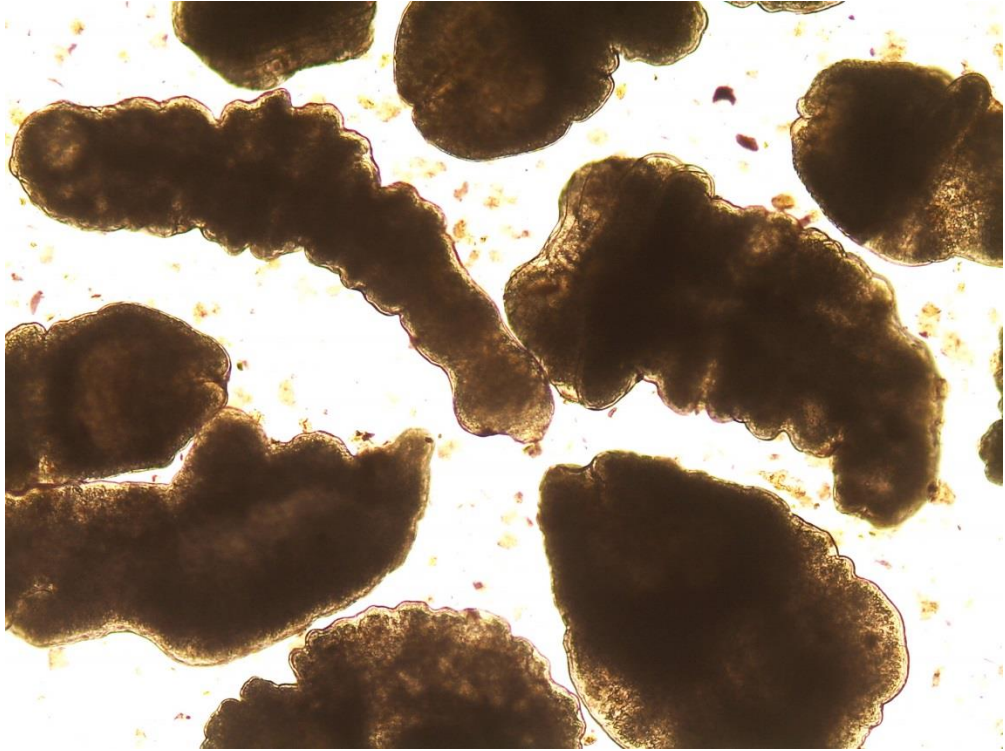
**Obrázek č. 63:** Larva *M. vogae* zachycená při dělení v médiu s přidaným bergeninem v koncentraci 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).



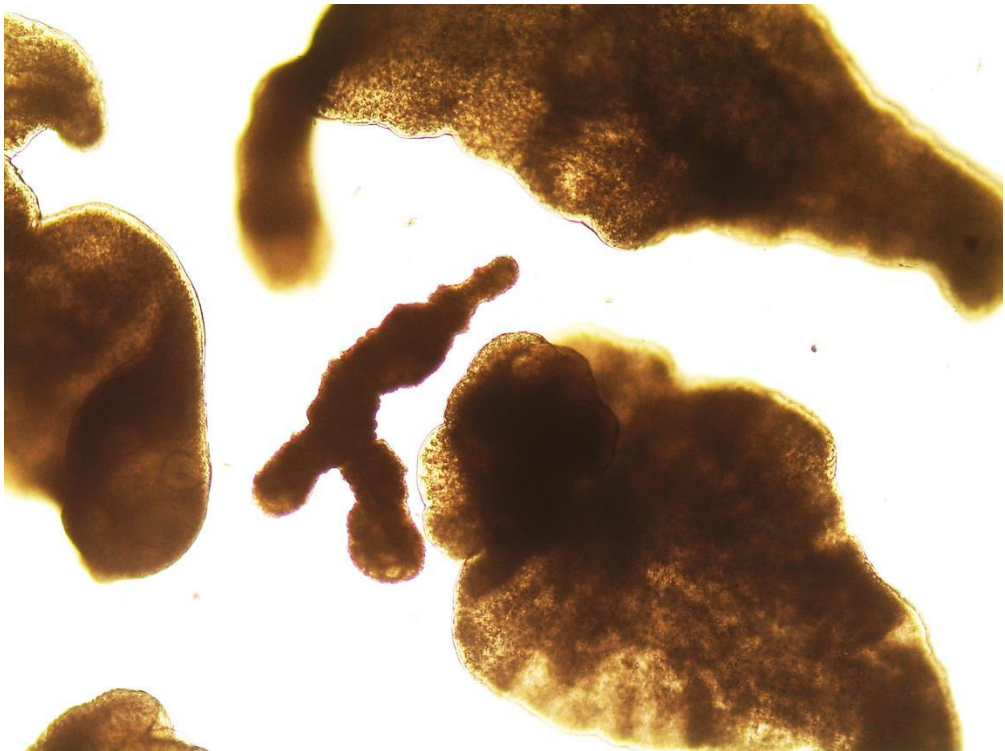
**Obrázek č. 64:** Vitální larvy *M. vogae* v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 200 µg.ml<sup>-1</sup>, po 4 hodinové inkubaci. Není zde patrná žádná změna přirozeného pohybu larev (zvětšení 400x).



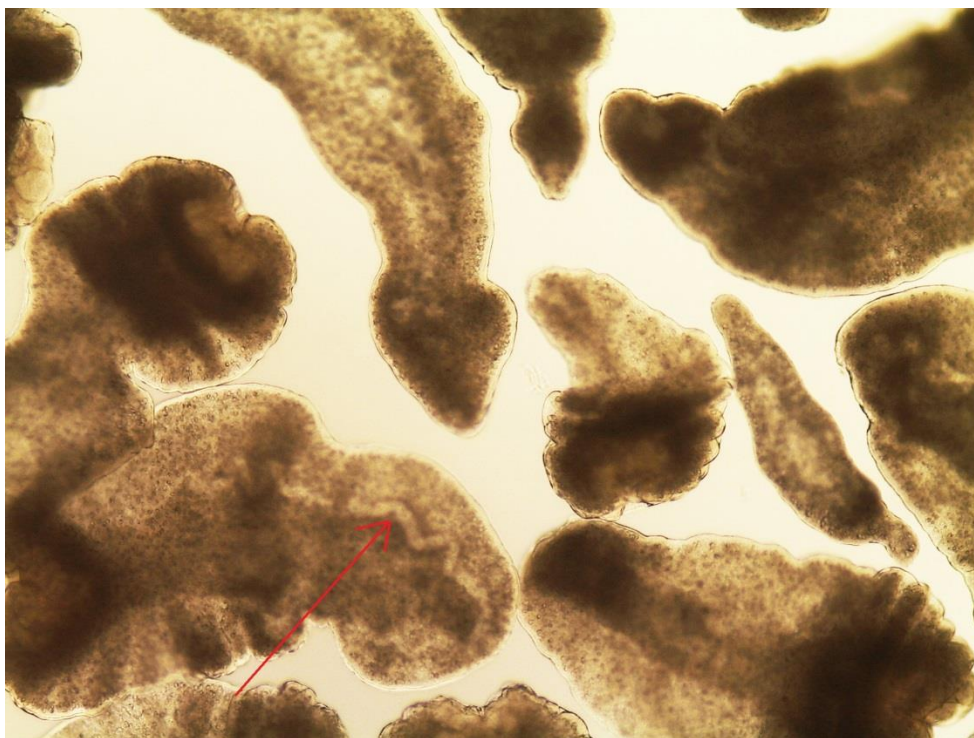
**Obrázek č. 65:** Netypický zvrásnělý povrch těla larev *M. vogae* v médiu s přidaným extraktem *B. crassifolia* po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).



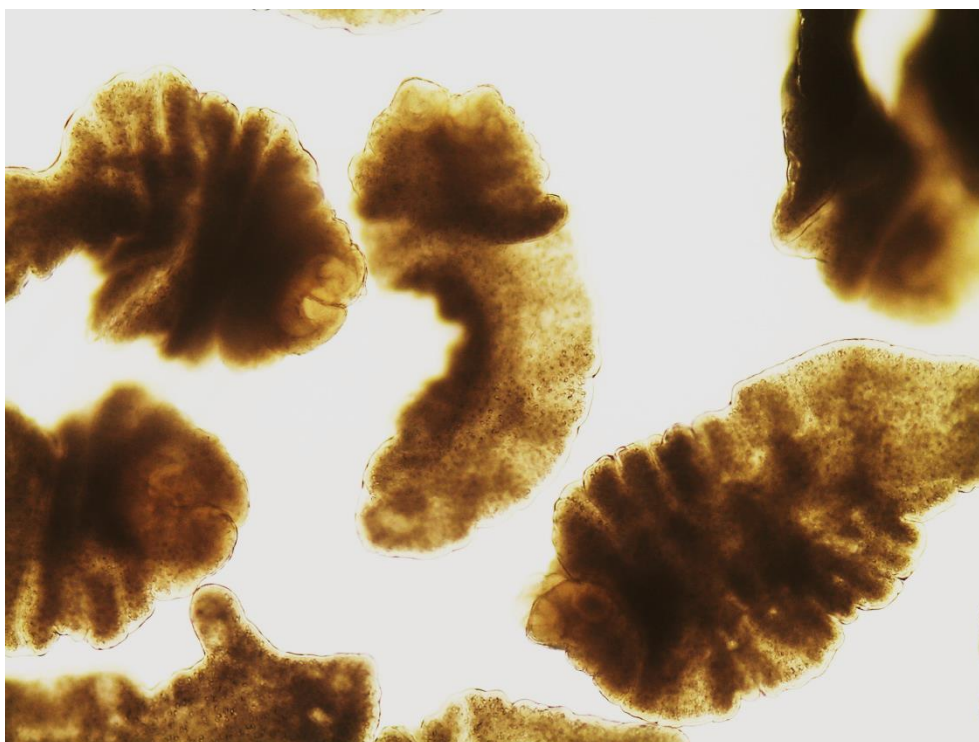
**Obrázek č. 66:** Nepřirozený tvar larev *M. vogae* v prostředí média s přidaným extraktem *B. ciliata*, po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).



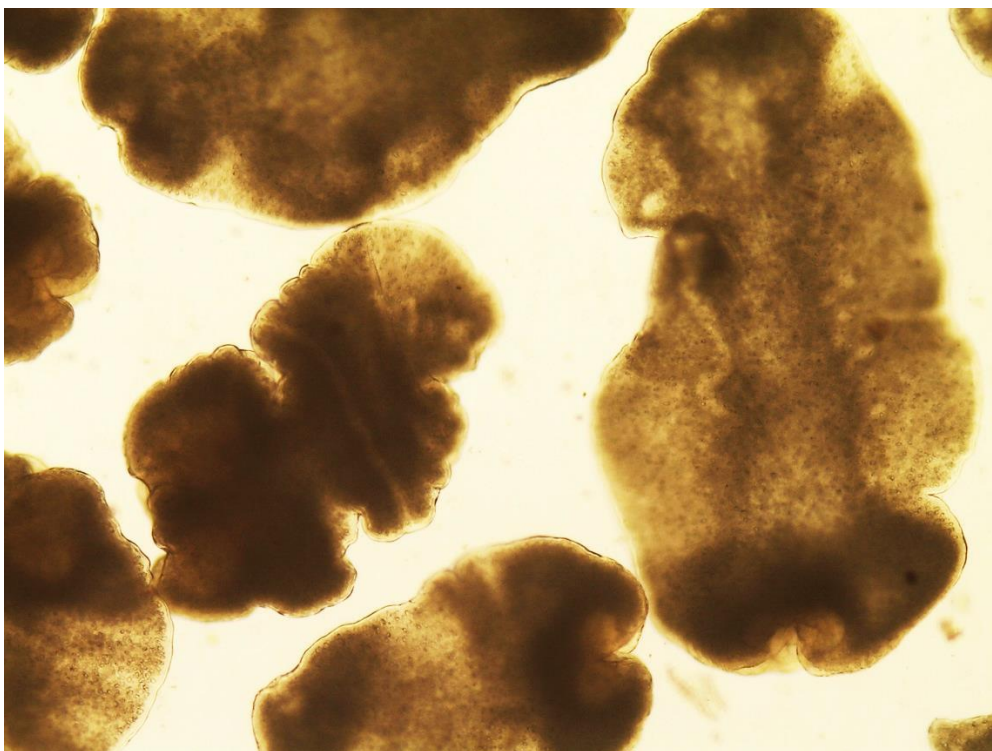
**Obrázek č. 67:** Mrtvý jedinec *M. vogae* v prostředí média s extraktem *B. crassifolia*, po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).



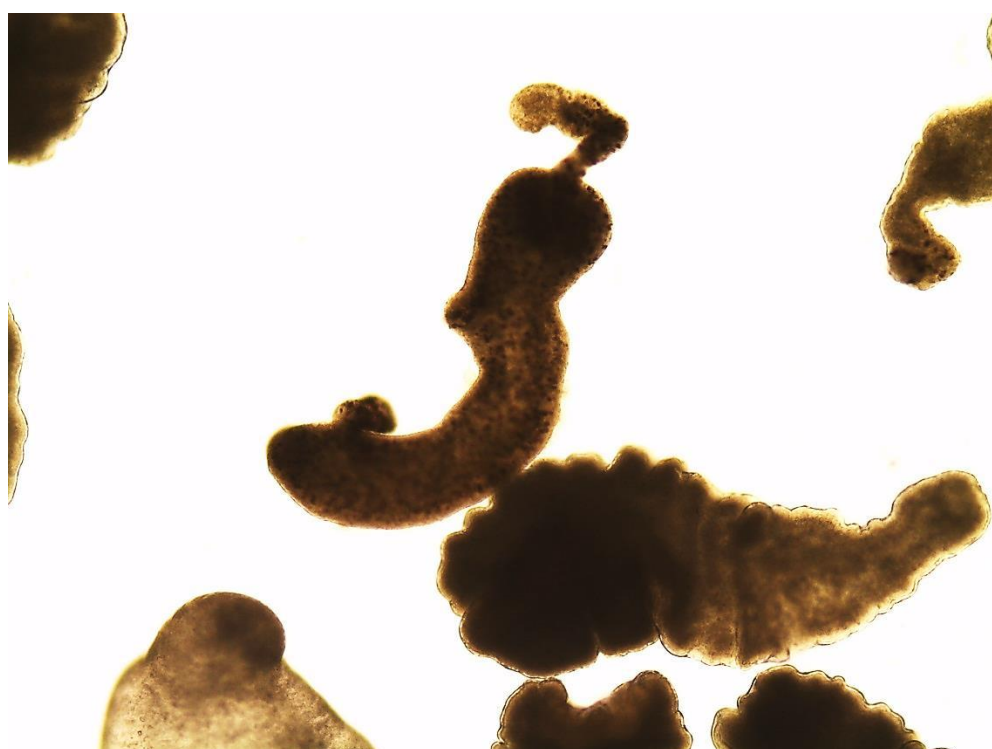
**Obrázek č. 68:** Larvy *M. vogae* v médiu s přidaným berberinem v koncentraci 200 µg.ml<sup>-1</sup>. U larev je viditelný nervový aparát. Larvy po 3 denní inkubaci stále vykazovaly zvýšenou motilitu (zvětšení 400x).



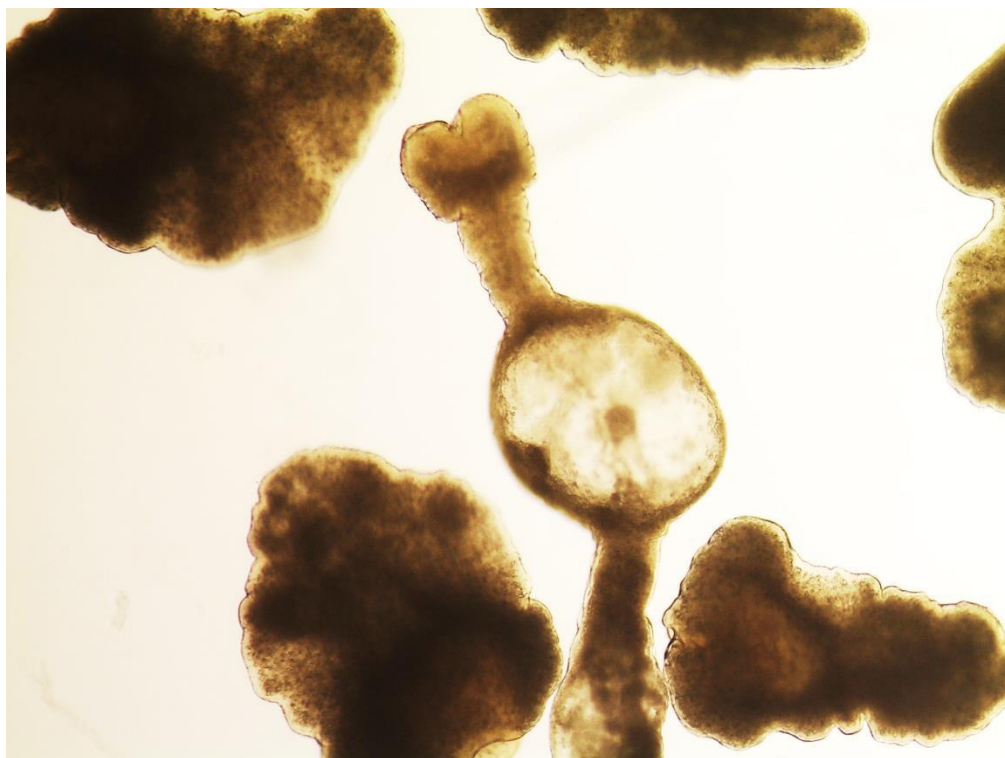
**Obrázek č. 69:** Larvy *M. vogae* v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 100 µg.ml<sup>-1</sup>, po 3 denní inkubaci. Larvy mají nepřirozeně zvrásnělý povrch (zvětšení 400x).



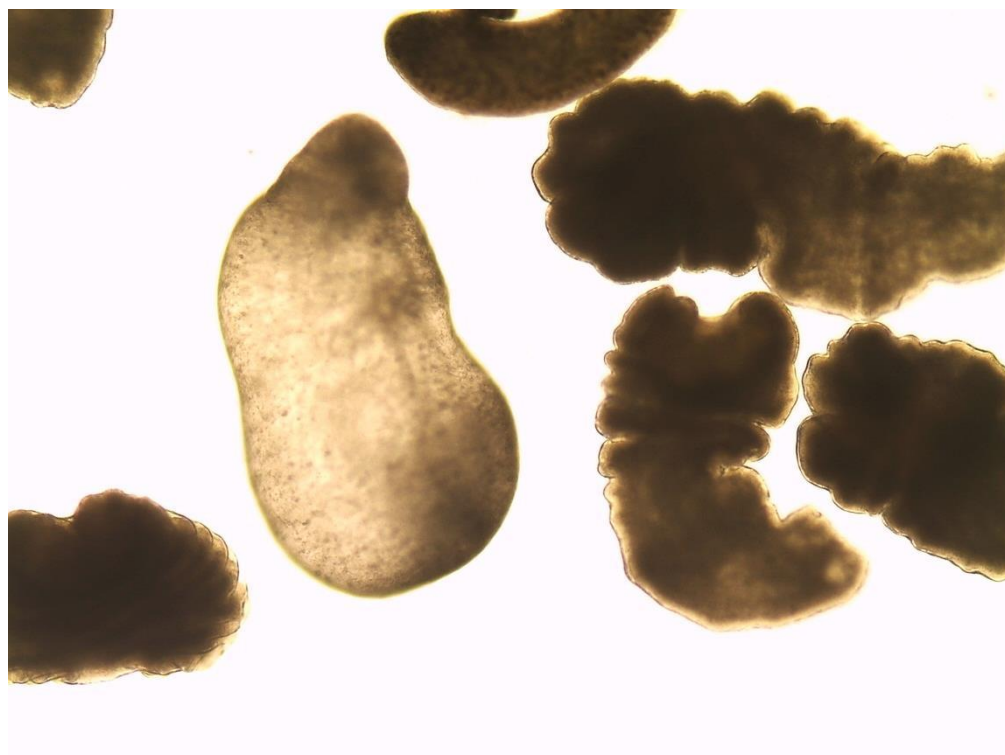
**Obrázek č. 70:** Přirozeně se pohybující larvy *M. vogae* v médiu s přidaným extraktem *B. crassifolia* po 3 denní inkubaci. Není zde patrný toxický vliv testovaných látek na metabolismus larev (zvětšení 400x).



**Obrázek č. 71:** Patologický tvar larvy *M. vogae* v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 200 µg.ml<sup>-1</sup> po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).

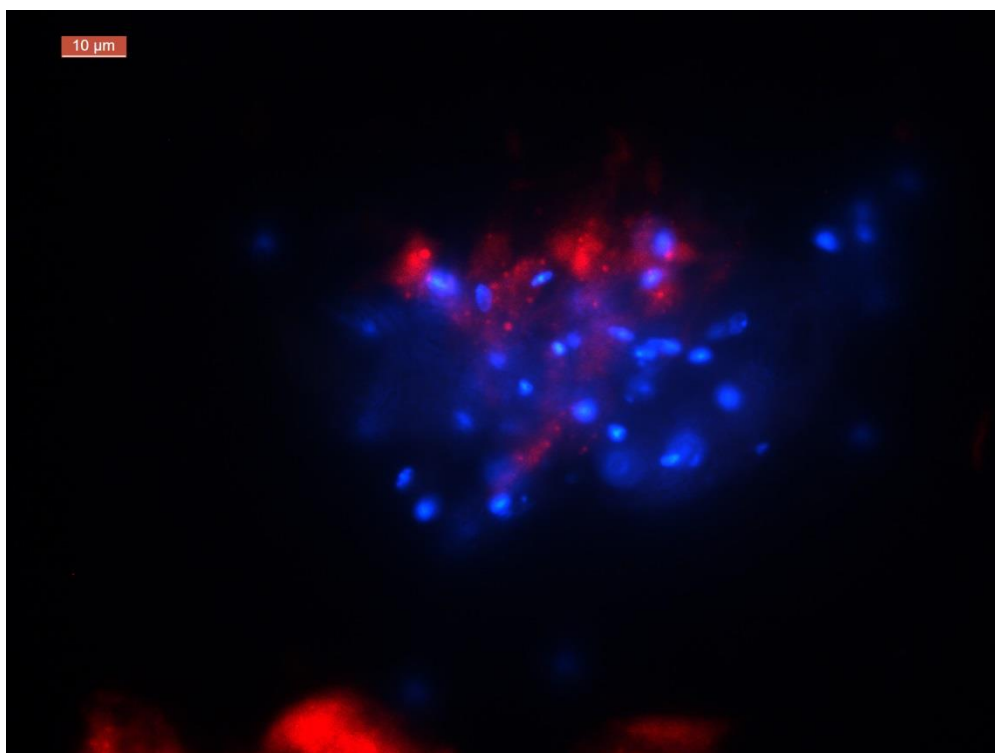


**Obrázek č. 72:** Patologický tvar larvy *M. vogae* v médiu s bergeninem v koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).

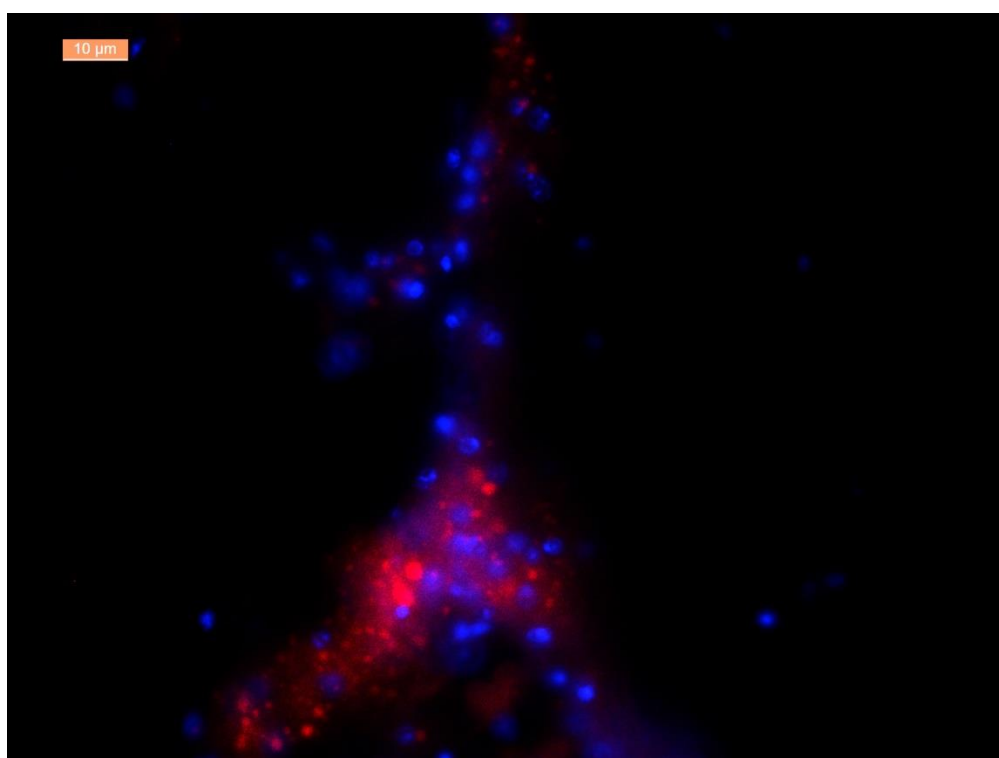


**Obrázek č. 73:** Patologický tvar larvy *M. vogae* v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).





**Obrázek č. 74:** Záznam z fluorescenčního mikroskopu. K důkazu přítomnosti lipidů v larvách *M. vogae* byly využity kryořezy larev s modře zvýrazněným chromatinem (jádra buněk) a červeně zabarvenými lipidy (zvětšení 1 000x).



**Obrázek č. 75:** Záznam z fluorescenčního mikroskopu. K obarvení preparátu sloužila barviva DAPI - pro zvýraznění chromatinu jader a Nile-RED - pro zvýraznění lipidů. Zvětšení 1 000x.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ZHANG, Y.; LIAO, C.; LI, J.; LIU, X. A review on resource status, bioactive ingredients, clinical applications and biological progress in *Bergenia*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, **5**(18), 4396-4399.
2. YONGSI, Z.; CHANGMIN, L.; XIAOHONG, L.; JUN, L.; SHOUMIN, F.; YUNXIANG, L.; DAOWEN H. Biological advances in *Bergenia* genus plant. *African Journal of Biotechnology*. 2011, **10**, 8166-8169.
3. The Ajurvedic Pharmacopoeia of India, Part I, Volume I. *Government of India ministry of health and family welfare department of Ayush*. India, 120-121.
4. SINGH, N.; GUPTA, A. K.; JUYAL, V. A review on *Bergenia ligulata* Wall. *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2010, **1**(4), 71-73.
5. BYAHATTI, V. V.; PAI, V.; D'SOUZA, M. Effect of phenolic compounds from *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. leaves on experimental kidney stones. *Ancient Science of Life*. 2010, **1**(30), 14-17.
6. BUTOLA, J. S.; BADOLA, H. K. Threatened Himalayan medicinal plants and their conservation in Himachal Pradesh. *Journal of Tropical Medicinal Plants*. 2008, **9**, 125-142.
7. CHOWDHARY, S.; KUMAR, H.; VERMA, D. L. Biodiversity and traditional knowledge of *Bergenia* spp. in Kumaun Himalaya. *New York Science Journal*. 2009, **2**, 105-108.
8. RUBY, K. M.; DWIVEDI, J.; CHAUHAN, R. Pashanbheda a golden herb of Himalaya: a review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2012, **2**, 97-105.
9. KHARE C. D. (Ed.). Indian medicinal plants, an illustrated dictionary. *Springer*. 2007, 90-91.
10. VERMA, P.; MATHUR, A. K.; JAIN, S. P.; MATHUR, A. *In vitro* conservation of twenty-three overexploited medicinal plants belonging to the Indian sub continent. *The Scientific World Journal*. 2012, **19**, 1-10.
11. SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V. G.; WAGNER H. M.; VERPOORTE, R.; HEINRICH, M. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia: their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014, **154**, 481-536.
12. SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROVA, M. N.; MAKAROV, V. G.; WAGNER, H. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch – Pharmacology and phytochemistry. *Phytomedicine*. 2014, **21**, 1534-1542.
13. KUNWAR, R. M.; MAHAT, L.; ACHARYA, R. P.; BUSSMANN, R. W. Medicinal plants, traditional medicine, markets and management in far-west Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2013, **9**, 24.
14. PANT, S.; SAMANT, S. S.; ARYA, S. C. Diversity and indigenous household remedies of the inhabitants surrounding Mornaula reserve forest in West Himalaya. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 2009, **8**, 606-610.
15. UNIYAL, S. K.; SINGH, K. N.; JAMWAL, P.; LAL, B. Traditional use of medicinal plants among the tribal communities of Chhota Bhangal, Western Himalaya. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006, **2**, 14.
16. ZHANG, Y. S.; LIAO, C. M.; LIU, X. H.; LI, J.; FANG, S. M.; LI, X. Y.; HE, D. W. Biological advances in *Bergenia* genus plant. *African Journal of Biotechnology*. 2011, **10**, 8166-8169.

17. CHERNETSOVA, E. S.; SHIKOV, A. N.; CRAWFORD, E. A.; GRASHORN S., LAAKSO, I.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V. G.; HILTUNEN, R.; GALAMBOSI, B.; MORLOCK, G. E. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in green and fermented leaves of *Bergenia crassifolia* L. by gas chromatography-mass spectrometry and ID-CUBE direct analysis in real time-highresolution mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2012, **20**(2), 199-205.
18. ADNAN, M.; HÖLSCHER, D. Medicinal plants in old-growth, degraded and re-growth forests of NW Pakistan. *Forest Ecology and Management*. 2011, **261**, 2105-2114.
19. UHER J. Bergénie – trvalky stinných zahrad. *Zahradnictví*. 2011, **5**, 38-41.
20. ADNAN, M.; TARIQ, A.; BEGUM, S.; ULLAH, A.; MUSSARAT, S. Medicinal plants after forest disturbance, restoration and cultivation in Pakistani Himalaya. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2014, **16**, 1006-1010.
21. RAI, L. K.; PRASAD, P.; SHARMA, E. Conservation threats to some important medicinal plants of the Sikkim Himalaya. *Biological Conservation*. 2000, **93**, 27-33.
22. KUBÁT, K.; HROUDA, L.; CHRTEK, J.; KAPLAN, Z.; KIRSCHNER, J.; ŠTĚPÁNEK J. (Eds.). *Klíč ke květeně České republiky*. Praha, Academia, 2002, s. 308. ISBN: 80-200-0836-5.
23. CHOWDHARY, S.; VERMA, K. R. Some peculiar structures in *Bergenia* species growing in Western Himalaya. *Natural Science*. 2010, **8**, 1-4.
24. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. *Medicinal plants in Mongolia. 1. Plants, Medicinal – Mongolia*. Ženeva, 2013, s. 18-20. ISBN: 987-92-9061-632-0.
25. CHAUHAN, R.; RUBY, K. M.; DWIVEDI, J. *Bergenia ciliata* mine of medicinal properties: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012, **2**(15), 20-23.
26. FAHAD, S.; BANO, A. Ethnobotanical and physiological studies of some endangered plant species collected from two different altitudes in Gilgit Baltistan. *Pakistan Journal of Botany*. 2012, **44**(2), 165-170.
27. ABBASI, A. M.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; ZAFAR, M.; JAHAN, S.; SULTANA, S. 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*. 2010, **128**, 322-335.
28. KHAN, N.; ABBASI, A. M.; DASTAGIR, G.; NAZIR, A.; SHAH, G. M.; SHAH, M. M.; SHAH, M. H. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. *Complementary and Alternative Medicine*. 2014, **14**(122), 1-10.
29. HENDRYCHOVÁ, H.; TŮMOVÁ, L. Rod *Bergenia* – obsahové látky a biologická aktivita. *Česká a slovenská Farmacie*. 2012, **61**(5), 203-209.
30. WU, Z. Y.; RAVEN, P. H. Flora of China (*Brassicaceae* through *Saxifragaceae*). *Science Press*, Beijing and *Missouri Botanical Garden Press*, St. Louis. 2001, **8**, 269-452.
31. GAIROLA, S.; RAWAL, R. S.; TODARIA, N. P. Forest vegetation patterns along an altitudinal gradient in sub-alpine zone of west Himalaya, India. *African Journal of Plant Science*. 2008, **2**(6), 042-048.
32. LIU, S. J.; YU, B.; HU, C. H. The variation of POD activities in *Bergenia tianquanensis* in tissue culture progress. *Application of Chemical Engineering*. 2011, **236-238**(1-3), 196-200.

33. RUBY, K.; CHAUHAN, R.; SHARMA, S.; DWIVEDI, J. Polypharmacological activities of *Bergenia* species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012, **13**(1), 100-110.
34. POP, C.; VLASE, L.; TAMAS, M. Natural resources containing arbutin, determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. 2009, **37**, 129-132.
35. ÁROK, R.; VÉGH, K.; ALBERTI, Á.; KÉRY Á. Phytochemical comparison and analysis of *Bergenia crassifolia* L. (Fritsch) and *Bergenia cordifolia* Sternb. *European Chemical Bulletin*. 2012, **1**(1-2), 31-34.
36. JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika – Semenné rostliny*. Praha, Karolinum. 2011, s. 68. ISBN: 9788024620152.
37. GRIMES P. E. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 2009, **28**(2), 77–85.
38. HALDER R. M.; RICHARDS, G. M. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy Letters*. 2004, **9**(6), 1-3.
39. PARVEZ, S.; KANG, M.; CHUNG, H. S.; CHO, C.; HONG, M. C.; SHIN, M. K.; BAE, H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*. 2006, **20**(11), 921–934.
40. DUŠKOVÁ, J.; DUŠEK, J.; JAHODÁŘ, L. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch *in vitro*. *Česká a slovenská farmacie*. 2001, **50**(2), 83-85.
41. RYCHLIŇSKA, I.; NOWAK, S. Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. 2012, **40**(2), 109–113.
42. SALMINEN, J. P.; SHIKOV, A. N.; KARONEN, M.; POZHARITSKAYA, O. N.; KIM, J.; MAKAROV, V. G.; HILTUNEN, R.; GALAMBOSI, B. Rapid profiling of phenolic compounds of green and fermented *Bergenia crassifolia* L. leaves by UPLC-DAD-QqQ-MS and HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Natural Product Research*. 2014, **28**(19), 1530-1533.
43. IVANOV, S. A.; NOMURA, K.; MALFANOV, I. L.; SKLYAR, I. V.; PTITSYN, L. R. Isolation of novel catechin from *Bergenia* rhizomes that has pronounced lipase-inhibiting and antioxidative properties. *Fitoterapia*. 2011, **82**, 212-218.
44. BRUCE, A. B.; DONEVAN, L. S.; BHAT, U. G. Flavonoids of some species of *Bergenia*, *Francoa*, *Parnassia* and *Lepuropetalon*. *Biochemical Systematic and Ecology*. 2002, **14**, 75-77.
45. POZHARITSKAYA, O. N.; IVANOVA, S. A.; SHIKOV, A. N.; MAKAROV, V. G.; GALAMBOSI, B. 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. *Journal of Separation Science*. 2007, **30**, 2447-2451.
46. GAO, X.; GUO, M.; ZHANG, Z.; WANG, T.; CAO, Y.; ZHANG, N. Bergenin plays an anti-inflammatory role *via* the modulation of MAPK and NF-κB signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis. *Inflammation*. 2015, **38**(3), 1142-1150.
47. PU, H. L.; HUANG, X.; ZHAO, J. H.; HONG A. Bergenin is the antiarrhythmic principle of *Fluggea virosa*. *Planta Medica*. 2002, **68**, 372-374.
48. YU, W.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, D.; LAN, J.; GU, J.; FAWCETT, J. P. Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography and Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009, **877**, 199-203.

49. QIN, X.; ZHOU, D.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. The absorption kinetics of bergenin in intestines of rat. *West China Journal of Pharmaceutical Science*. 2007, **22**, 186-188.
50. WANG, J.; WANG, B.; WEI, CH.; YUAN, G.; ZHANG, R.; LIU, H.; ZHANG, X.; GUO, R. Determination of bergenin in human plasma after oral administration by HPLC-MS/MS method and its pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 2009, **23**, 199-203.
51. KAKUB, G.; GULFRAZ, M. Cytoprotective effects of *Bergenia ciliata* extract on gastric ulcer in rats. *Phytotherapy Research*. 2007, **21**, 1217-1220.
52. JANAR, J.; FANF, L.; WONG, C. P.; KANEDA, T.; HIRASAWA, Y.; SHAHMANOVA, B. G.; ABDUAHITOVICH, A. Z.; MORITA, H. A new galloylbergenin from *Bergenia crassifolia* with anti-lipid droplet accumulation activity. *Heterocycles*. 2012, **86**(2), 1591-1595.
53. WEN, C.; ZHEN GUI, M.; SHENG CHAO, Y.; JIAN BIN, C.; LONG GEN, L.; PING PING, L.; XIAO BO, L. Content comparison of bergenin in Yunan genus *Rodgersia*. *Medicinal Plant*. 2011, **2**(2), 26-29.
54. SHAH, M. R.; ARFAN, M.; AMIN, H.; HUSSAIN, Z.; QADIR, M. I.; CHOUDHARY, M. I.; VANDERVEER, D.; MESAİK, M. A.; SOOMRO, S.; JABEEN, A.; KHAN, I. U. Synthesis of new bergenin derivatives as potent inhibitors of inflammatory mediators NO and TNF-alpha. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012, **22**(8), 2744-2747.
55. CHERNETSOVA, E. S.; CRAWFORD, E. A.; SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V. G.; MORLOCK G. E. ID-CUBE direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry and its capabilities in the identification of phenolic components from the green leaves of *Bergenia crassifolia* L. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012, **26**, 1329-1337.
56. SAIJYO, J.; SUZUKI, Y.; OKUNO, Y.; YAMAKI, H.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, M.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from *Bergenia ligulata*. *Journal of Oleo Science*. **57**(8), 431-435.
57. POPOV, S. V.; POPOVA, G. YU.; NIKOLAEVA, S. YU.; GOLOVCHENKO, V. V., OVODOVA, R. G. Immunostimulating Activity of Pectic Polysaccharide from *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. *Phytotherapy Research*. 2005, **19**, 1052-1056.
58. UMASHANKAR, D. CH.; AMRIK, S. CH.; DEEPAK, M.; RAKESH, M.; SUKHDEV, S. H. Paashaanolactone from *Bergenia ligulata*. *Phytochemistry*. 1997, **47**, 907-909.
59. ZHAO, J.; LIU, J.; ZHANG, X.; LIU, Z.; TSERING, T.; ZHONG, Y., NAN, P. Chemical composition of the volatiles of three wild *Bergenia* species from western China. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006, **21**, 431-434.
60. KASHIMA, Y.; YAMAKI, H.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, M. Insecticidal effect and chemical composition of the volatile oil from *Bergenia ligulata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**, 7114-7119.
61. GRISDALE, S. K.; TOWERS, H. N. Biosynthesis of arbutin from some phenylpropanoid compounds in *Pyrus communis*. *Nature*. 1960, **188**, 1130-1131.
62. HARBORNE, J. B., BELL, E. A.; CHARLEWOOD, B. V. (eds.). Secondary plant products. *Springer Verlag*, Berlin, 1980, 329.
63. LEE, J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 2005, **88**, 1269-1278.
64. SEKANINA, P. *Analýza genů z biosyntetické dráhy antokyanů pšenice (diplomová práce)*. Brno, Mendelova Univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2014.

65. CHEEL HORNA, J. *Biological activities and chemical content of Glycyrrhiza species (disertační práce)*. Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.
66. VENKATADRI, R.; GUHA, G.; RANGASAMY, A. K. Evaluation of antioxidant activities of *Bergenia ciliata* rhizome. *Records Natural Product*. 2010, **4**, 38-48.
67. DE ABREU, H. A.; LAGO, S. I. A.; SOUZA, G. P.; PILÓ-VELOSO, D.; DUARTE, H. A.; DE C. ALCÂNTARA, A. F. Antioxidant activity of (+)-bergenin – a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). *Organic Biomolecular Chemistry*. 2008, **6**, 2713-2718.
68. NIGHAT, N.; SURRINDER, K.; MUSHTAG, A. Q.; MUZAFFAR, H. N.; MOHAMMED, I. Z. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, **46**, 2415-2420.
69. RAJKUMAR, V.; GUHA, G.; KUMAR, A. R.; MATHEW, L. Evaluation of antioxidant activities of *Bergenia ciliata* rhizome. *Records of Natural Products*. 2010, **4**(1), 38-48.
70. SIDDIQ, F.; ITRAT, F.; MALIK, A.; AFZA, N.; IQBAL, L.; LATEEF, M.; HAMEED, S.; KHAN, S. W. Biologically active bergenin derivatives from *Bergenia stracheyi*. *Chemistry and Biodiversity*. 2012, **9**(1), 91-98.
71. MAZHAR, U. I.; IQBAL, A.; FARAH, M.; KHAN, U.; MUHAMMAD, A. G.; AFZAL, A.; SHAHAB, U. D. Evaluation of antibacterial activity of *Bergenia ciliata*. *Pakistan Journal of Pharmacological Sciences*. 2002, **15**, 21-27.
72. SHI, X.; LI, X.; HE, J.; HAN, Y.; LI, S.; ZOU, M. Study on the antibacterial activity of *Bergenia purpurascens* extract. *African Journal of Traditionally, Complementary and Alternative Medicine*. 2014, **11**(2), 464-468.
73. AGNIHOTRI, V.; SATI, P.; JANTWAL, A.; PANDEY, A. Antimicrobial and antioxidant phytochemicals in leaf extracts of *Bergenia ligulata*: a Himalayan herb of medicinal value. *Natural Product Research*. 2015, **29**(11):1074-1077.
74. NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; AHMAD, S. F.; BANI, S.; QAZI, G. N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis – a flow cytometry study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, **12**(2), 401-405.
75. PATEL, D. K.; PATEL, K.; KUMAR, R.; GADEWAR, M.; TAHILYANI, V. Pharmacological and analytical aspects of bergenin: a concise report. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012, **2**(2),163-167.
76. NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; NAJAR, M. H.; ZARGAR, M. I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, **46**(6), 2415-2420.
77. KRASNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M.; SYNOWIEC, A.; PRZYBYL, J. L.; BACZEK, K.; WEGLARZ, Z. The application of pollulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples. *Food and Bioproducts Processing*. 2015, **94**, 422-433.
78. RAJBHANDARI, M.; MENTEL, R.; JHA, P. K.; CHAUDHARY, R. P.; BHATTARAI, S.; GEWALI, M. B.; KARMACHARYA, N.; HIPPER, M.; LINDEQUIST, U. Antiviral activity of some plants used in Nepalese traditional medicine. *Evid-based Complementary Alternative Medicine*. 2009, **6**, 517-522.
79. SHARAD, S.; AJAY KUMAR, S. R. Botanical and phytochemical comparison of three *Bergenia* species. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2007, **67**, 65-72.

80. RAJBHANDARI, M.; WEGNER, U.; SCHÖPKE, T.; LINDEQUIST, U.; MENDEL, R. Inhibitory effect of *Bergenia ligulata* on influenza virus A. *Pharmazie*. 2003, **58**, 268-271.
81. WALTER, N. S.; BAGAI, U.; KALIA, S. Antimalarial activity of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. against *Plasmodium berghei*. *Parasitology Research*. 2013, **112**, 3123-3128.
82. SMYTH, J. D.; MCMANUS, D. P. *The physiology and biochemistry of cestodes*. New York, Cambridge University Press, 2007. ISBN: 0521355575.
83. DE OLIVEIRA, C. M.; NONATO, F. R.; DE LIMA, F. O.; COUTO, R. D.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive properties of bergenin. *Journal of Natural Product*. 2011, **74**(10), 2062-2068.
84. GOLOVCHENKO, V. V.; BUSHNEVA, O. A.; OVODOVA, R. G.; SHASHKOV, A. S.; CHIZHOV, A. O.; OVODOV, Y. S. Structural study of bergenan, a pectin from *Bergenia crassifolia*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2007, **33**(1), 47-56.
85. CHURIN, A. A.; MASNAYA, N. V.; SHERSTOBOEV, E. Y.; SUSLOV, N. I. Effect of *Bergenia crassifolia* extract on specific immune response parameters under extremal conditions. *The Academy of Medicinal Sciences*. 2005, **68**, 51-54.
86. SAJAD, T.; ZARGAR, A.; AHMAD, T.; BADER, B. N.; NAIME, M.; ALI, S. Antibacterial and anti-inflammatory potential *Bergenia ligulata*. *American Journal of Biomedical Sciences*. 2010, **2**, 313-321.
87. SPIRIDONOV, N. A.; KONOVALOV, D. A.; ARKHIPOV, V. V. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytotherapy Research*. 2005, **19**, 428-432.
88. BHANDARI, M. R.; NILUBON, J. A.; HUNG, G.; KAWABATA, J. Glucosidase and amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.). *Food Chemistry*. 2007, **106**, 247-252.
89. KUMAR, R.; PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; LALOO, D.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. *Fitoterapia*. 2012, **83**(2), 395-401.
90. HUSSAIN, Z.; WAHEED, A.; QURESHI, R. A.; BURDI, D. K.; VERSPOHL, E. J.; KHAN, N.; HASAN, M. The effect of medicinal plants of Islamabad and Murree region of Pakistan on insulin secretion from INS-1 cells. *Phytotherapy Research*. 2004, **18**, 73-77.
91. VERMA, P.; GAUTTAM, V.; KALIA, A. N. Comparative pharmacognosy of Pashanbhed. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2014, **5**(2), 104-108.
92. JOSHI, V. S.; PAREKH, B. B.; JOSHI, M. J.; VAIDYA, D. B. Inhibition of the growth of urinary calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals with aqueous extracts of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata*. *Urological Research*. 2005, **33**, 80-86.
93. SAHA, S.; VERMA, R. J. *Bergenia ciliata* extract prevents ethylene glycol induced histopathological changes in the kidney. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2011, **68**(5), 711-715.
94. TABATA, H.; KATSUBE, T.; TSUMA, T.; OHTA, Y.; IMAWAKA, N.; UTSUMI, T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food Chemistry*. 2008, 109(1), 64-71.
95. HACK-SEANG, K.; HWA-KYUNG, L.; MYEON-WOO, CH.; YOUNG, CH. K. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, **69**, 79-83.
96. LIM, H. K.; KIM, H. S.; CHUNG, M. W.; KIM, Y. C. Protective effects of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on D-galactosamin-intoxicated rat hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, **70**, 69-72.

97. LIM, Y. J.; LEE, E. H.; KANG, T. H.; HA, S. K.; OH, M. S.; KIM, S. M.; YOON, T. J.; KANG, CH.; PARK, J. H.; KIM, S. Y. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Archives of Pharmacal Research*. 2009, **32**(3), 367-373.
98. MOON, J. Y.; YIM, E. Y.; GWANPIL, S.; NAM HO, L.; CHANG-GU, H. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsian Journal of BioSciences*. 2010, **4**, 41-53.
99. SOKOLOV, S. Y. Phytotherapy and Phytopharmacology: The manual for doctors. *Medical News Agency, Moscow*. 2000.
100. TAHA, M. M. E.; SALGA, M. S.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A.; ABDELWAHAB, S. I.; HADI, A. H. A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. revisited role of arbutin. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, **141**(1), 273-281.
101. WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; JEFFREY, A. M.; DUAN, J. D. Inhibition by dietary hydroquinone of acetylaminofluorene induction of initiation of rat liver carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, **45**, 1620-1625.
102. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Český lékopis 2009, 1. díl*. Praha, Grada, 2009, s. 114. ISBN: 978-80-247-2994-7.
103. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Český lékopis 2009, 3. díl*. Praha, Grada, 2009, s. 3399. ISBN: 978-80-247-2994-7.
104. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Český lékopis 2009, 1. díl*. Praha, Grada, 2009, s. 315. ISBN: 978-80-247-2994-7.
105. REDDY, U. D. C.; CHAWLA, A. S.; DEEPAK, M.; SINGH, D.; HANDA, S. S. High pressure liquid chromatographic determination of bergenin and (+)-afzelechin from different parts of Paashaanbhed (*Bergenia ligulata* Yeo). *Phytochemical Analysis*. 1999, **10**, 44-47.
106. SINGH, D. P.; SRIVASTAVA, S. K.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S. High-performance liquid chromatographic determination of bergenin in different *Bergenia* species. *Acta Chromatographica*. 2007, **19**, 246-252.
107. GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley, New York. 2001, F1.2.1.-F1.2.13.
108. KRAKAR, D. *Optimizacija metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubbja navadne jelke Abies alba Mill. (diplomová práce)*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011.
109. PAULOVÁ, H.; BOCHOŘÁKOVÁ, H.; TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické Listy*. 2004, **98**, 174-179.
110. XIE, L. P.; CHEN, Q. X.; HUANG, H.; WANG, H. Z.; ZHANG, R. Q. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*. 2003, **68**(4), 487-491.
111. FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *Journal of Immunological Methods*. 1990, **131**, 165-172.
112. MISHRA, S. K.; SUH, W. I.; FAROOQ, W.; MOON, M.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S., ZANG, J-W. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Biosource Technology*. 2014, **155**, 330-333.
113. ŠTEJNAROVÁ, E. *Vliv obsahových látek vybraných taxonů vyšších rostlin na trombocytární agregaci (disertační práce)*. Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.



114. CHEEL, J.; ANTWERPEN, P. V.; TŮMOVÁ, L.; ONOFRE, G.; VOKURKOVÁ, D.; ZOUAOU-BOUDJELTIA K.; VANHAEVERBEEK, M.; NÈVE, J. Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Food Chemistry*. 2010, **122**, 508-517.
115. HONG, C. H.; HUR, S. K.; OH, O. J.; KIM, S. S.; NAM, K. A.; LEE, S. K. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002, **83**, 153-159.
116. NOREEN, Y.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; DANIELSON, H.; BOHLIN, L. Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 *in vitro* assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products*. 1998, **61**, 2-7.
117. NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009, **20**(6), 1060-1064.
118. JIANG, H.; GUO, F.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; LI, S.; YANG, F. Comparison of arbutin contents from *Bergenia purpurascens* in Yunnan. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2010, **35**(14), 1812.
119. PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2001, **12**(5), 336-339.
120. KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biologies*. 2008, **331**, 865-873.
121. LISIEWSKA, Z.; KMIĘCIK, W.; KORUS, A. Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, **19**, 134-140.
122. TOOR, R. K.; SAVAGE, G. P.; LISTER, C. E. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, **19**, 1-10.
123. BORGES, L. L.; ALVES, S. F.; SAMPAIO, B. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012, **23**(2), 230-238.
124. SAMPAIO, B. L.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; DA COSTA SANTOS, S.; DE PAULA, J. R. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2011, **21** (6), 1127-1137.
125. KOUKI, M.; MANETAS, Y. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Ceratonia siliqua*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2002, **30**, 631-639.
126. MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin level. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006, **16**, 338-344.
127. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: factores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 2007, **30**, 374-381.
128. SALMINEN, J. P.; OSSIPOV, V.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*. 2001, **57**, 15-22.

129. SANTOS, S.C.; COSTA, W. F.; BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation tannins in barks of barbatimao. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006, **16**, 552-556.
130. GUANGQIU, Q.; CHONGLING, Y.; HAOLIANG, L. Influence of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2007, **78**, 440-444.
131. LIN, C. C.; CHEN, L. M.; LUI, Z. H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science*. 2005, **168**, 855-861.
132. BOROS, B.; JAKABOVÁ, S.; MADARÁSZ, T.; MOLNÁR, R.; GALAMBOSI, B.; KILÁR, F.; FELINGER, A.; FARKAS, Á. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin, and gallic acid in leaves of different *Bergenia* species. *Chromatographia*. 2014, **77**, 1129-1135.
133. DHALWAL, K.; SHINDE, V. M.; BIRADAR, Y. S.; MAHADIK, K. R. 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**, 496-500.
134. DHARMENDER, R.; MADHAVI, T.; REENA, A.; SHEETAL, A. Simultaneous quantification of bergenin, (+)-catechin, gallicin and gallic acid; and quantification of  $\beta$ -sitosterol using HPTLC from *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. forma *ligulata* Yeo (Pasanbheda). *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2010, **1**, 104.
135. SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S.; KHAN, A. R. Evaluation of quantitative variation of secondary metabolites in *Bergenia ciliata* (Haw.) using high performance thin layer chromatography. *The Journal of Biomedical Research*. 2014, **28**(4), 328-331.
136. SRIVASTAVA, S.; RAWAT, A. K. S. Botanical and phytochemical comparison of three *Bergenia* species. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008, **67**, 65-72.
137. HASLAM, E. (+)-Catechin-3-gallate and a polymeric proanthocyanidin from *Bergenia* species. *Phytochemistry*. 1964, **3**, 263-265.
138. UDDIN, G.; RAUF, A.; ARFAN, M.; ALI, M.; QAISAR, M.; SAADIQ, M.; ATIF, M. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of *Bergenia ciliata*. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2012, **11**(8), 1140-1142.
139. BAGUL, M. S.; RAVISHANKARA, M. N.; PADH, H.; RAJANI, M. Phytochemical evaluation and free radical scavenging properties of rhizome of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. forma *ligulata* Yeo. *Journal of Natural Remedies*. 2003, **3**(1), 83-89.
140. BAJRACHARYA, G. B.; MAHARJAN R. Cytotoxicity, total phenolic content and antioxidant activity of *Bergenia purpurascens* rhizome. *Nepal Journal of Science and Technology*. 2013, **14**(1), 87-94.
141. MANDAL, P.; MISRA, T. K. *In-vitro* evaluation of free-radical scavenging potential of Pakhenbed leaves (*Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb.) *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 2009, **3**(1), 01-05.
142. AGGARWAL, D.; KAUSHAL, R.; KAUR, T.; BIJARNIA, R. K.; PURI, S.; SINGLA, S. K. The most potent antilithiatic agent ameliorating renal dysfunction and oxidative stress from *Bergenia ligulata* rhizome. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014, **158**, 85-93.
143. KONČIĆ, M. Z.; KREMER, D.; GRUZ, J.; STRNAD, M.; BIŠEVAC, G.; KOSALEC, I.; ŠAMEC, D.; PILJAC-ŽEGARAC, J.; KARLOVIĆ, K. Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, **48**(6), 1537-1542.

144. BRAHMI, F.; MECHRI, B.; DHIBI, M.; HAMMAMI, M. Variation in antioxidant activity and phenolic content in different organs of two Tunisian cultivars of *Olea europaea* L. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014, **36**, 169-178.
145. CHEEL, J.; TŮMOVÁ, L.; ARECHE, C.; VAN ANTWERPEN, P.; VOKŘÁL, I.; WSÓL, V.; NEUGEBAUEROVÁ, J. Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvested times. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013, **35**, 1337-1349.
146. ROSELLI, M.; LENTINI, M.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical, antioxidant and anti- $\alpha$ -glucosidase activity evaluations of *Bergenia cordifolia*. *Phytotherapy Research*. 2012, **26**, 908-914.
147. SHILOVA, I. V.; PISAREVA, S. I.; KRASNOV, E. A.; BRUZHEES, M. A.; PYAK, A. I. Antioxidant properties of *Bergenia crassifolia* extract. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2006, **40**(11), 620-623.
148. QIN, L.; WU, Y.; LIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, P. Dual effects of alpha-arbutin on monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase. *PLoS ONE*. 2014, **9**(10), 1-7.
149. LAI, J. S.; LIN, C. C.; CHIANG, T. M. Tyrosinase inhibitory activity and thermostability of the flavonoid complex from *Sophora japonica* L (Fabaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014, **13**(2), 243-247.
150. GUDERNOVÁ, I. *Role transportérů rodiny ABC v melanogenezi a multilékové rezistenci melanomů (diplomová práce)*. Brno, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2013.
151. TADA, M.; KOHNO, M.; NIWANO, Y. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. *BMC Biochemistry*. 2014, **15**(23), 11-17.
152. HRČKOVÁ, G.; VELEBNÝ, S.; HALTON, D. W.; MAULE, A. G. *Mesocestoides corti* (syn *M. vogae*): modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine. *Parasitology*. 2002, **124**, 409-421.
153. KITA, K.; HIRAWAKE, H.; MIYADERA, H.; AMINO, H.; TAKEO, S. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, **1553**, 123-139.
154. LANCASTER, C. R. D.; KRÖGER, A. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, **1459**, 422-431.
155. BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996, **4**, 14-19.
156. VINAUD, M. C.; SOUZA LINO JUNIOR, R.; BARRETO BEZERRA, J. C. *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Experimental Parasitology*. 2007, **116**, 335-339.
157. COORDT ELLE, I.; BRAUN OLSEN, L. C.; PULTZ, D.; RØDKÆR, S. V. Something worth dyeing for: Molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters*. 2010, **584**, 2183-2193.
158. FUKUSHIMA, T.; ISOBE, A.; JOBO, N.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y.; TORII, M. The fatty acids of each lipid fraction and their use in providing energy source of the plerocercoid of *Spirometra erinacei*. *International Journal for Parasitology*. 1995, **25**, 15-21.
159. MULLANEY, B. C.; ASHRAFI, K. *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, **1791**, 474-478.
160. ALKADI, K. A. A.; ADAM, A.; TAHA, M.; HASAN, M. H.; SHAH, S. A. A. Antiplatelet aggregation activity of 5-hydroxyflavone, 2-hydroxyflavone, paenol and bergenin isolated

from stem bark of *Garcinia malaccensis* in human whole blood. *Oriental Journal of Chemistry*. 2013, **29**(3), 871-875.

161. LEE, Y. Y.; JANG, D. S.; JIN, J. L.; YUN-CHOI, H. S. Anti-platelet aggregating and anti-oxidative activities of 11-O-(4'-O-Methylgalloyl)-bergenin, a new compound isolated from *Crassula* cv. "Himaturi". *Planta Medica*. 2005, **71**, 776-777.
162. LIM, M. Y.; PARK, Y. H.; KIM, M. K.; LEE, H. S.; SON, D. J. Antiplatelet activity of gallic acid and methyl gallate. *Journal of Food Science and Biotechnology*. 2004, **13**, 6.
163. ADNAN, M.; HÖLSCHER, D. Medicinal plant abundance in degraded and reforested sites in Northwest Pakistan. *Mountain Research and Development*. 2010, **30**(1), 25-32.
164. HOZOVÁ, M. Antioxidační aktivita kvercetinu a jeho derivátů (bakalářská práce). Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, 2012.
165. LUBSANDORZHIEVA, P. B.; ZHIGZHITOV, B. S.; DARGAEVA, T. D.; BAZAROVA, Z. G. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2000, **34**(5), 38-40.
166. LOURENÇO, A. L.; SAITO, M. S.; DORNELES, L. E. G.; VIANA, G. M.; SATHLER, P. C.; SEQUEIRA AGUIAR, L. C.; PÁDULA, M.; SOUZA DOMINGOS, T. F.; MANSSOUR FRAGA, A. G.; RANGEL RODRIGUES, C.; PEREIRA DE SOUSA, V.; CASTRO, H. C.; CABRAL, L. M. Synthesis and antiplatelet activity of antithrombotic thiourea compounds: biological and structure-activity relationship studies. *Molecules*, 2015, **20**, 7174-7200.
167. HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**, 1887-1892.
168. ARANCIBIA-AVILA, P.; NAMIESNIK, J.; TOLEDO, F.; WERNER, E.; MARTINEZ-AYALA, A. L.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GORINSTEIN, S. The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control*. 2012, **26**, 587-593.
169. SPECHT, D.; VOGAE, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *Journal of Parasitology*. 1965, **51**, 268-272.
170. ETGES, F. J. The proliferative tetrathyridium of *Mesocestoides vogae* sp. n. (Cestoda). *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 1991, **58**, 181-185.
171. HRČKOVÁ, G.; HALTON, D. W.; MAULE, A. G.; BRENNAN, G. P.; SHAW, C.; JOHNSTON, C. F. Neuropeptide-F immunoreactivity in the nervous system of *Mesocestoides corti* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology Research*. 1993, **79**(8), 690-695.
172. HRČKOVÁ, G.; HALTON, D. W.; MAULE, A. G.; SHAW, C.; JOHNSTON, C. F. 5 - Hydroxy-tryptamine (serotonin) - immunoreactivity in the nervous system of *Mesocestoides corti* tetrathyridium (Cestoda: Cyclophyllidea). *Journal of Parasitology*. 1994, **80**(1), 144-148.
173. TEREININA, N. B.; GUSTAFSSON, M. K.; REUTER, M. An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocestoides vogae* tetrathyridia. *International Journal of Parasitology*. 1999, **29**(5), 787-793.
174. HENDRYCHOVÁ, H.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L.; KOČEVAR-GLAVAČ N. Bergenin content and free radical scavenging activity of *Bergenia* extracts. *Natural Product Communications*. 2015, **10**(7), 1273-1275.
175. HENDRYCHOVÁ, H.; VILDOVÁ, A.; KOČEVAR-GLAVAČ, N.; TŮMOVÁ, L.; ABDYKERIMOVA-KANYBEKOVNA, E.; TŮMA J. Antioxidant activity and phenolic content of *Bergenia crassifolia*, *B. x ornata* and *B. ciliata*. *Natural Product Communications*. 2014, **9**(4), 445-596.

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. č. 1:</b> Strukturní vzorce obsahových látek z extraktů rostlin rodu <i>Bergenia</i> : a – arbutin, b – hydrochinon, c – +(-)katechin, d – (-)-3-O-galloylepikatechin, e – (-)-3-O-galloylkatechin .....	12
<b>Obr. č. 2:</b> Strukturní vzorce obsahových látek rostlin rodu <i>Bergenia</i> : a – tellimagrandin, b – pedunculagin, c – metylgallát, d – kyselina ellagová, e – kyselina gallová, f – 1,2,6-tri-O-galloylglukóza, g – 1-O-galloylglukóza. ....	13
<b>Obr. č. 3:</b> Strukturní vzorce obsahových látek rostlin rodu <i>Bergenia</i> : a – bergenin, b – norbergenin, c – kvercetin, d – kaempferol, e – (+)-afzelechin, f – kyselina chinová, g – kyselina chlorogenová.....	14
<b>Obr. č. 4:</b> Strukturní vzorce obsahových látek rostlin rodu <i>Bergenia</i> : a – pashaanolacton, b – leucocyanidin, c – $\beta$ -sitosterol-D-glukosid, d – 3-metyl-2-buten-1-ol, e – $\beta$ -eudesmol, f – karyofylen, g – fytol .....	15
<b>Obr. č. 5:</b> Biosyntéza arbutinu. ....	18
<b>Obr. č. 6:</b> Biosyntéza <i>p</i> -kumaroyl-CoA – tzv. šikimátová dráha.....	20
<b>Obr. č. 7:</b> Biosyntéza anthokyanů .....	21
<b>Obr. č. 8:</b> Kalibrační křivka bergeninů .....	40
<b>Obr. č. 9:</b> Záznam HPLC chromatogramu standardu bergeninů (1) a extraktu ze zelených listů <i>B. crassifolia</i> (2).....	40
<b>Obr. č. 10:</b> Spektrální záznam standardu kyanidinu-3-O- $\beta$ -glukosidu; černá křivka – barevná forma anthokyanů; červená křivka - bezbarvá forma anthokyanů; modrá křivka - rozdílová (diferenční křivka).....	41
<b>Obr. č. 11:</b> Zhášení DPPH volného radikálu fenolickou sloučeninou (antioxidantem) .....	45
<b>Obr. č. 12:</b> Redukce nitrotetrazoliové modři (NBT) superoxidovým radikálem generovaným z reakce NADH/PMS.....	47
<b>Obr. č. 13:</b> Kalibrační křivka kyseliny gallové.....	48
<b>Obr. č. 14:</b> Redukce MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na modře zabarvený formazan. Reakce je katalyzována mitochondriální sukcinát dehydrogenázou II. komplexu dýchacího řetězce.....	52
<b>Obr. č. 15:</b> Závislost obsahu arbutinu <i>B. ciliata</i> ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	60
<b>Obr. č. 16:</b> Závislost obsahu arbutinu <i>B. crassifolia</i> ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	61
<b>Obr. č. 17:</b> Závislost obsahu arbutinu <i>B. x ornata</i> ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	61

<b>Obr. č. 18:</b> Závislost obsahu celkových polyfenolů <i>B. ciliata</i> (mg.g <sup>-1</sup> ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	64
<b>Obr. č. 19:</b> Závislost obsahu celkových polyfenolů <i>B. crassifolia</i> (mg.g <sup>-1</sup> ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	64
<b>Obr. č. 20:</b> Závislost obsahu celkových polyfenolů <i>B. x ornata</i> (mg.g <sup>-1</sup> ) na meteorologických podmínkách za sledovaná období z let 2011 až 2013.....	65
<b>Obr. č. 21:</b> Průměrné koncentrace anthokyanů v listových extraktech červených listů <i>B. crassifolia</i> (BCR 3 a 5), <i>B. x ornata</i> (BOR 1) a <i>B. ciliata</i> (BCL 1) vyjádřené v mg C3G.g <sup>-1</sup> rostlinného materiálu.....	69
<b>Obr. č. 22:</b> Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou DPPH na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011 a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012) .....	71
<b>Obr. č. 23:</b> Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou ABTS na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011 a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).....	72
<b>Obr. č. 24:</b> Závislost stanovené antiradikálové aktivity metodou NADH na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011) a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012) .....	73
<b>Obr. č. 25:</b> Závislost stanovené antioxidační aktivity metodou FRAP vyjádřené v mg GAE.100g <sup>-1</sup> na vzrůstající koncentraci standardů a listových extraktů bergenií: vzorek č. BCR 1 (zelené listy, sběr podzim 2011) a vzorek č. BCR 5 (červené listy, sběr podzim 2012).....	76
<b>Obr. č. 26:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou DPPH na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	80
<b>Obr. č. 27:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou DPPH na obsahu bergeninu pro vybrané vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	80
<b>Obr. č. 28:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou ABTS na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	81
<b>Obr. č. 29:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou ABTS na obsahu bergeninu pro vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	81
<b>Obr. č. 30:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou NADH na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů pro vybrané vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	82
<b>Obr. č. 31:</b> Závislost antiradikálové aktivity stanovené metodou NADH na obsahu bergeninu pro vzorky <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	82
<b>Obr. č. 32:</b> Závislost antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP na obsahu arbutinu a celkových polyfenolů u <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .....	83

<b>Obr. č. 33:</b> Závislost antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP na obsahu bergeninu u <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> .	83
<b>Obr. č. 34:</b> Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku <i>B. crassifolia</i> BCR 1, který byl odebíráán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J - jaro).	84
<b>Obr. č. 35:</b> Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku <i>B. ciliata</i> BCL 1, který byl odebíráán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J - jaro)	84
<b>Obr. č. 36:</b> Porovnání antioxidační aktivity stanovené metodou FRAP s odpovídajícím obsahem sekundárních metabolitů stanovených u vzorku <i>B. ornata</i> BOR 1, který byl odebíráán v průběhu sezón 2011 až 2013 z jedné rostliny (P – podzim, J -jaro)	85
<b>Obr. č. 37:</b> Porovnání poklesu aktivity houbové tyrozinázy u etanolových extraktů z bergenií a standardu kyseliny citrónové (v porovnání s kontrolou, která je rovna 1). Aktivita tyrozinázy postupně klesá s rostoucí koncentrací extraktů a standardu.	90
<b>Obr. č. 38:</b> Stanovení poklesu tyrozinázové aktivity u vodných extraktů bergenií a standardu kyseliny citrónové.	90
<b>Obr. č. 39:</b> Účinek 7 denní inkubace s testovanými látkami (bergeninu, arbutinu a extraktů <i>B. crassifolia</i> a <i>B. x ornata</i> ) na přežívání larev <i>Mesocestoides vogae</i> v anaerobních podmínkách.	93
<b>Obr. č. 40:</b> Vliv různých koncentrací čistého arbutinu na metabolickou aktivitu (vyjádřená jako index metabolické aktivity v porovnání s neovlivněnými larvami, kde je index 1) larev <i>Mesocestoides vogae</i> v anaerobních podmínkách.	96
<b>Obr. č. 41:</b> Vliv různých koncentrací čistého bergeninu na metabolickou aktivitu larev <i>Mesocestoides vogae</i> v anaerobních podmínkách.	96
<b>Obr. č. 42:</b> Vliv různých koncentrací čistého arbutinu na metabolickou aktivitu larev <i>Mesocestoides vogae</i> v aerobních podmínkách.	97
<b>Obr. č. 43:</b> Vliv různých koncentrací čistého bergeninu na metabolickou aktivitu larev <i>Mesocestoides vogae</i> v aerobních podmínkách.	97
<b>Obr. č. 44:</b> Účinek extraktů bergenií (vodného <i>B. crassifolia</i> ; etanolových <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> ) na metabolickou aktivitu larev <i>Mesocestoides vogae</i> v aerobních podmínkách...	98
<b>Obr. č. 45:</b> Vliv čistých látek arbutinu a bergeninu na koncentraci lipidů v buňkách larev po 5 hodinové inkubaci.	100
<b>Obr. č. 46:</b> Vliv čistých látek arbutinu a bergeninu na koncentraci lipidů v buňkách larev po 3 denní inkubaci.	101
<b>Obr. č. 47:</b> Vliv čistých látek arbutinu a bergeninu na koncentraci lipidů v buňkách larev po 7 denní inkubaci.	101

<b>Obr. č. 48:</b> Vliv listových extraktů bergenií na koncentraci lipidů v buňkách larev po 5 hodinové inkubaci. (Vysvětlivky: <i>B. crassifolia</i> – vodný extrakt; <i>B. x ornata</i> , <i>B. ciliata</i> – etanolový extrakt.).....	102
<b>Obr. č. 49:</b> Vliv listových extraktů bergenií na koncentraci lipidů v buňkách larev po 7 denní inkubaci. (Vysvětlivky: <i>B. crassifolia</i> – vodný extrakt; <i>B. x ornata</i> , <i>B. ciliata</i> – etanolový extrakt.).....	102
<b>Obr. č. 50:</b> Účinek extraktů bergenií o konečné koncentraci 1,56 – 6,25 mg.ml <sup>-1</sup> <i>B. crassifolia</i> (A), <i>B. x ornata</i> (B) a <i>B. ciliata</i> (C) na aktivaci lymfocytů odpovídající expresi CD69.....	104
<b>Obr. č. 51:</b> Účinek extraktů bergenií o konečné koncentraci 0,2 – 6,25 mg.ml <sup>-1</sup> <i>B. x ornata</i> (A) a <i>B. ciliata</i> (B) na aktivaci lymfocytů odpovídající expresi CD69. ....	105
<b>Obr. č. 52:</b> Závislost aktivace lymfocytů na koncentraci etanolových extraktů bergenií (1,56 – 6,25 mg.ml <sup>-1</sup> ). Histogramy zachycují expresi CD69 (%) na povrchu lymfocytů v porovnání s pozitivní kontrolou (PHA), slepým vzorkem (X-vivo médium) a DMSO .....	106
<b>Obr. č. 53:</b> Porovnání maximální inhibice agregace (%) testovaných vzorků s kyselinou acetylsalicylovou (ASA). ....	108
<b>Obr. č. 54:</b> Závislost inhibice agregace trombocytů na koncentraci kyseliny acetylsalicylové (%). ....	108
<b>Obr. č. 55:</b> Závislost inhibice agregace trombocytů na koncentraci bergeninu (%). ....	109
<b>Obr. č. 56:</b> Závislost inhibice agregace na koncentraci vodného extraktu <i>B. x ornata</i> (%). ....	109
<b>Obr. č. 57:</b> Závislost inhibice tvorby PGH <sub>2</sub> na finální koncentraci vodného extraktu <i>B. x ornata</i> (%) .....	110
<b>Obr. č. 58:</b> <i>B. crassifolia</i> , <i>B. x ornata</i> a <i>B. ciliata</i> vypěstované na zahradě Zahradnické fakulty Mendelovy Univerzity v Lednici. Rostliny byly vysazeny v roce 2005.....	117
<b>Obr. č. 59:</b> Podzimní do červena zbarvené listy <i>B. crassifolia</i> . ....	117
<b>Obr. č. 60:</b> <i>B. crassifolia</i> na zahradě Zahradnické fakulty Mendelovy Univerzity v Lednici... ..	118
<b>Obr. č. 61:</b> Detail květu <i>Bergenia crassifolia</i> . ....	118
<b>Obr. č. 62:</b> Přirozený tvar larev <i>M. vogae</i> v médiu bez přidaných testovaných látek na antiparazitickou aktivitu (kontrola), po 4 hodinové inkubaci při 37°C v anaerobních podmínkách (zvětšení 400x).....	119
<b>Obr. č. 63:</b> Larva <i>M. vogae</i> zachycená při dělení v médiu s přidaným bergeninem v koncentraci 200 µg/ml, po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).....	119
<b>Obr. č. 64:</b> Vitální larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 200 µg/ml, po 4 hodinové inkubaci. Není zde patrná žádná změna přirozeného pohybu larev (zvětšení 400x)...	120
<b>Obr. č. 65:</b> Netypický zvrásnělý povrch těla larev <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným extraktem <i>B. crassifolia</i> po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).....	120
<b>Obr. č. 66:</b> Nepřirozený tvar larev <i>M. vogae</i> v prostředí média s přidaným extraktem <i>B. ciliata</i> , po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).....	121



<b>Obr. č. 67:</b> Mrtvý jedinec <i>M. vogae</i> v prostředí média s extraktem <i>B. crassifolia</i> , po 4 hodinové inkubaci (zvětšení 400x).....	121
<b>Obr. č. 68:</b> Larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným bergeninem v koncentraci 200 µg/ml. U larev je viditelný nervový aparát. Larvy po 3 denní inkubaci stále vykazovaly zvýšenou motilitu (zvětšení 400x).....	122
<b>Obr. č. 69:</b> Larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 100 µg/ml, po 3 denní inkubaci. Larvy mají nepřírozně zvrásnělý povrch (zvětšení 400x).....	122
<b>Obr. č. 70:</b> Přírozně se pohybující larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným extraktem <i>B. crassifolia</i> po 3 denní inkubaci. Není zde patrný toxický vliv testovaných látek na metabolismus larev (zvětšení 400x).....	123
<b>Obr. č. 71:</b> Patologický tvar larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 200 µg/ml po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).....	123
<b>Obr. č. 72:</b> Patologický tvar larvy <i>M. vogae</i> v médiu s bergeninem v koncentraci 200 µg/ml po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).....	124
<b>Obr. č. 73:</b> Patologický tvar larvy <i>M. vogae</i> v médiu s přidaným arbutinem v koncentraci 200 µg/ml po 7 denní inkubaci (zvětšení 400x).....	124
<b>Obr. č. 74:</b> Záznam z fluorescenčního mikroskopu. K důkazu přítomnosti lipidů v larvách <i>M. vogae</i> byly využity kryo-řezy larev s modře zvýrazněnými lipidy a červeně zbarveným chromatinem (zvětšení 1 000x).....	125
<b>Obr. č. 75:</b> Záznam z fluorescenčního mikroskopu. K obarvení preparátu sloužila barviva DAPI - pro zvýraznění chromatinu jader a Nile-RED - pro zvýraznění lipidů. Zvětšení 1 000x.....	125

## 11. SEZNAM TABULEK

<b>Tab. č. 1:</b> Příklady tradičního ajurvédského použití rostlin známých jako <i>Pashanbheda</i> .....	6
<b>Tab. č. 2:</b> Deset původních druhů rostlin rodu <i>Bergenia</i> , sedm z nich se vyskytuje v Číně, z toho tři endemicky.....	6
<b>Tab. č. 3:</b> Seznam druhů rostlin rodu <i>Bergenia</i> (ze sekcí <i>Scopulosae</i> , <i>Bergenia</i> a <i>Ciliatae</i> ) zahrnující známé variety a hybridy.....	7
<b>Tab. č. 4:</b> Seznam všech dosud izolovaných chemických látek z listů a oddenků rostlin druhu <i>Bergenia crassifolia</i> .....	16
<b>Tab. č. 5:</b> Seznam vzorků zelených (z) a červených (č) listů z jednotlivých bergenií označených písmeny (BCR – <i>B. crassifolia</i> ; BOR – <i>B. x ornata</i> , BCL – <i>B. ciliata</i> ) a čísla (jedná se o označení konkrétní rostliny).....	37
<b>Tab. č. 6:</b> Meteorologické údaje (měsíční průměr) pro sběrné období říjen/květen 2011 – 2013.....	60
<b>Tab. č. 7:</b> Výsledné hodnoty obsahu arbutinu, celkových polyfenolů a bergeninu v zelených a červených listech u druhů <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013.....	67
<b>Tab. č. 8:</b> Antiradikálová aktivita extraktů zelených a červených listů <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> , z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013, stanovená metodami DPPH, ABTS a NADH (v % ± SD). Aktivita extraktů byla porovnávána při stejné koncentraci (0,5 mg.ml <sup>-1</sup> ).....	74
<b>Tab. č. 9:</b> Antioxidační aktivita extraktů zelených a červených listů <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> , z podzimních (P) a jarních (J) sběrů z let 2011 až 2013, stanovená metodou FRAP (vyjádřená v mg GAE.100g <sup>-1</sup> ± SD). Aktivita extraktů byla porovnávána při stejné koncentraci (0,5 mg.ml <sup>-1</sup> ).....	77
<b>Tab. č. 10:</b> Výsledky inhibice aktivity houbové tyrozinázy etanolových extraktů <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> a standardu kyseliny citrónové (v porovnání s kontrolou, která je rovna 1). Výsledná hodnota je průměrem ze 4 stanovení (TYR01 - 04).....	88
<b>Tab. č. 11:</b> Výsledky inhibice aktivity houbové tyrozinázy vodných extraktů <i>B. crassifolia</i> , <i>B. ciliata</i> a <i>B. x ornata</i> a standardu kyseliny citrónové. Výsledná hodnota je průměrem ze 3 stanovení (TYR01 - 03).....	89
<b>Tab. č. 12:</b> Účinek inkubace s látkami/extrakty na přežívání larev <i>Mesocestoides vogae</i> v anaerobních podmínkách v médiu RPMI (objem média 10 ml, doba inkubace 7 dní, 37°C)...	93
<b>Tab. č. 13:</b> Stanovení koncentrace lipidů v larvách druhu <i>Mesocestoides vogae</i> po 5 hodinové, 3 denní a 7 denní inhibici .....	100

## 12. SEZNAM VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PUBLIKACÍ

### Recenzované publikace v časopisech s IF:

HENDRYCHOVÁ, H.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L.; KOČEVAR-GLAVAČ N. Bergenin content and free radical scavenging activity of *Bergenia* extracts. *Natural Product Communications*. 2015, **10**(7), 1273-1275. IF: 0,924 (2014).

HENDRYCHOVÁ, H.; VILDOVÁ, A.; KOČEVAR-GLAVAČ, N.; TŮMOVÁ, L.; ABDYKERIMOVA-KANYBEKOVNA, E.; TŮMA J. Antioxidant activity and phenolic content of *Bergenia crassifolia*, *B. x ornata* and *B. ciliata*. *Natural Product Communications*. 2014, **9**(4), 445-596. IF: 0,924 (2014).

TŮMOVÁ, L.; TŮMA, J.; HENDRYCHOVÁ, H. Effect of ultrasound on the isoflavonoid production in *Genista tinctoria* L. suspension cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 2014, **10**(38), 425-429. IF: 1,112 (2014).

KUBEŠ, J.; TŮMOVÁ, L.; MARTIN, J.; VILDOVÁ, A.; HENDRYCHOVÁ, H.; SOJKOVÁ, K. The production of isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. cell suspension culture after abiotic stressors treatment. *Natural Product Research*. 2014, **28**(24), 2253-2263. IF: 1,225 (2014).

### Recenzované publikace:

HENDRYCHOVÁ, H.; TŮMOVÁ, L. Rod *Bergenia* – obsahové látky a biologická aktivita. *Česká a slovenská Farmacie*. 2012, **61**(5), 203-209.

### Ostatní publikace:

HENDRYCHOVÁ, H. Obsah fenolických látek v různých taxonech rodu *Bergenia* Moench. *Zahradnictví*. 2014, **5**, 52-53.

HENDRYCHOVÁ, H. Bergénie a její léčebné účinky. *Liečivé rastliny/Léčivé rostliny*. 2014, **51**(2), 53-54.

### 13. ÚČAST NA KONFERENCÍCH, PRACOVNÍCH STÁŽÍCH A SEMINÁŘÍCH

#### Konference:

**5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 3. – 4. 2. 2015.**

HENDRYCHOVÁ, H.; TŮMOVÁ, L. Phytochemical study of individual plant species of *Bergenia* genus (přednáška).

**IX. sjezd Slovenské Farmaceutické Společnosti, Bratislava, Slovensko, 4. – 5. 9. 2014.**

HENDRYCHOVÁ, H.; MARTIN, J.; TŮMOVÁ, L.; KOČEVAR-GLAVAČ, N. Antioxidační aktivita a obsahové látky rostlin rodu *Bergenia* (poster).

**International conference on medicinal plants and their use in therapeutic practice, Stará Lubovna, Slovensko, 14. – 16. 5. 2014.**

HENDRYCHOVÁ, H.; KOČEVAR-GLAVAČ, N.; TŮMOVÁ, L. Antioxidant activity of *Bergenia* genus. *Sborník abstraktů z konference*, s. 32 (poster).

**4. Postgraduální a 2. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 28. – 29. 1. 2014.**

HENDRYCHOVÁ, H.; TŮMOVÁ, L. *Bergenia* genus, phenolic content and antioxidant activity (přednáška).

**3<sup>rd</sup> International Horticultural Conference for Post-graduate Students, Lednice, 23. – 24. 10. 2013.**

HENDRYCHOVÁ, H.; VILDOVÁ, A.; KOČEVAR-GLAVAČ, N.; TŮMOVÁ, L. Evaluation of phenolic content and antioxidant activity in *Bergenia* genus. *Sborník abstraktů z konference*, s. 37 – 41 (poster).

**3. Postgraduální a 1. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 29. – 30. 1. 2013.**

HENDRYCHOVÁ, H.; VILDOVÁ, A.; TŮMOVÁ, L. *Bergenia* Moench. genus – content matters and biological activity (přednáška).

**Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin, Lednice, 5. – 6. 12. 2012.**

HENDRYCHOVÁ, H.; VILDOVÁ, A.; TŮMOVÁ, L.; TŮMA J. Obsah fenolických látek v různých taxonech rodu *Bergenia* Moench. *Sborník abstraktů z konference*, s. 52 – 56 (poster).

**Pracovní stáže:**

**Odborná pracovní stáž na Parazitologickém ústavu Slovenské akademie věd (SAV), Košice, Slovensko, 9. 3. – 21. 3. 2015.** Financovaná z finančního daru firmy Zentiva.

**Pracovní stáž na katedře Farmaceutické biologie, Farmaceutické fakulty Univerzity v Ljubljani, Ljubljana, Slovinsko, 29. 3. – 3. 5. 2014.** Financovaná z programu FAFIS (Project no. CZ.1.07/2.2.00/28.0194).

**Pracovní stáž na katedře Farmaceutické biologie, Farmaceutické fakulty Univerzity v Ljubljani, Ljubljana, Slovinsko, 1. 3. – 31. 5. 2013.** Financovaná z programu ERASMUS.

**Semináře:**

Kurz E-learningového systému Moodle. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2014.

Cyklus odborných přednášek firem Pragolab, Thermo Fischer Scientific a NicoletCZ, Pardubice, 7. 11. 2012.