

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Metody monitorující antimikrobiální účinky přírodních látek

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Rudolf Kukla

Pardubice
2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 9. 2017

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. a prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovaly během celého postgraduálního studia.

Zároveň děkuji Ing. Miroslavu Rozkotovi, CSc., Ing. Janu Lipenskému, DiS. a Ing. Aleně Lustykové, Ph.D. z Výzkumného ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí za spolupráci při hodnocení ejakulátů a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za poskytnutí některých přírodních sloučenin.

Zvláštní poděkování patří mé rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého doktorského studia.

SEZNAM ZKRATEK

<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
BHI	bujon s mozkosrdcovou infuzí (z angl. Brain-Heart Infusion)
BTS	ředící roztok pro přípravu inseminačních dávek (z angl. Beltsville Thawing Solution)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (z angl. Czech Collection of Microorganisms)
CFU	kolonii tvořící jednotka (z angl. Colony Forming Unit)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
FBC _A	frakční baktericidní koncentrace látky A (z angl. Fractional Bactericidal Concentration)
FBC _B	frakční baktericidní koncentrace látky B
FIC _A	frakční inhibiční koncentrace látky A (z angl. Fractional Inhibitory Concentration)
FIC _B	frakční inhibiční koncentrace látky B
FBCI	index frakční baktericidní koncentrace (z angl. Fractional Bactericidal Concentration Index)
FICI	index frakční inhibiční koncentrace (z angl. Fractional Inhibitory Concentration Index)
KA	krvní agar
<i>Kl. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MBC	minimální baktericidní koncentrace (z angl. Minimum Bactericidal Concentration)
MBC ₅₀	minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MFC	minimální fungicidní koncentrace (z angl. Minimum Fungicidal Concentration)
MHA	Mueller Hintonův agar
MHB	Mueller Hintonův bujon
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. Minimum Inhibitory Concentration)
MIC ₅₀	minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk
MNK	maximální netoxická koncentrace
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>St. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>St. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>St. hyicus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>

SOUHRN

Dizertační práce byla zaměřena na zavedení vhodných metod pro stanovení antimikrobiálních účinků přírodních látek na mikroorganismy kontaminující vybraný živočišný biologický materiál. Jako modelový materiál jsme používali ejakuláty kanců. Testované látky jsme vybrali na základě informací uvedených v odborné literatuře a výsledků dosavadních experimentů pracovníků Katedry biologických a biochemických věd, Univerzity Pardubice a Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Nejprve jsme zavedli vhodné kultivační metody pro kvalitativní i kvantitativní průkaz mikroorganismů vyskytujících se v daném biologickém materiálu, konkrétně v ejakulátech kanců. Zavedli jsme a ověřili vhodnost metody pro stanovení antimikrobiální aktivity přírodních sloučenin včetně zjištění jejich účinných koncentrací. Rovněž jsme zavedli metodu pro stanovení antimikrobiálních účinků vybraných přírodních látek v jejich kombinaci. U látek s nejvyšší antimikrobiální aktivitou jsme zavedli metodu pro zjišťování jejich toxicity pro kančí pohlavní buňky. Na základě výsledků jsme vyhodnotili možnost použití přírodních látek k dekontaminaci ejakulátů kanců a případně pro další účely.

Kultivačními metodami jsme prokázali, že všechny vyšetřené ejakuláty kanců byly kontaminovány mikroorganismy v různém kvalitativním a kvantitativním zastoupení. Mezi nejzávažnější patřily *Pseudomonas aeruginosa*, druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* – zejména *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*, dále stafylokoky, enterokoky a streptokoky.

Ke zjišťování antimikrobiálních účinků přírodních látek jsme používali mikrodiluční metodu. Antimikrobiální aktivitu jsme ověřovali u 19 přírodních látek, silic a EDTA referenčními kmeny mikroorganismů a vybranými druhy bakterií a kvasinek vykultivovaných z ejakulátů kanců. Vzhledem k získaným výsledkům jsme dále testovali tyto látky přírodního původu, konkrétně thymol, karvakrol, eugenol, kyselinu gallovou, methyl-gallát, ethyl-gallát, propyl-gallát, oktyl-gallát, kyselinu usnovou a knicin. U těchto sloučenin jsme zjišťovali minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace a také vzájemné interakce jejich dvojkombinací.

Růst mikroorganismů použitých v naší práci nejlépe inhibovaly sloučeniny thymol, karvakrol a knicin. Grampozitivní bakterie byly inhibovány nízkými koncentracemi kyseliny usnové a oktyl-gallátu. Antimikrobiální účinky kombinací sloučenin byly nejvýraznější u směsi thymolu s EDTA, karvakrolu s EDTA a thymolu s karvakrolem. Nejnižší spermioxicitu vykazovaly látky karvakrol, thymol, eugenol, methyl-gallát a ethyl-gallát. U EDTA jsme toxické účinky na spermie nezaznamenali. Naše výsledky dokumentují, že pro dekontaminaci

kančích ejakulátů lze použít thymol, karvakrol a zejména pak jejich vzájemné kombinace, s EDTA. Tyto látky a jejich kombinace jsou dostatečně účinné na většinu mikroorganismů kontaminujících ejakuláty kanců v koncentracích, při kterých zůstává zachována vitalita kančích spermií.

Uvedené přírodní látky (thymol, karvakrol, eugenol, kyselina gallová, methyl-gallát, ethyl-gallát, propyl-gallát, oktyl-gallát, kyselina usnová a knicin) vykazují signifikantní antimikrobiální účinky a jsou vhodné pro další výzkum zabývající se problematikou léčby vybraných infekčních onemocnění člověka i zvířat.

KLÍČOVÁ SLOVA

přírodní látky, minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace, toxicita pro kančí spermie, mikroorganismy, mikrodiluční metoda

TITLE

Methods for monitoring of antimicrobial effects of natural substances

SUMMARY

The doctoral thesis was focused on the introduction and verification of convenient methods for the determination of antimicrobial activities of natural substances on microorganisms contaminating the selected animal biological material. Boar semen was used as model material. The tested substances were selected using the information provided in the scientific papers and the results of the experiments carried out by the staff of the Department of Biological and Biochemical Sciences, the University of Pardubice and the Faculty of Pharmacy of Charles University in Hradec Králové.

We introduced cultivation methods for qualitative and quantitative determination of microorganisms contaminating boar semen. We verified methods for determining the antimicrobial activities of natural compounds, including the determination of their effective concentrations. We also introduced a method for determining the antimicrobial effects of selected natural substances in a combination. For substances with the highest antimicrobial activities, we introduced a method for detecting their toxicity for boar sperm cells. Based on the results, we evaluated the possibility to use of natural substances for boar semen decontamination or for other purposes.

Using cultivation methods, we proved that all examined boar semen samples were contaminated by microorganisms in different qualitative and quantitative representations. *Pseudomonas aeruginosa*, family *Enterobacteriaceae* species - *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* and also staphylococci, enterococci and streptococci were included among the most serious pathogens.

For the determination of the antimicrobial activities of natural substances, we selected the microdilution method. Antimicrobial activities were verified in case of 19 natural substances, essential oils and EDTA on reference bacterial strains and selected bacterial and yeast strains isolated from boar semen. In the view of the results obtained, we had further tested thymol, carvacrol, eugenol, gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate, octyl gallate, usnic acid, knicin and their mutual combinations. For these compounds, we determined minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations, as well as interactions with their double combinations.

We found thymol, carvacrol and knicin as the most potent inhibitors of microorganisms. Gram-positive bacteria were inhibited in low concentrations of usnic acid and octyl gallate. The antimicrobial effects of the combination of compounds were the most pronounced in the thymol mixture with EDTA, carvacrol with EDTA and thymol with carvacrol. The lowest spermotoxicity was observed for carvacrol, thymol, eugenol, methyl gallate and ethyl gallate. We found no negative effect of EDTA for boar sperm cells. Our results show that thymol, carvacrol and their combinations, including combinations with EDTA, can be used for the boar semen decontamination. These compounds and their combinations are effective enough for the most microorganisms contaminating boar semen in concentrations in which boar sperm cells remain vital.

The natural substances mentioned above (thymol, carvacrol, eugenol, gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate, octyl gallate, usnic acid and knicin) show the significant antimicrobial effects and may be used not only in the artificial insemination process, but also in the treatment of selected infectious diseases.

KEYWORDS

natural substances, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, toxicity for boar sperm cells, microorganisms, microdilution method

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
SOUHRN	9
SUMMARY	11
OBSAH	13
ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK.....	17
1.2 METODY PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK.....	19
1.2.1 METODY KVALITATIVNÍ	19
1.2.2 METODY KVANTITATIVNÍ	20
1.2.3 OSTATNÍ METODY	22
1.3 LÁTKY TESTOVANÉ PRO ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY	24
1.3.1 LÁTKY PŘÍRODNÍHO PŮVODU	24
1.3.1.1 THYMOL	24
1.3.1.2 KARVAKROL	26
1.3.1.3 EUGENOL.....	27
1.3.1.4 KYSELINA GALLOVÁ	28
1.3.1.5 METHYL-GALLÁT	29
1.3.1.6 ETHYL-GALLÁT	30
1.3.1.7 PROPYL-GALLÁT.....	31
1.3.1.8 OKTYL-GALLÁT.....	32
1.3.1.9 KYSELINA USNOVÁ.....	33
1.3.1.10 KNICIN	34
1.3.1.11 PINENY	36
1.3.1.12 LIMONEN	38
1.3.1.13 BERBERIN.....	39
1.3.1.14 KVERCETIN.....	40
1.3.1.15 KYSELINA ROZMARÝNOVÁ.....	41
1.3.1.16 <i>P</i> -CYMEN	42
1.3.2 SILICE.....	43

1.3.2.1 KMÍNOVÁ SILICE (<i>CARVI AETHEROLEUM</i>)	43
1.3.2.2 FENYKLOVÁ SILICE (<i>FOENICULI AETHEROLEUM</i>)	44
1.3.2.3 LEVANDULOVÁ SILICE (<i>LAVANDULAE AETHEROLEUM</i>)	44
1.3.2.4 ROZMARÝNOVÁ SILICE (<i>ROSMARINI AETHEROLEUM</i>)	45
1.3.2.5 TERPENTÝNOVÁ SILICE (<i>TEREBINTHINAE AETHEROLEUM</i>).....	45
1.3.3 KYSELINA ETHYLENDIAMINTETRAOCTOVÁ	46
2 CÍLE PRÁCE	47
3 MATERIÁL A METODY	48
3.1 MIKROORGANISMY POUŽITÉ PRO ZJIŠŤOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK	48
3.2 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE	50
3.2.1 TESTOVANÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY A SILICE.....	50
3.2.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA	51
3.2.3 ROZTOKY A ČINIDLA.....	53
3.3 LABORATORNI PŘÍSTROJE A POMŮCKY	54
3.3.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE	54
3.3.2 LABORATORNÍ POMŮCKY	54
3.4 POSTUP VYŠETŘENÍ MODELOVÉHO BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	55
3.4.1 METODY PRO KVALITATIVNÍ VYŠETŘENÍ	55
3.4.2 METODY PRO KVANTITATIVNÍ VYŠETŘENÍ	55
3.5 METODY PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK.....	56
3.5.1 MIKRODILUČNÍ METODA	56
3.5.2 BUJONOVÁ DILUČNÍ METODA	58
3.5.3 AGAROVÁ DILUČNÍ METODA.....	59
3.6 METODA PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK V KOMBINACI.....	61
3.6.1 MIKRODILUČNÍ METODA	61
3.7 METODA PRO STANOVENÍ SPERMIOTOXICITY TESTOVANÝCH LÁTEK	65
4 VÝSLEDKY	67
4.1 VÝSLEDKY KVALITATIVNÍHO A KVANTITATIVNÍHO VYŠETŘENÍ KANČÍCH EJAKULÁTŮ	67
4.2 VÝSLEDKY STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ A MINIMÁLNÍCH BAKTERICIDNÍCH KONCENTRACÍ PŘÍRODNÍCH LÁTEK.....	68

4.2.1 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE SILIC.....	68
4.2.2 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK PRO REFERENČNÍ KMENY BAKTERIÍ.....	70
4.2.3 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA MIKROORGANISMY VYKULTIVOVANÉ Z KANČÍCH EJAKULÁTŮ A Z OSTATNÍCH KLINICKÝCH VZORKŮ	73
4.3 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE TESTOVANÝCH LÁTEK V KOMBINACI.....	78
4.4 SPERMIOTOXICITA TESTOVANÝCH LÁTEK PRO KANČÍ POHLAVNÍ BUŇKY.....	85
5 DISKUZE.....	92
5.1 ZHODNOCENÍ METOD PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK.....	96
5.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY TESTOVANÝCH LÁTEK.....	98
5.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY LÁTEK TESTOVANÝCH V KOMBINACI.....	103
5.4 SPERMIOTOXICITA TESTOVANÝCH LÁTEK PRO KANČÍ POHLAVNÍ BUŇKY.....	105
5.5 ANALÝZA ÚČINKU VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK, JEJICH KOMBINACÍ A VYHODNOCENÍ MOŽNOSTI POUŽITÍ K DEKONTAMINACI KANČÍCH EJAKULÁTŮ	107
6 ZÁVĚR.....	109
7 LITERÁRNÍ ZDROJE.....	111

ÚVOD

Přírodní sloučeniny obsažené v různých částech rostlin a možnosti jejich využití jsou předmětem výzkumů odborných týmů na celém světě. Výsledky studií realizovaných na výzkumných pracovištích dokumentují antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, analgetické a další účinky těchto látek. V posledních letech je zvýšený zájem o výzkum antimikrobiálních účinků přírodních látek zejména v souvislosti s narůstáním rezistence mikroorganismů na antibiotika a to jak v humánní tak veterinární sféře.

V současné době se totiž stále častěji objevují multi-rezistentní kmeny bakterií. Za jednu z příčin vzniku rezistentních mikroorganismů se uvádí používání antibiotik v zemědělství pro jiné než léčebné účely. Jako příklad lze uvést používání glykopeptidového antibiotika avoparcinu, který způsobuje zkříženou rezistenci enterokoků i k vankomycinu. Vankomycin se v humánní medicíně používá pro léčbu závažných infekcí způsobených stafylokoky nebo enterokoky. Přenos rezistentních bakterií ze zvířete na člověka, který byl opakovaně prokázán, je z tohoto hlediska rizikový (Wegener, 2003).

Na počátku roku 2006 bylo v rámci Evropské unie používání vybraných antibiotik v sub-inhibičních koncentracích jako stimulátorů růstu zakázáno. Nadále jsou některá tato léčiva užívána pro jiné než terapeutické účely. Jedním z nich je proces umělé inseminace, kde jsou antibiotika přidávána do ejakulátů, za účelem inhibice růstu přítomných bakterií. Důvodem je významně nižší biologická kvalita ejakulátů, které jsou kontaminovány vyšším množstvím mikroorganismů.

V dnešní době umělá inseminace jasně převažuje nad přirozeným oplodněním a inseminačních dávek se tudíž vyrábí enormní množství v přímé úměře s antibiotiky do dávek přidávaných. I v tomto případě tedy hrozí selekce kmenů bakterií rezistentních na antibiotika a jejich přenos na člověka (Cogliani *et al.*, 2011). Vzhledem k narůstající rezistenci mikrobů následkem celosvětového častého používání až zneužívání antibiotik nejen k léčebným účelům je nutné vyvíjet snahu o snížení spotřeby, případně jejich náhradu. Jednou z možností alternativního řešení je využití přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. Je však nutné zavést vhodné metody pro zjišťování jejich účinných koncentrací a vybrat takové přírodní látky, které nejsou toxické pro spermie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Ekonomika produkce vepřového masa v chovech hospodářských zvířat je v současné době jednou ze stěžejních problematik řešených na chovatelské úrovni domácích prasat. V České republice má vepřové maso své nezastupitelné místo, jeho spotřeba se ročně pohybuje kolem 40 kg na osobu. Celosvětově je více než 30 % konzumovaného masa právě vepřové (Tapaloaga *et al.*, 2011).

Z tohoto důvodu směřují snahy chovatelů prasat k optimálnímu využití plemenných kanců v umělé inseminaci. První zprávy o úspěšné umělé inseminaci pocházejí z třicátých a čtyřicátých let 20. století. Umělá inseminace je preventivním opatřením snižujícím riziko přenosu původců pohlavních chorob (Johnson *et al.*, 2000; Moudrý, 2007).

V rámci celosvětového procesu umělé inseminace je produkováno několik stovek miliónů inseminačních dávek ročně (Holt, 2000). Uvedená skutečnost je důvodem, proč jsou na parametry kančích ejakulátů a z nich připravené inseminační dávky kladeny vysoké požadavky, které zahrnují i jejich zdravotní nezávadnost.

Mezi významný faktor snižující kvalitu ejakulátů kanců určených k umělé inseminaci patří mikrobiální kontaminace. Mikroorganismy se do ejakulátu dostávají zejména při odběru nebo i při dalším zpracování odebraného spermatu do forem inseminačních dávek. Tyto mikroorganismy mají nejen nežádoucí účinky na spermie, ale mohou se dále podílet na vzniku zánětlivých změn v pohlavním ústrojí prasnic.

V nativních ejakulátech se mohou vyskytovat bakterie, viry, kvasinky i plísně (Althouse *et Lu*, 2005; Blomqvist *et al.*, 2011; Kauffold *et al.*, 2007). Mezi bakterie často kontaminující kančí ejakuláty se řadí druhy čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp.), dále *Pseudomonas aeruginosa*, stafylokoky, streptokoky a enterokoky. Většina z uvedených bakterií patří mezi podmíněně patogenní, avšak metabolicky velmi aktivní druhy, které svým působením mohou snižovat biologickou kvalitu ejakulátů případně inseminačních dávek. Bakterie mohou kvalitu ejakulátu ovlivňovat prostřednictvím spotřeby živin přítomných v seminální plazmě, zejména sacharidů, což vede ke snížení zdrojů energie pro spermie a poklesu pH k hodnotám 5,2 – 5,7 (Althouse *et Lu*, 2005; Ciornei *et al.*, 2008). Mikroorganismy produkující různé exolátky (enzymy, toxiny) negativně ovlivňují přežívání spermií, některé druhy bakterií způsobují aglutinaci spermií. Bakterie přítomné v inseminační dávce mohou být v procesu inseminace přeneseny

do dělohy, kde jsou schopny vyvolat zánětlivé procesy sliznice děložní, což může negativně ovlivnit oplození vajíčka či nidaci už vajíčka oplodněného (Mazurová *et* Vinter, 1991).

1.1 VÝZNAM STUDIA PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Přírodní sloučeniny jsou získávány z přírodních zdrojů, mezi které patří rostliny, živočichové nebo mikroorganismy. Rostliny mají téměř neomezenou schopnost syntetizovat velké množství látek s různými účinky. Odhaduje se, že známý počet druhů rostlin na zemi je 250 000 až 500 000, které produkují více než 100 000 nízkomolekulárních sloučenin, označované jako sekundární metabolity. Ty se liší od sloučenin intermediárního (primárního) metabolismu rostlin hlavně tím, že nejsou nezbytné pro jejich základní metabolické procesy. Většinou se jedná o sloučeniny odvozené od izoprenoidů, fenylypropanoidů, alkaloidů a polyketidů, které mohou plnit ochrannou funkci, hlavně před napadením rostlinnými patogeny (Dixon, 2001).

V mnoha zemích jsou přírodní sloučeniny z rostlin získávány za účelem empirického využití jejich vlastností, které jsou ve stručném výčtu často antibakteriální, antimykotické, antivirové, dále protizánětlivé a antioxidační. Účinné látky mohou být obsaženy v celých rostlinách nebo pouze v jejich částech – pupenech, květech, listech, stoncích, semenech, kořenech i kůře, z nichž se získávají různými metodami (Wong *et al.*, 2008; Maher *et al.*, 2012).

Léčivé účinky přírodních sloučenin z rostlin jsou známy po dlouhou dobu. První doložitelné zmínky pochází z Egypta 2900 př.n.l. a Mezopotámie 2600 př.n.l., novější z Číny 1100 př.n.l. nebo Řecka 100 – 300 př.n.l. Mnoho dnes používaných přípravků, významných pro medicínu a zdravotnictví, je připraveno z přírodních produktů, jelikož je mnohem výhodnější a snazší tyto látky extrahovat a izolovat, než synteticky připravovat. Řada z nich je používána k léčbě kardiovaskulárního, urogenitálního, centrálního nervového systému a dýchacích cest (Cowan, 1999; Kalemba *et al.*, 2003; Opletal *et al.*, 2005).

K prudkému poklesu zájmu o přírodní sloučeniny v oblasti léčby infekčních chorob došlo s nástupem a rozvojem antibiotik izolovaných z plísní a později připravovaných synteticky ke konci 40. let a v průběhu 50. let 20. století (Cowan, 1999). V důsledku důvěry v antibiotika, jejich nadužívání a nedodržování vhodné antibiotické politiky postupně dochází ke vzniku a narůstání rezistence mikroorganismů na tato léčiva.

V rámci animální provenience je aktuálně sledován nárůst meticilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* v chovech zvířat. U těchto kmenů byl prokázán přenos ze zvířat na člověka a dokonce z masných výrobků na člověka. Tyto kmeny mohou u imunosuprimovaných jedinců vyvolat závažné až život ohrožující infekce (Cuny *et al.*, 2015). V budoucnu hrozí výskyt pan-rezistentních kmenů, tj. bakterií rezistentních ke všem běžně dostupným antibiotikům, což vzbuzuje obavy z možného selhání antibiotické léčby.

Navíc, počet dostupných a účinných antibiotik je omezený a v současnosti těchto léčiv příliš nepřibývá.

Řešení tohoto závažného celosvětového problému vyžaduje mimo jiné hledání nových účinných sloučenin s antimikrobiálním účinkem, případně jejich kombinací nebo kombinací s antibiotiky. Jednou z alternativ mohou být přírodní látky, u kterých je však nutno zjistit jejich antimikrobiální účinky. Je známo a izolováno velké množství přírodních látek, u kterých byly antimikrobiální účinky prokázány. Prozatím nebyla publikována významná rezistence mikroorganismů k přírodním látkám s antimikrobiálními účinky.

1.2 METODY PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK

K hodnocení antimikrobiální aktivity látek jsou nejčastěji používány metody difúzní a diluční. Difúzní metody, které patří mezi kvalitativní, jsou často využívány ke sledování účinků většího množství látek (Kalemba *et* Kunická, 2003; Burt, 2004). Použitím difúzní metody lze získat pouze informaci o citlivosti nebo rezistenci mikroba k dané látce na základě odečtu velikosti inhibiční zóny a jejího srovnání s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny uvedenými různými institucemi. Hraniční hodnoty – „breakpointy“ jsou však dostupné pro antibiotika, nikoliv pro přírodní látky. Metody diluční, které jsou ve srovnání s difúzními pracnější, poskytují informaci o koncentraci určité látky nutné k inhibici růstu nebo usmrcení mikroorganismu. Kvantitativní výsledky jsou vyjádřené minimální inhibiční nebo minimální baktericidní koncentrací (Andrews, 2001; Burt, 2004; Ilić *et al.*, 2014).

1.2.1 METODY KVALITATIVNÍ

Agarová difúzní metoda

Agarová difúzní metoda je prováděna nejčastěji na Mueller Hintonově agaru (MHA) s jamkami. Bakteriální suspenze v bujonu je sterilním vatovým tampónem rovnoměrně rozetřena po celém povrchu agarové půdy a do jamek je pipetována účinná látka. Principem je difúze účinné látky z jamek do kultivačního média. V okolí jamky vznikne koncentrační gradient, který brání růstu mikrobů. Inkubace probíhá při 37°C, 24 hodin a po jejím uplynutí jsou sledovány a hodnoceny inhibiční zóny. Průměr inhibičních zón je porovnáván s hraničními hodnotami pro citlivé kmeny a na závěr je stanovena citlivost nebo rezistence mikroba k testované látce (Kalemba *et* Kunická, 2003). K lepší vizualizaci zóny inhibice může být do půdy přidán barevný indikátor (Burt, 2004).

Kalemba *et* Kunická (2003) popisují tuto metodu jako nepříliš vhodnou pro testování esenciálních olejů a těkavých přírodních látek, které by se mohly během inkubace vypařit. Jako další problém uvádějí fakt, že tyto látky hůře difundují do agarového média. I přesto je tato metoda ke stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů využívána zejména z důvodu snadného provedení, kdy je zapotřebí pouze malé množství účinné látky. Agarovou difúzní metodu používali Agboke *et* Esimone (2011) pro stanovení antimikrobiálních účinků extraktů z lišejníků. Bagamboula *et al.* (2004) použili tuto metodu ke stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů na *Shigella sonnei* a *Shigella flexneri*.

Disková difúzní metoda

Princip diskové difúzní metody je obdobný jako u agarové difúzní metody. Místo jamek v agarovém médiu jsou na povrch půd s mikrobiální suspenzí položeny papírové disky napuštěné účinnou látkou, která difunduje do živného média. Disková difúzní metoda je v dnešní době používána hlavně pro stanovení citlivosti na antibiotika v klinických mikrobiologických laboratořích.

Tuto metodu použili Baydar *et al.* (2004) pro stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů a později také Chanwitheesuk *et al.* (2007) pro zjištění antimikrobiálního účinku kyseliny gallové. Uvedenou metodu použili také autoři Hsieh *et al.* (2001) pro stanovení antimikrobiálních účinků přírodních látek ve vzájemné kombinaci.

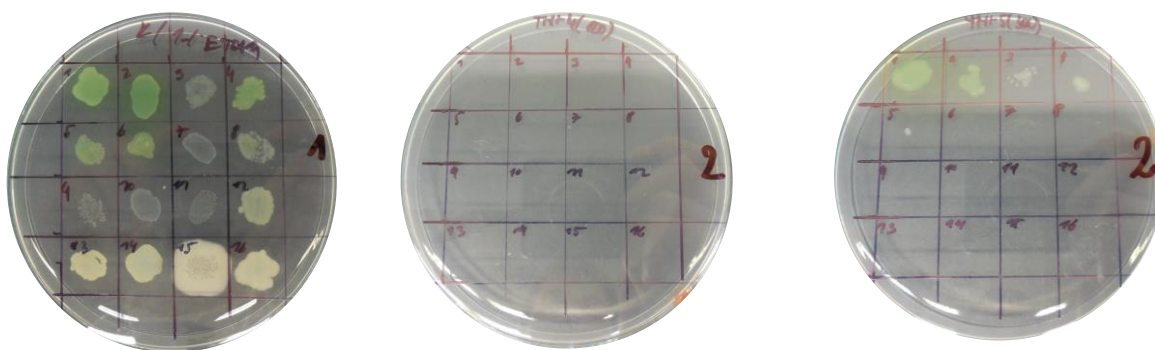
1.2.2 METODY KVANTITATIVNÍ

E-test

Jedná se o kvantitativní metodu, na MHA s mikrobiální suspenzí je přiložen kalibrovaný proužek s definovaným koncentračním gradientem jedné antimikrobiální sloučeniny. Inhibiční zóna, která po inkubaci vzniká, má charakteristický tvar kapky. Hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) je odečtena v místě, kde hrot kapky protíná stupnici proužku. Prakticky se této metody využívá pouze pro stanovení MIC antibiotik (Glupczynski *et al.*, 2002).

Agarová diluční metoda

Pro agarovou diluční metodu se používá MHA. Každá plotna obsahuje MHA s určitou koncentrací účinné látky. Na povrch média lze na vyznačená místa kličkou naočkovat až 30 mikrobiálních kmenů a po inkubaci v termostatu 24 hodin při 37°C je hodnocen nárůst kolonií. Jako MIC je hodnoceno první médium s koncentrací antimikrobiální látky, kde nárůst není pozorován. Ukázka provedení je dobře pochopitelná z Obrázku 1, viz další strana. Agarová diluční metoda je zároveň metodou referenční (Glupczynski *et al.* 2002).



Kontrola růstu všech 16 bakteriálních kmenů na Mueller Hintonově agaru s 1% ethanolem

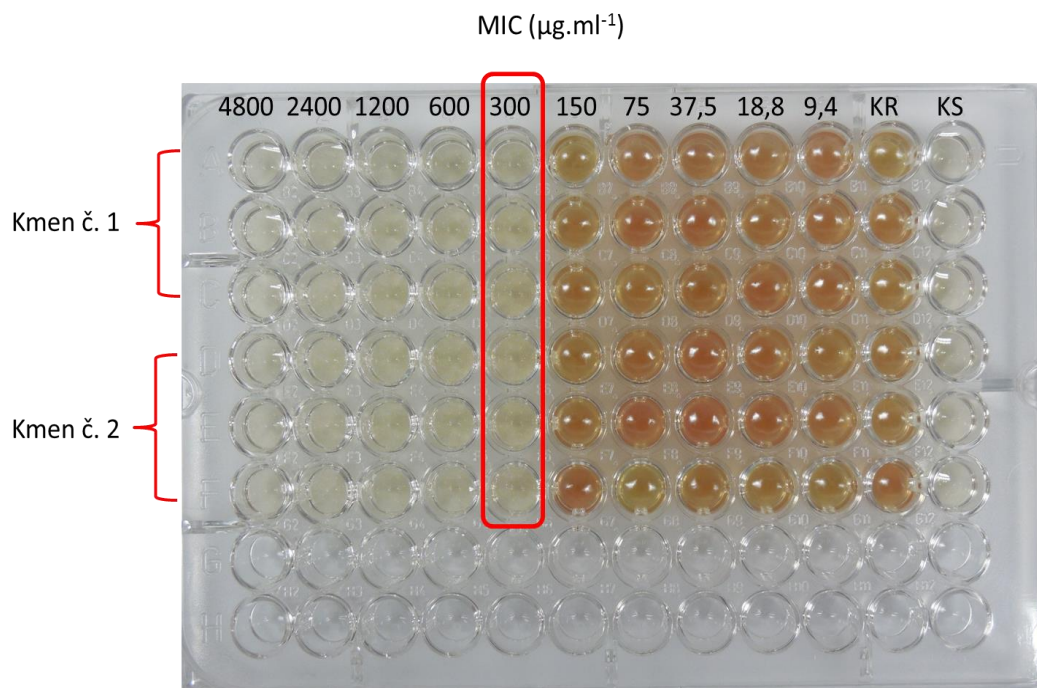
Inhibice všech 16 bakteriálních kmenů thymolem o koncentraci $600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Koncentrace thymolu $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je účinná na většinu bakterií vyjma kmenů v prvních pěti sektorech

Obrázek 1: Ukázka stanovení MIC přírodní látky ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) agarovou diluční metodou (foto: autor)

Bujonová diluční metoda a mikrodiluční metoda

Tyto metody jsou rovněž kvantitativní a jsou prováděny ve zkumavkách (diluční) nebo v mikrotitračních destičkách (mikrodiluční) o 96 jamkách. Zkumavky nebo jamky mikrotitrační destičky jsou naplněny antimikrobiální látkou ředěnou vhodným médiem, nejčastěji Mueller Hintonovým bujonem (MHB) na příslušnou koncentraci. Poté je přidána zředěná bakteriální suspenze a obsah zkumavek nebo jamek je důkladně promíchán. Inkubace probíhá v termostatu při 37°C , 24 hodin. Po uplynutí této doby je jako MIC vyhodnocena první jamka bez viditelného zákalu nebo sedimentu (viz Obr. 2). Nárůst v podobě zákalu nebo sedimentu lze dobře srovnat s jamkami s pozitivní a negativní kontrolou.



Obrázek 2: Ukázka stanovení MIC přírodní látky ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v triplikátu pro dva kmeny *Pseudomonas aeruginosa* mikrodiluční metodou (foto: autor)

Jamky bez viditelného růstu jsou vyočkovány na agarovou půdu a inkubovány rovněž v termostatu při 37°C . Po uplynutí inkubační doby 24 hodin, je hodnocena minimální baktericidní koncentrace (MBC) na první agarové půdě bez růstu mikrobů (Ilić *et al.*, 2014). Diluční metoda ve zkumavkách je vhodná pro menší počet testovaných látek. Mikrodiluční metoda je vhodnější pro zjišťování antimikrobiálních účinků většího množství látek nebo jejich kombinací. Pro sloučeniny na olejové bázi může být za účelem lepší vizualizace přidán jako indikátor růstu resazurin nebo trifenyl tetrazolium chlorid (Burt, 2004; Ilić *et al.* 2014).

1.2.3 OSTATNÍ METODY

Bioautografická metoda

Pro stanovení antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů lze použít metodu bioautografie. Metoda je založena na schopnosti mikroorganismů redukovat žlutý 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT) na fialový formazán. Formazán difunduje

do média, což se projeví jeho zbarvením. Reakce probíhá pouze na mitochondriálních membránách živých buněk.

Na povrch silikagelové destičky je nanesen testovaný extrakt. Destička je vložena na dno Petriho misky a převrstvena agarovým médiem obsahujícím suspenzi 24 hodinové kultury bakteriálního kmene. Po inkubaci se povrch agarového média přelije MTT. Poté lze hodnotit zbarvení živné půdy. MTT je redukováno pouze živými bakteriálními buňkami, proto je možné změnu barvy pozorovat pouze v místě média obsahujícího metabolizující bakterie, naopak plocha s mrtvými buňkami je bezbarvá nebo žlutá (Tan *et al.*, 2011).

Horváth *et al.* (2013) použili tuto metodu ke stanovení inhibičních účinků několika přírodních sloučenin. Aldehyd kyseliny skořicové a eugenol byly účinnými látkami v bioautografickém systému použitém v uvedené studii. Součásti eukalyptu a tea tree oleje vykazovaly menší aktivitu proti *Pseudomonas syringae* a *Vibrio fischeri*.

1.3 LÁTKY TESTOVANÉ PRO ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY

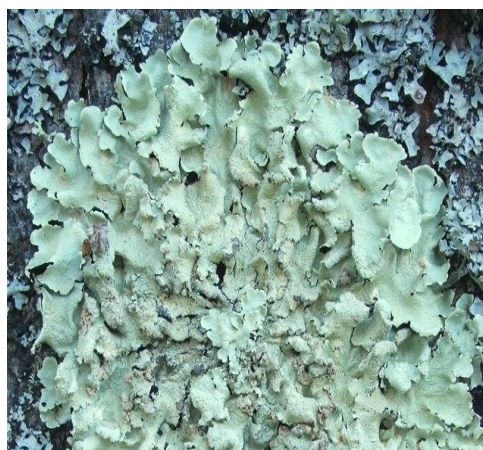
1.3.1 LÁTKY PŘÍRODNÍHO PŮVODU

V této práci jsme testovali antimikrobiální účinky různých druhů látek pocházejících převážně z rostlin (viz Obr. 3). Jednalo se o monoterpeny, mezi které patří pineny a limonen, dále fenolické monoterpeny, mezi které se řadí thymol a karvakrol. Zjišťovali jsme rovněž účinky aromatického fenolu – eugenolu a fenolické kyseliny – kyseliny gallové a jejích esterů, dále kyseliny rozmarýnové. Mezi testované alkaloidy patří berberin a mezi flavonoidy kvercetin. Méně známou sloučeninou je knicin, který se řadí mezi germakranolidy. Jedinou látkou testovanou v naší práci, která se vyskytuje v lišejnících, je kyselina usnová (viz Obr. 4).



Obrázek 3: Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), zdroj karvakrolu

<http://www.worldplants.ca/display.php?id=2964>



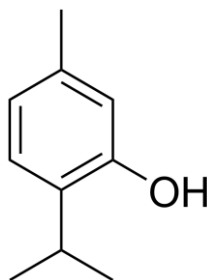
Obrázek 4: Lišejník (*Flavoparmelia capelata*), zdroj kyseliny usnové

<http://www.geograph.org.uk/photo/1155285>

1.3.1.1 THYMOL

Thymol se řadí mezi fenolické monoterpeny (Bakkali *et al.*, 2008). Jedná se o krystalickou látku s charakteristickým zápachem po kafru, slabě rozpustnou ve vodě, ve které vytváří emulzi. Lépe se rozpouští v polárních rozpouštědlech ethanolu a etheru, v zásaditých roztocích, parafínovém oleji a glycerolu. Ve vyšších koncentracích dráždí pokožku a sliznice (Elisondo *et al.*, 2008; Lee, 2008; Bassolé *et al.*, 2012). Jeho antimikrobiální aktivita spočívá ve schopnosti poškodit cytoplazmatickou membránu mikrobů ovlivněním jejího potenciálu, což vede k úniku iontů a živin a následné smrti bakteriální buňky (Gill *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; García-García *et al.*, 2011).

Thymol se vyskytuje v silicích mnoha rostlin v různých koncentracích. Jmenovitě v mateřídoušce obecné (*Thymus serpyllum*), tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*), dobromyslu obecném (*Origanum vulgare*) a v jiných rostlinách (Nikolić *et al.*, 2014; Guarda *et al.*, 2011). Složení silice z *Thymus serpyllum* a *Thymus vulgaris* zjišťovali Nikolić *et al.* (2014). Autoři provedli analýzu silice metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Thymol byl v jednotlivých silicích zastoupen v 39 %, respektive 49 %.



Obrázek 5: Strukturální vzorec thymolu [1]

Název dle IUPAC: 5-methyl-2-propan-2-ylphenol

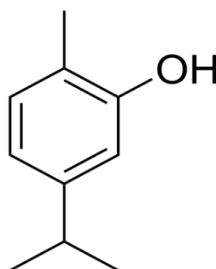
Molekulová hmotnost: 150,22 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄O

Antimikrobiální účinky thymolu jsou dobře známy a konkrétní hodnoty účinných koncentrací udává poměrně rozsáhlé množství odborných publikací. Thymol působí na bakterie, kvasinky i plísně (Nostro *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009). Diluční metodou stanovili minimální inhibiční koncentraci (MIC) pro referenční kmeny *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) 140 µg.ml⁻¹ a *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) 385 µg.ml⁻¹ Lambert *et al.* (2001). Inhibiční účinky thymolu rozpouštěného ve 25% DMSO ověřovali Demirci *et al.* (2007). Růst meticilin-rezistentních kmenů *St. aureus* (MRSA) byl potlačen koncentrací 250 µg.ml⁻¹. MIC pro *Ps. aeruginosa* přesahovala 500 µg.ml⁻¹. U rezistentních kmenů *St. aureus* zjišťovali Palaniappan *et al.* (2010) citlivost k thymolu, rozpuštěnému ve 25% ethanolu. Mikrodiluční metodou v Mueller Hintonově bujónu (MHB) stanovili účinnou koncentraci 188 µg.ml⁻¹. Zarrini *et al.* (2010), zjišťovali MIC thymolu mikrodiluční metodou. *St. aureus*, *Bacillus cereus* a *Ps. aeruginosa* byly inhibovány thymolem v koncentracích 200, 100 a 400 µg.ml⁻¹. Ve studii Nostro *et al.* (2004) jsou uvedeny podobné účinky thymolu pro *St. aureus*. Výsledky dokumentují široké spektrum účinku thymolu na bakterie. Thymol se rovněž vyznačuje významnými antioxidačními účinky (Esmaeili *et al.*, 2012).

1.3.1.2 KARVAKROL

Karvakrol se podobně jako thymol řadí mezi fenolické monoterpeny (Bakkali *et al.*, 2008). Karvakrol je regioizomer thymolu. Jedná se o viskózní nahnědlou kapalinu, která se špatně rozpouští ve vodě za vzniku emulze. Je dobře rozpustný v ethanolu a etheru. Karvakrol může ve vyšších koncentracích vyvolat mírné podráždění sliznic (Klein *et al.*, 2014).



Obrázek 6: Strukturální vzorec karvakrolu [2]

Název dle IUPAC: 2-methyl-5-propan-2-ylphenol

Molekulová hmotnost: 150,22 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄O

Antimikrobiální aktivita karvakrolu je podobně jako u thymolu zaměřena na porušení integrity cytoplazmatické membrány bakteriálních buněk, což vede ke změně její permeability s následným únikem iontů a živin (Butnariu *et Bostan*, 2011). U karvakrolu byly také *in vitro* prokázány antikarcinogenní účinky (Zotti *et al.*, 2013).

Zdrojem silice s obsahem karvakrolu je dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), různé druhy mateřídoušky (*Thymus* sp.) a jiné aromatické byliny (Nikolić *et al.*, 2014; Siroli *et al.*, 2014). Siroli *et al.* (2014) ve své studii stanovili množství karvakrolu na 29 % v silici z *Origanum vulgare*. Obsah karvakrolu v silicích z *Thymus* sp. je mnohem nižší (Nikolić *et al.*, 2014). Vyšší koncentrace (62 %) karvakrolu je však dle Monzote *et al.* (2009) v silici z merlíku vonného (*Chenopodium ambrosioides*).

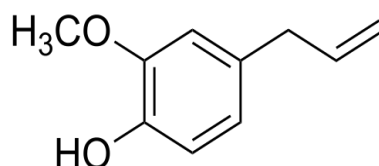
Karvakrol podobně jako thymol dobře účinkuje na bakterie, kvasinky a plísně. Veldhuizen *et al.* (2006) publikovali hodnoty MIC a minimální baktericidní koncentrace (MBC) karvakrolu pro *St. aureus* 1700 µg.ml⁻¹ a 1800 µg.ml⁻¹, MIC a MBC pro *Escherichia coli* (*E. coli*) 1200 µg.ml⁻¹ a 1800 µg.ml⁻¹. Autoři Soković *et al.* (2010) stanovili hodnotu MIC 500 µg.ml⁻¹ pro *Ps. aeruginosa*. Gutiérrez-Fernández *et al.* (2013a) uvedli MIC v rozmezí 600 – 800 µg.ml⁻¹ pro *E. faecalis*.

Zajímavých výsledků dosáhli Wong *et al.* (2008), kteří uvedli inhibiční koncentraci karvakrolu pro *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 72,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Autoři Fadli *et al.* (2012) ve své práci prokázali synergický účinek karvakrolu ve směsi s některými antibiotiky. Hodnoty MIC antibiotik byly v přítomnosti karvakrolu sníženy u gramnegativních bakterií čtyřikrát, u grampozitivních 8 – 16krát.

1.3.1.3 EUGENOL

Eugenol se řadí mezi aromatické fenoly, fenylypropanoidy. Jedná se o kapalnou viskózní látku nažloutlé barvy, jež se hůře rozpouští ve vodě za vzniku emulze. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Eugenol může vyvolat ve vyšších koncentracích krátkodobé podráždění sliznic (Klein *et al.*, 2014). Mechanismus účinku eugenolu je podobný jako u předchozích sloučenin. Eugenol se vyskytuje ve vysoké koncentraci v silici z poupěte hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*, syn. *Eugenia caryophyllata*), dále v muškátovém oříšku (*Myristica fragrans*) či bobkovém listu (*Laurus nobilis*) a v jiných rostlinách (Miller *et Hawthorne*, 2000; Bassolé *et al.*, 2010).

Složením silice ze *Syzygium aromaticum* se zabývali Machado *et al.* (2012). Autoři provedli analýzu silice metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a zjistili procentuální zastoupení eugenolu 85 %, z čehož je zřejmé, že eugenol v silici z této rostliny převládá.



Obrázek 7: Strukturální vzorec eugenolu [3]

Název dle IUPAC: 2-methoxy-4-prop-2-enylphenol

Molekulová hmotnost: 160,20 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$

Mimo antibakteriální vlastnosti jsou u eugenolu publikovány antivirové, antifungální i antiparazitární účinky (Devi *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2012; Darvishi *et al.*, 2013). Další významnou vlastností je výrazná antioxidační aktivita spočívající ve schopnosti eugenolu inhibovat oxidaci lipidů. Eugenol je také známý pro protizánětlivé účinky (Ogata *et al.*, 2000;

Qiu *et al.*, 2010). Pro své charakteristické vlastnosti je využíván v kosmetickém průmyslu nebo jako ochucovadlo (Devi *et al.*, 2010).

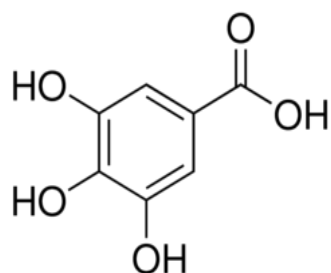
U eugenolu byly potvrzeny antibakteriální účinky na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Hodnoty účinných koncentrací, které publikovali Palaniapan *et Holley* (2010) byly 410 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* a *St. aureus*, pro *Streptococcus pyogenes* byla hodnota MIC ještě nižší. Tippayatun *et Chonhenchob* naopak uvádějí pro *St. aureus* účinnou koncentraci téměř dvakrát vyšší. Dle studií Medina *et al.* (2009) a Joshi (2013) eugenol inhiboval *Ps. aeruginosa* v rozmezí koncentrací 1200 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Autoři práce Walsh *et al.* (2003) ověřovali inhibiční účinky eugenolu na *E. coli* a *St. aureus*. U *E. coli* byl růst potlačen při koncentraci 533 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u *St. aureus* při koncentraci 1067 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.3.1.4 KYSELINA GALLOVÁ

Kyselina gallová je přírodní fenolická sloučenina dobře rozpustná ve vodě i v polárních organických rozpouštědlech. Jedná se o světle hnědou krystalickou látku bez výrazného zápachu. Dle autorů Niho *et al.* (2001), kyselina gallová podávaná delší dobu perorálně ve vyšších koncentracích způsobuje anémii a hypertrofii hepatocytů. Uvedená látka se vyskytuje v mnoha léčivých rostlinách většinou v konjugované formě, běžně označované jako třísloviny, taniny, kyselina tříslová, apod. Typicky se vyskytuje v kůře různých druhů dubů (*Quercus* sp.), kůře habru, černém i zeleném čaji, chmelu, granátových jablkách a v dalších rostlinách a plodech (Niho *et al.*, 2001; Palabhanvi *et Belur*, 2013).

U kyseliny gallové byly potvrzeny antimikrobiální účinky, tato sloučenina se však vyznačuje mnoha dalšími vlastnostmi, z kterých lze jmenovat zejména antioxidační aktivitu a to i v kyselém prostředí žaludeční šťávy, dále protizánětlivé a protirakovinné účinky (Niho *et al.*, 2001; Yilmaz *et Toledo*, 2004).

Antibakteriální účinky na *St. aureus*, včetně MRSA kmenů ověřovali Chusri *et Voravuthikunchai* (2011). Autoři zjistili, že kyselina gallová působila inhibičně i baktericidně na uvedené kmeny při koncentraci 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Al-Zahrani (2012) uvedl ještě nižší hodnoty inhibičních koncentrací 3,5 – 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Významné je i zjištění účinnosti kyseliny gallové proti kmenům *Ps. aeruginosa*, které jsou známy svou přirozenou rezistencí k celé řadě antibiotik. Binutu *et Cordell* (2000) zjistili MIC 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro kmeny *Ps. aeruginosa*.



Obrázek 8: Strukturní vzorec kyseliny gallové [4]

Název dle IUPAC: 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina

Molekulová hmotnost: 170,12 g.mol⁻¹

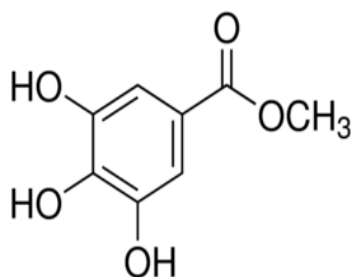
Sumární vzorec: C₇H₆O₅

Diluční mikrometodou zjistili Kang *et al.* (2008) hodnoty MIC 8000 µg.ml⁻¹ u *Str. mutans* a *Lactobacillus casei*. Druh *Actinomyces viscosus* byl inhibován kyselinou gallovou v množství 4000 µg.ml⁻¹, *Lactobacillus acidophilus* vyrůstal i v médiu obsahujícím 8000 µg.ml⁻¹.

Estery kyseliny gallové, galláty jsou všeobecně považovány za antioxidanty, nicméně jejich bakteriostatické i baktericidní účinky byly potvrzeny již v roce 1953 ve studii autorů Johnston *et Little* (1953). Autoři prokázali inhibiční účinky ethyl-gallátu a propyl-gallátu na původce tuberkulózy - *Mycobacterium tuberculosis*. Nejedná se o sloučeniny příliš toxické pro člověka, mohou však při častém styku s kůží způsobovat kontaktní dermatitidu (Van der Heijden *et al.*, 1986).

1.3.1.5 METHYL-GALLÁT

Methyl-gallát je přírodní sloučenina, nacházející se v extraktu z *Galla rhois*, což je termín pro onemocnění listů rostliny *Rhus javanica* způsobené mšicemi (Ahn *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2008). Dále se tato látka vyskytuje v česnekovníku čínském (*Toona sinensis*), listech kožokvětu lojonosného (*Sepium sebiferum*) a dalších rostlinách (Hsieh *et al.*, 2004). Methyl-gallát je hůře rozpustný ve vodě (10,6 g.l⁻¹ při 25°C), rozpustnost stoupá se zvyšující se teplotou (Lu *et Lu*, 2007). U uvedené látky byly potvrzeny antibakteriální i antifungální vlastnosti (Choi *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2005).



Obrázek 9: Strukturální vzorec methyl-gallátu [5]

Název dle IUPAC: methyl-3,4,5-trihydroxybenzoát

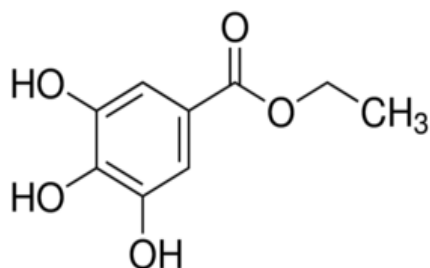
Molekulová hmotnost: 184,15 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₈H₈O₅

Antibakteriální aktivita methyl-gallátu byla prokázána vůči bakteriím podílejícím se na vzniku zubního kazu, tzv. kariogenním bakteriím, mezi které patří viridující streptokoky aktinomycety a laktobacily (Choi *et al.*, 2009). Choi *et al.* (2014) ve své publikaci uvádějí hodnoty MIC methyl-gallátu v rozmezí 3,9 – 125 mg.l⁻¹ proti častým původcům průjmovitých onemocnění. Pro původce tyfu, *Salmonella Typhi* zjistili hodnotu MIC methyl-gallátu 3,9 µg.ml⁻¹. Antibakteriální účinky potvrdili i proti *E. coli* a *Klebsiella oxytoca* s hodnotami MIC 250 µg.ml⁻¹ a 1000 µg.ml⁻¹. Uvedení autoři rovněž zaznamenali synergické účinky methyl-gallátu s vybranými antibiotiky proti některým druhům čeledi *Enterobacteriaceae*. Kane *et al.* (1988) potvrdili antivirové působení uvedené látky *in vitro* proti herpes simplex viru, typ 2.

1.3.1.6 ETHYL-GALLÁT

Ethyl-gallát je o něco hůře rozpustný ve vodě ve srovnání s methyl-gallátem. Jeho rozpustnost činí dle studie Wan *et Hwang* (1969) 9,9 g.l⁻¹ při 25°C. Uvedená látka je obsažena v trnech dřezovníku (*Gleditsia sinensis*) nebo v kořenech pivoňky balkánské (*Paeonia peregrina*), pivoňky úzkolisté (*Paeonia tenuifolia*) a v jiných rostlinách (Ivanova *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007).

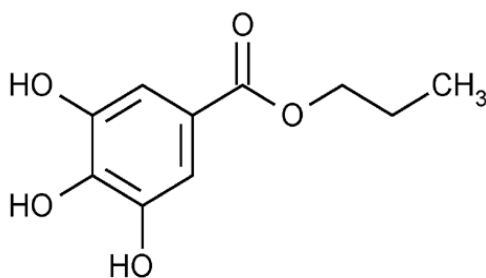


Obrázek 10: Strukturní vzorec ethyl-gallátu [6]
 Název dle IUPAC: ethyl-3,4,5-trihydroxybenzoát
 Molekulová hmotnost: 198,17 g.mol⁻¹
 Sumární vzorec: C₉H₁₀O₅

Jedná se o sloučeninu, jejíž antibakteriální účinky jsou stále ve stádiu výzkumu. Zhou *et al.* (2007) uvádějí poměrně vysokou hodnotu MIC 1000 µg.ml⁻¹ pro *Bacillus subtilis*. Na druhou stranu byla zjištěna schopnost ethyl-gallátu zvyšovat citlivost MRSA kmenů k beta-laktamovým antibiotikům (Shibata *et al.*, 2005).

1.3.1.7 PROPYL-GALLÁT

Propyl-gallát je hůře rozpustný ve vodě než předchozí dva estery. Jeho rozpustnost ve vodě při 25°C činí 3,5 g.l⁻¹ (Jacobsen *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2007). Dobře se rozpouští v běžných rozpouštědlech, například v N,N-dimethylformamidu či methanolu (Kubo *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009).



Obrázek 11: Strukturní vzorec propyl-gallátu [7]
 Název dle IUPAC: propyl-3,4,5-trihydroxybenzoát
 Molekulová hmotnost: 212,20 g.mol⁻¹
 Sumární vzorec: C₁₀H₁₂O₅

Tato látka je podobně jako ostatní galláty považována za antioxidační agens, antibakteriální účinky však byly také potvrzeny. Nejcitlivější k účinkům propyl-gallátu jsou dle studie Kubo *et al.* (2001) *Streptococcus mutans* a *Proteus vulgaris*, autoři zjistili hodnotu MIC $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro oba bakteriální druhy. Pro druhy *Ps. aeruginosa*, *E. coli* a *St. aureus*, které jsou častými původci banálních i závažných infekčních onemocnění, zjistili autoři hodnoty účinných koncentrací $3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

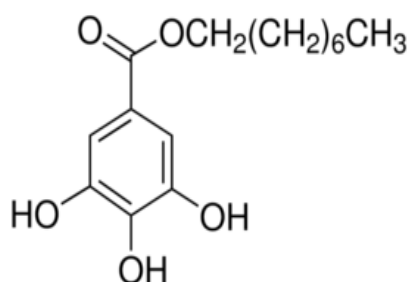
1.3.1.8 OKTYL-GALLÁT

Oktyl-gallát patří rovněž do skupiny alkyl-gallátů neboli esterů kyseliny gallové. Uvedená látka je špatně rozpustná ve vodě ($0,02 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), lépe se rozpouští v ethanolu, methanolu nebo etheru (Lu *et al.*, 2007). Na rozdíl od ostatních přírodních látek se jedná o syntetický derivát, nicméně v recentní studii autorů Latha *et al.* (2013) byla zjištěna přítomnost oktyl-gallátu v plodech vrcholáku myrobalánového (*Terminalia bellerica*). Tato skutečnost řadí oktyl-gallát mezi přírodní látky.

Uvedená látka vešla ve známost zejména pro své antioxidační účinky, jež byly prvně zaznamenány na konci 40. let 20. století. Významná je antimikrobiální aktivita oktyl-gallátu vůči gram pozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním (Kubo *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2014). Zaznamenány byly účinky vůči DNA i RNA virům (Uozaki *et al.*, 2007). V některých studiích byl zmíněn selektivní cytotoxický účinek oktyl-gallátu na nádorové buňky (Fiuza *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2007).

Mechanismus účinku podobně jako u ostatních látek spočívá ve schopnosti dezintegrovat cytoplazmatickou membránu mikroorganismů, což je dáno dílem hydrofobní části – alkylovým řetězcem molekuly a dílem hydrofilní části, tedy hydroxylovými skupinami molekuly oktyl-gallátu (Kubo *et al.*, 2004).

Autoři práce Kubo *et al.* (2001) zjistili vyšší účinnost oktyl-gallátu na gram pozitivní bakterie oproti jiným gallátům, například propyl-gallátu. Ve své publikaci uvedli hodnoty MIC pro *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *St. aureus* a MRSA $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respektive $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Gutiérrez-Larraínzar *et al.* (2013b) také potvrdili silné účinky oktyl-gallátu proti kmenům *St. aureus* s rozmezím hodnot MIC 6,3 – $29,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obrázek 12: Strukturální vzorec oktyl-gallátu [8]

Název dle IUPAC: oktyl-3,4,5-trihydroxybenzoát

Molekulová hmotnost: 282,34 g.mol⁻¹

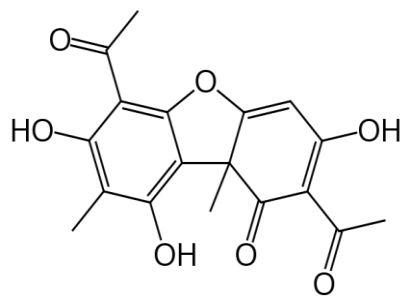
Sumární vzorec: C₁₅H₂₂O₅

Tato látka působí účinně i proti gramnegativním bakteriím, nicméně v mnohem vyšších koncentracích. Kubo *et al.* (2001) zjistili hodnoty MIC vyšší než 800 µg.ml⁻¹ pro *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* a *Ps. aeruginosa*, je však zajímavé, že pro některé jiné gramnegativní bakterie, zejména pro *Salmonella cholerasuis* a *Proteus vulgaris* uvedli mnohem nižší hodnoty MIC, a to 12,5 µg.ml⁻¹ a 25 µg.ml⁻¹.

1.3.1.9 KYSELINA USNOVÁ

Kyselina usnová je jedním z derivátů dibenzofuranu (Ingólfssdóttir, 2002). Jedná se o látku slabě rozpustnou ve vodě, rozpustnost činí méně než 0,1 g.l⁻¹ při 25°C za standardních podmínek (Kristmundsdóttir *et al.*, 2002; Segura-Sanchez *et al.*, 2009). Dobře se rozpouští v ethyl-acetátu, acetonu, n-hexanu a ethanolu (Jin *et al.*, 2013).

Kyselina usnová se na rozdíl od výše uvedených sloučenin pocházejících z rostlin nachází v lišejnících rodu *Cladonia*, *Usnea*, *Alectoria* a *Parmelia*. Lišejníky jsou vlákna hub (mykobiont) a buňky sinic či řas (fotobiont) žijící v mutualistickém neboli těsném symbiotickém vztahu (Cardarelli *et al.*, 1997; Ingólfssdóttir, 2002; Ranković *et al.*, 2008). Poprvé byla tato látka izolována v roce 1844 (Ingólfssdóttir, 2002). Kyselinu usnovou extrahovali metodou kapalinové chromatografie z různých částí lišejníku *Usnea longissima* Odabasoglu *et al.* (2006) s výtěžkem 1 %.



Obrázek 13: Strukturní vzorec kyseliny usnové [9]

Název dle IUPAC: 2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyldibenzofuran-1,3-dion

Molekulová hmotnost: 344,32 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆O₇

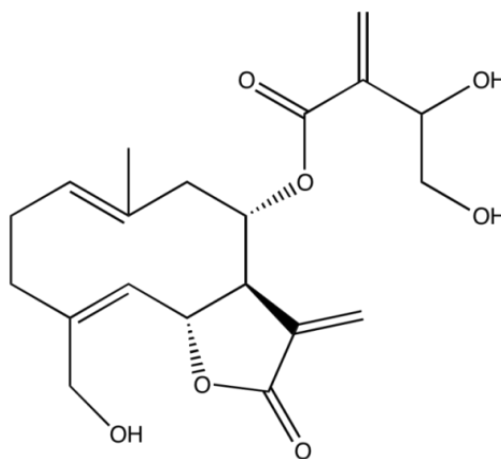
Vlastnosti uvedené sloučeniny byly intenzivně studovány zejména v 50. letech 19. století. Byl zjištěn především antimikrobiální účinek proti grampozitivním bakteriím. Tato látka byla proto přidávána do krémů či zubních past jako konzervans (Cocchieto *et al.*, 2002; Hoskeri *et al.*, 2010). Vzácně může způsobit podrážení kůže či kontaktní dermatitidu (Ingólfssdóttir, 2002). Ve vyšších koncentracích může působit hepatotoxicky ovlivněním funkce mitochondrií hepatocytů následkem inhibice oxidativní fosforylace (Han *et al.*, 2004). Byly také potvrzeny antioxidační, antivirové a protizánětlivé účinky (Cocchieto *et al.*, 2002).

Mechanismus antimikrobiálního účinku kyselina usnové pravděpodobně spočívá ve schopnosti porušit bakteriální cytoplazmatickou membránu (Gupta *et al.*, 2012). Studie zabývající se antimikrobiálními vlastnostmi této sloučeniny poukazují na účinky proti grampozitivním bakteriím, mykobakteriím, některým druhům kvasinek a plísní (Cocchieto *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2004). Lucarini *et al.* (2012) ve svém sdělení uvedli hodnoty MIC pro *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium avium* 8 µg.ml⁻¹, 8 µg.ml⁻¹, respektive 16 µg.ml⁻¹. Elo *et al.*, (2007) zjistili rozmezí hodnot MIC 3,9 – 16 µg.ml⁻¹ na kmeny enterokoků rezistentních k vankomycinu. Ranković *et al.* (2008) zaznamenali hodnotu MIC 15 µg.ml⁻¹ pro *St. aureus*. Tato látka však vykazuje pouze bakteriostatické účinky, nikoliv baktericidní. Růst gramnegativních bakterií inhibuje ve velmi vysokých koncentracích (Lauterwein *et al.*, 1995).

1.3.1.10 KNICIN

Knicin patří mezi seskviterpenové laktony, germakranolidy (Opletal *et al.*, 2007). Jedná se o látku hořké chuti vyskytující se například v benediktu lékařském (*Cnicus benedictus*) nebo

v chrpě rozkladité (*Centaurea diffusa*), poprvé izolovanou v roce 1837 (Opletal *et* Šimerda, 2005; Schabes *et* Sigstad, 2007; Vanhaelen-Fastre, 1972). Knicin izoloval metodou kapalinové chromatografie ve své práci prof. Opletal z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (nepublikovaná data) s výtěžkem 0,065 %. Na rozdíl od sloučenin uvedených výše je izolace knicinu pro malé výtěžky značně finančně nákladná, cena za 1 g se v závislosti na čistotě pohybuje řádově v desítkách až stovkách tisíc korun. Knicin není tak známou přírodní látkou jako sloučeniny předešlé, omezený počet publikací poukazuje na významné antimikrobiální a mírné protizánětlivé účinky (Mascolo *et al.*, 1987; Meepagala *et al.*, 2006). Rovněž nebyly zjištěny žádné významné toxické účinky knicinu pro člověka (Meepagala *et al.*, 2006).



Obrázek 14: Strukturní vzorec knicinu [10]

Název dle IUPAC: [(3aR,4S,6E,10Z,11aR)-10-(hydroxymethyl)-6-methyl-3-methyliden-2-oxo-3a,4,5,8,9,11a-hexahydrocyklodeka[b]furan-4-yl](3S)-3,4-dihydroxy-2-methylidenbutanoát

Molekulová hmotnost: 378,42 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₂₀H₂₆O₇

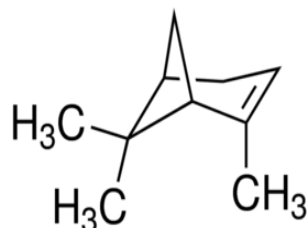
Knicin má mezi přírodními látkami pocházejících z rostlin i ve srovnání s ostatními zde uvedenými sloučeninami unikátní mechanismus účinku na bakterie. Dle studií Bugg *et al.* (2011) a Bachelier *et al.* (2006) totiž knicin blokuje biosyntézu buněčné stěny bakterií prostřednictvím inhibice bakteriálního enzymu MurA, což je enzym účastnící se biosyntézy peptidoglykanu. Peptidoglykan je nezbytný pro biosyntézu buněčné stěny bakterií. Podobný mechanismus účinku na bakterie má antibiotikum fosfomycin (Falagas *et al.*, 2010; Bugg *et al.*, 2011). Nicméně počet dostupných publikací s uvedenými výsledky účinných

koncentrací na bakterie je velmi omezený. Autoři studie Mazurová *et al.* (2007) zaznamenali hodnoty MBC knicinu 300 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 600 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proti kmenům *Ps. aeruginosa* a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

1.3.1.11 PINENY

Pineny mají dva aktivní konstituční izomery, alfa a beta, každý izomer má navíc ještě dva enantiomery známé jaké (-)- α -pinen (výskyt spíše u evropských borovic) a (+)- α -pinen (výskyt spíše u borovic v Severní Americe). β -pinen má dva enantiomery (-)- β -pinen a (+)- β -pinen. Racemické směsi těchto látek se vyskytují v některých silicích, například v eukalyptové. Antimikrobiální účinky pinenů byly prokázány zejména u (+)-enantiomerů, které působí antifungálně a slabě antibakteriálně (Da Silva *et al.*, 2012).

Alfa-pinen se řadí mezi nenasycené bicyklické uhlovodíky ze skupiny monoterpenů. Sloučenina samotná je bezbarvá olejovitá kapalina, dobře rozpustná v ethanolu, chloroformu nebo etheru, špatně rozpustná ve vodě. Pro svou charakteristickou vůni se používá v parfumerii či farmaceutických materiálech (Kamali *et Mousavi*, 2008). Uvedená sloučenina se vyskytuje v pryskyřici borovic, ale i v silicích z různých druhů pelyňku (*Artemisia* sp.), kde její koncentrace kolísá mezi 0,2 – 10 %. Dále se vyskytuje také v rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*) a v dalších bylinách (Lopez-Lutz, 2008).



Obrázek 15: Strukturní vzorec α -pinenu [11]

Název dle IUPAC: 4,6,6-trimethylbicyklo[3.1.1]hept-3-en

Molekulová hmotnost: 136,24 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

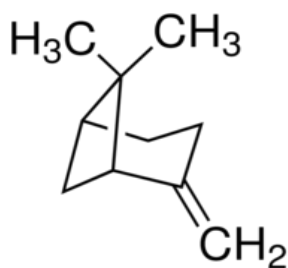
Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$

Alma *et al.* (2003) provedli analýzu silice z dobromysli syrské (*Syrian oreganum*) metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a zjistili, že silice obsahovala 1 % α -pinenu. Destilací vodní parou extrahovali Atti-Santos *et al.* (2005) silici z rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) a zjistili, že hlavní složkou byl α -pinen (41 – 45%), dále 1,8-cineol

a kafr. Ostatní sloučeniny byly zastoupeny v menším množství (<2 %). V silici z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) zjistili Imelouane *et al.* (2009) metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí 9 % α -pinenu. Demirci *et al.* (2002) zjišťovali složení silice získané z druhu šalvěže (*Salvia cryptantha*). Jednotlivé složky identifikovali metodou plynové chromatografie. Mezi hlavní patřily 1,8-cineol (16 – 37%) a kafr (6 – 13%), α -pinen se vyskytoval v rozmezí 1 – 12 %.

In vitro působí α -pinen antibakteriálně na stafylokoky, na beta-hemolytické i viridující streptokoky, kmeny *Ps. aeruginosa*, *E. coli* i některé druhy kvasinek (Leite *et al.*, 2007; Imelouane *et al.*, 2009). Přesný mechanismus antimikrobiálního účinku pinenu není zcela objasněn. Předpokládá se však, že podobně jako ostatní monoterpenické přírodní sloučeniny zasahuje do funkce bakteriální buněčné membrány. Díky svému lipofilnímu charakteru tyto látky mohou do membrány proniknout, což vede k jejímu nadměrnému rozšíření a zvýšené propustnosti negativně ovlivňující transportní procesy. Výše uvedené skutečnosti mohou vést ke ztrátě důležitých látek, rozvratu metabolismu a smrti mikroorganismu (Dhar *et al.*, 2014). Dále bylo zjištěno, že tato sloučenina u kvasinek inhibuje funkci respiračního řetězce ovlivněním mitochondrií.

β -pinen je bezbarvá olejovitá kapalina, páchnoucí po terpentýnu, prakticky nerozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v ethanolu a etheru. Stejně jako α -pinen je obsažen především v rostlinách s charakteristickou vůní. Kelen *et al.* (2008) zjišťovali chemické složení metodou plynové chromatografie silice ze šalvěže *Salvia aucheri*. β -pinen byl zastoupen v 10 %. Imelouane *et al.* (2009) zjistili v silici z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) pouze 4 % β -pinenu, hlavní složku tvořil kafr (39 %).



Obrázek 16: Strukturní vzorec β -pinenu [12]

Název dle IUPAC: 6,6-dimethyl-4-methylidenbicyklo [3.1.1]heptan

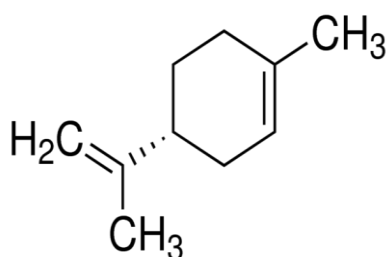
Molekulová hmotnost: 136,24 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₆

Antibakteriální aktivita je podobná α -pinenu. Beta-pinen inhibuje růst stafylokoků a streptokoků, dále střevních bakterií. Zaznamenány byly také antifungální účinky proti kmenům *Candida albicans* (Filipowicz *et al.*, 2003). U uvedené sloučeniny byla zjištěna aktivita proti herpetickým virům (Astani *et Schnitzler*, 2014).

1.3.1.12 LIMONEN

Limonen je bezbarvá kapalná látka slabě rozpustná ve vodě (13,8 g/l při 25°C), dobře v acetonu, DMSO a ethanolu. Historicky se limonen používal jako rozpouštědlo žlučových kamenů. Je také používán jako detergent a rozpouštědlo olejů (Tamura *et al.*, 2009). Vyskytuje se ve dvou opticky aktivních formách, L-limonen a D-limonen. Enantiomery limonenu jsou jedny z nejhojnějších a zároveň nejstudovanějších monocyklických monoterpenů vyskytujících se v přírodě. Enantiomery se liší jak účinkem, tak i vůní a místem výskytu. L-limonen má charakteristickou vůni po borovicích a nachází se v různých druzích máty (*Mentha* sp.), kdežto D-limonen je cítit po pomerančích, nachází se zejména v silici z kůry některých citrusů a v silicích kmínu nebo kopru. V silici z divokého pomeranče (*Citrus aurantium*) a citronu (*Citrus limon*) byl jeho obsah stanoven na 90 % a 60 % (Soković *et al.*, 2010).



Obrázek 17: Strukturální vzorec D-limonenu [13]

Název dle IUPAC: 1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyklohexen

Molekulová hmotnost: 136,24 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₆

Biologické účinky limonenu spočívají především v ochraně rostlin a jejich plodů před dehydratací a napadením mikroorganismy (Duetz *et al.*, 2003). Limonen vykazuje antibakteriální, antivirové a antifungální účinky. Některé studie popisují proti rakovinové účinky uvedené sloučeniny (Wargowich, 2000). Cimanga *et al.* (2002) zjišťovali antibakteriální aktivitu esenciálních olejů z rostlin rodu *Eucalyptus*, *Aframomum*,

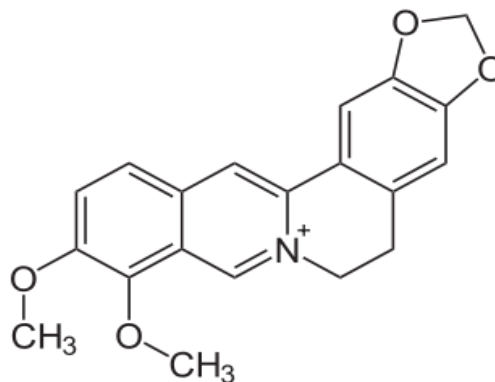
Cymbopogon, *Monodora* a *Ocimum*, zastoupení jednotlivých složek stanovili plynovou chromatografií s hmotností detekcí a prokázali, že limonen patří mezi jejich hlavní komponenty s antibakteriálním účinkem.

Sonboli *et al.* (2006) prokázali mikrodiluční metodou účinnost limonenu na bakteriální druhy *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *St. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (*St. epidermidis*), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*Kl. pneumoniae*) a *Ps. aeruginosa*. Hodnoty MIC pro uvedené druhy se pohybovali v rozmezí 4400 – 36,8x10³ µg.ml⁻¹. Podobné hodnoty MIC u obou enantiomerů limonenu zjistili autoři studie Van Vuuren *et* Viljoen (2007) mikrodiluční metodou u 4 gram pozitivních a 4 gram negativních bakterií. Hodnoty MIC pro D-limonen byly v rozmezí 3000 – 27x10³ µg.ml⁻¹ a pro L-limonen 2000 – 27,0x10³ µg.ml⁻¹. Astani *et* Schnitzler (2014) poukazují na účinky limonenu proti herpetickým virům.

Mechanismus antimikrobiálního účinku limonenu není zatím detailně objasněn. Podobně jako u pinenů je popisována jeho schopnost inhibovat funkci respiračního řetězce mitochondrií kvasinek (Carson *et al.*, 2002; Duetz *et al.*, 2003).

1.3.1.13 BERBERIN

Berberin se řadí mezi izochinolinové alkaloidy protoberberinové třídy. Jedná se o žlutou krystalickou látku téměř bez zápachu (Gao *et al.*, 1987; Iwasa *et al.*, 1996; Battu *et al.*, 2010) nacházející se v různých druzích dřevitých rostlin. Významnými zdroji berberinu jsou dřevitá osinatá a dřevitá obecná (*Berberis aristata*, *Berberis vulgaris*), v jejich kořenové kůře je obsaženo asi 1 – 5 % berberinu, v nadzemních částech tohoto keře je berberinu výrazně méně. Právě z dřevitých rostlin se berberin získává nejčastěji. Uvedená sloučenina se také nachází v koptisu čínském (*Coptis chinensis*), kde je obsažena v poměrně vysoké koncentraci 4 – 8 %. Dále je obsažen také v rostlině *Chelidonium majus* neboli vlaštovičníku větším (Moravcová, 2003; Singh *et al.*, 2010). Berberin je rozpustný v methanolu, slabě rozpustný v ethanolu a špatně rozpustný ve vodě, jeho soli jsou rozpustné lépe (Battu *et al.*, 2010).



Obrázek 18: Strukturální vzorec berberinu [14]

Název dle IUPAC: 9,10-dimethoxy-5,6-dihydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isochinolino[3,2-a]isochinolin-7-ium

Molekulová hmotnost: 336,37 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₂₀H₁₈NO₄⁺

Biologické účinky uvedené sloučeniny jsou velmi pestré. V minulosti byly rostliny obsahující berberin používány v čínské a folklorní medicíně, kde se nejčastěji používali ve formě chloridů nebo síranů hlavně k léčbě infekcí kůže a oka. Berberin má antibakteriální účinky a v Japonsku je používán při infekčních onemocněních trávicího traktu (Iwasa *et al.*, 1996). Antibakteriální účinky byly také prokázány proti mnoha druhům střevních bakterií, dále streptokokům, stafylokokům a chlamydiím. Studie dle Stermitze *et al.* (2000) dokládá účinnost berberinu v kombinaci s 5-methoxyhydno-karpinem na *St. aureus*. Uvedená sloučenina působí proti některým kvasinkám a jednobuněčným parazitům: trypanozomám a plazmodiím.

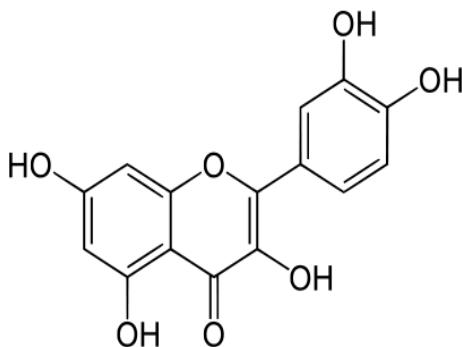
Byly také zjištěny antivirové účinky berberinu. Dále byla prokázána antitumorová aktivita u myši, cytotoxická aktivita proti lidským rakovinovým buňkám a inhibice biosyntézy dopaminu. Mezi dalšími lze jmenovat protizánětlivé, antioxidační, antihypertenzivní, antiarytmické a antihyperglykemické účinky (Lu *et al.*, 2006; Battu *et al.*, 2010).

Mechanismus účinku berberinu je přisuzován jeho schopnosti interkalovat do mikrobiální DNA (Cowan, 1999). Berberin je také schopný inaktivovat fibronektin a tím bránit adhezi některých bakterií, hlavně streptokoků, ke tkáním (Sun *et al.*, 2008).

1.3.1.14 KVERCETIN

Kvercetin je jedním z nejrozšířenějších flavonoidních aglykonů. Jedná se o krystalickou sloučeninu žluté barvy prakticky nerozpustnou ve vodě, slabě v ethanolu, dobře v methanolu

a acetonu (Murota *et* Terao, 2003). Vyskytuje se ve chmelu, čajovníku, česneku, plodech kaštanu a v mnoha jiných rostlinách (Moravcová, 2003).



Obrázek 19: Strukturní vzorec kvercetinu [15]

Název dle IUPAC: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-on

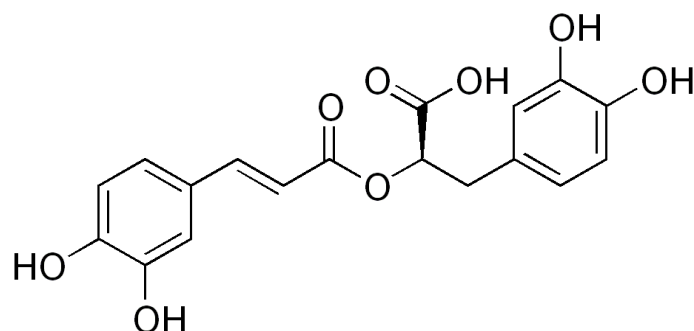
Molekulová hmotnost: 302,24 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₅H₁₀O₇

Antimikrobiální účinky kvercetinu prokázali ve své práci Vaquero *et al.* (2007). Autoři kvercetin rozpouštěli v ethanolu a agarovou difúzní metodou zjistili, že kvercetin dobře působí v koncentračním rozmezí 100 – 1000 µg.ml⁻¹ proti *Serratia marcescens*, *Kl. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* a *St. aureus*. Horší byla účinnost proti *Ps. aeruginosa*. Rauha *et al.* (2000) prokázali dobré antibakteriální účinky proti *St. aureus*, *St. epidermidis* a *Bacillus subtilis*. Antibakteriální aktivita proti *E. coli* a *Ps. aeruginosa* byla podle těchto autorů minimální.

1.3.1.15 KYSELINA ROZMARÝNOVÁ

Kyselina rozmarýnová se řadí mezi fenolické kyseliny. Tato krystalická látka hnědé až načervenalé barvy je hůře rozpustná ve vodě, lépe v ethanolu a v organických rozpouštědlech. Uvedená sloučenina se vyskytuje v různých rostlinách napříč čeleděmi hluchavkovité (*Laminaceae*), vochovité (*Zosteraceae*), dosnovité (*Cannaceae*), apod. Kyselinu rozmarýnovou pak obsahuje zejména rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*) a jiné rostliny. Uvedená sloučenina má mnoho zajímavých biologických účinků, mezi které se řadí antivirové, antibakteriální, protizánětlivé a antioxidační. Rostliny s obsahem kyseliny rozmarýnové jsou do určité míry chráněny proti rostlinným patogenům (Petersen *et* Simmonds, 2003).



Obrázek 20: Strukturální vzorec kyseliny rozmarýnové [16]

Název dle IUPAC: (2R)-2-[[[(2'E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]]oxy]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanová kyselina

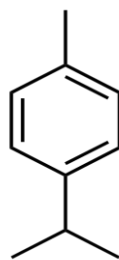
Molekulová hmotnost: 360,32 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆O₈

1.3.1.16 P-CYMEN

Sloučenina *p*-cymen je alkyl-substituovaný aromatický uhlovodík, hojně se vyskytující v rostlinách. Jedná se o bezbarvou kapalinu, obtížně rozpustnou ve vodě, ale dobře rozpustnou v 96% ethanolu a etheru.

Oke *et al.* (2009) analyzovali silici extrahovanou ze saturejky klínolisté (*Satureja cuneifolia*) plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí a zjistili, že obsahovala 22 % *p*-cymenu. Bassolé *et al.* (2010) zjistili, že *p*-cymen tvoří hlavní složku silice z listů čajovníku (*Lippia multiflora*), kde je zastoupen v množství 21 %.



Obrázek 21: Strukturální vzorec *p*-cymenu [17]

Název dle IUPAC: 1-methyl-4-propan-2-ylbenzen

Molekulová hmotnost: 134,21 g.mol⁻¹

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄

Princip mechanismu antimikrobiálního účinku na bakteriální buňky se podobně jako u ostatních přírodních látek odvíjí od schopnosti porušit cytoplazmatickou membránu. Autoři Ultee *et* Smid (2001) zjistili synergické působení *p*-cymenu s karvakrolem. Látka *p*-cymen poškozují membránu grampozitivních bakterií a tím umožňuje průnik karvakrolu do buňky a uplatnění jeho účinku. Gramnegativní bakterie mají navíc ještě vnější membránu, kterou *p*-cymen nijak neovlivňuje, synergické účinky se proto na gramnegativní bakterie neprojevují (Burt *et al.*, 2005).

Mikrodiluční metodou zjišťovali Cristani *et al.* (2007) inhibiční účinek *p*-cymenu na kmeny *St. aureus* a *E. coli*. Uvedení autoři zjistili, že *p*-cymen má větší inhibiční účinky na *St. aureus* než na *E. coli*. Hodnota MIC pro *St. aureus* byla 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro *E. coli* 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Autoři práce Filipowicz *et al.* (2003) prokázali antimikrobiální účinky proti *C. albicans*.

1.3.2 SILICE

Silice jsou těkavé, lipofilní, intenzivně vonící směsi přírodních sloučenin olejovité konzistence. Jsou těžko rozpustné ve vodě, v níž vytvářejí emulze. V organických rozpouštědlech se rozpouštějí dobře. Většinou jsou bezbarvé, ale během skladování na světle, ve vlhku, za tepla i v přítomnosti vzdušného kyslíku snadno oxidují a tmavnou (Moravcová, 2006). Některé silice jsou různě zbarveny. Přírodně žlutohnědá je hřebíčková silice, do modra nebo zelena jsou zbarveny silice obsahující azulen, např. heřmánková silice.

V rostlinných silicích jsou zastoupeny různé organické sloučeniny – uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery, oxidy nebo fenoly v různých koncentracích. Výjimečně dominuje pouze jedna složka nad ostatními, např. v hřebíčkové silici převládá eugenol v množství 70 - 90 %, v silici z byliny dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) thymol v 50 % (Bacílková *et* Paulusová, 2012).

U silic byla zjištěna antibakteriální, antivirová a antifungální aktivita. Jsou účinné také proti helmintům. Byly potvrzeny synergické účinky kombinace silic s antibiotiky (Opletal *et* Šimerda, 2005).

1.3.2.1 KMÍNOVÁ SILICE (*CARVI AETHEROLEUM*)

Kmínovou silici je možné extrahovat ze zralých semen kmínu kořenného (*Carum carvi*). Semena obsahují asi 3 – 7 % silice, která je bezbarvá až nažloutlá s charakteristickým zápachem po kmínu a těžce rozpustná ve vodě, lépe v ethanolu a etheru. Aktivními látkami,

které v kmínové silici převažují, jsou karvon (50 – 65 %) a limonen (až 45 %). Dalšími minoritními složkami jsou karveol, dihydrokarveol dále různé fenolické kyseliny a flavonoidy (Moravcová *et al.*, 2003; European Medicines Agency, 2014).

Schöne *et al.* (2006) ve své studii extrahovali kmínovou silici metodou destilace vodní parou a zjistili obsah limonenu 57 %, karvonu 42 %, myrcenu 0,6 % a beta-karophyllenu 0,1 %. Vzhledem ke špatné rozpustnosti je v odborné literatuře poměrně málo údajů o antimikrobiální aktivitě této silice. Iacobellis *et al.* (2005) zmiňují dobré účinky proti některým grampozitivním a gramnegativním bakteriím. De Rapper *et al.* (2013) zjistili hodnotu MIC kmínové silice pro *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* 2000 µg.ml⁻¹.

1.3.2.2 FENYKLOVÁ SILICE (*FOENICULI AETHEROLEUM*)

Fenyklová silice se získává ze zralých plodů fenyklu hořkého (*Foeniculum vulgare*) destilací vodní parou. Jedná se o bezbarvou nebo slabě nažloutlou kapalinu charakteristického zápachu. Tak jako většina silic je špatně rozpustná ve vodě a lépe rozpustná v ethanolu (Rather *et al.*, 2012).

Obě dvě silice, kmínová i fenyklová byly autory Schöne *et al.* (2006) zkoumány jako možná aditiva do krmiv pro selata. Uvedení autoři uvádí následující složení fenyklové silice získané destilací vodní parou: pineny 5 %, limonen 3 %, fenchon 22 %, estragol 2 % a anethol 62 %. Dadalioglu *et al.* (2004) analyzovali fenyklovou silici, zjistili vysoký obsah anetholu (83 %) a uvedli silnou antibakteriální aktivitu proti *E. coli* – sérotyp O157:H7, *St. aureus*, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) a *Salmonella enteritidis subsp. enteritidis* sérovar Typhimurium.

Fenyklová silice je *in vitro* účinná proti bakteriím, které mohou vyvolávat střevní infekce – *E. coli*, *Bacillus megaterium*, *St. aureus*, *L. monocytogenes* a *Campylobacter jejuni*. Byly také zaznamenány účinky vůči kvasinkám a vláknitým houbám rodu *Aspergillus*. Dále byly u fenyklové silice zjištěny antioxidační, protizánětlivé, hepatoprotektivní a další účinky (Rather *et al.*, 2012). De Rapper *et al.* (2013) zjistili hodnoty MIC fenyklové silice pro *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* 2000 µg.ml⁻¹, 3000 µg.ml⁻¹ a 2000 µg.ml⁻¹.

1.3.2.3 LEVANDULOVÁ SILICE (*LAVANDULAE AETHEROLEUM*)

Levandulová silice se získává z kvetoucích vrcholů *Lavandula angustifolia* a jiných druhů levandule metodou destilace vodní parou. Jedná se o bezbarvou nebo světle žlutou kapalinu charakteristického zápachu. Hlavními složkami silice dle De Rapper *et al.* (2013) jsou linalyl-acetát (37 %), linalool (31 %) a terpinen-4-ol (15 %). Kulevanova *et al.* (2000)

zkoumali složení silice z levandule lékařské (*Lavandula officinalis*) a zjistili množství linaloolu 26 %, linalyl-acetátu 23 % a levandulyl acetátu 12 %.

Silice z levandule vykazuje významné antimikrobiální účinky. De Rapper *et al.* (2013) zjišťovali antimikrobiální účinky silice z *Lavandula angustifolia* pro *St. aureus*, MRSA, *St. epidermidis*, vankomycin rezistentním enterokokům a *Ps. aeruginosa*, hodnota MIC pro tyto druhy byla 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O něco nižší hodnoty MIC autoři zjistili pro *Kl. pneumoniae* a *Candida albicans*.

1.3.2.4 ROZMARÝNOVÁ SILICE (*ROSMARINI AETHEROLEUM*)

Rozmarýnová silice se získává z kvetoucích nadzemních částí nebo listů rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). Jedná se o bezbarvou až světle žlutou kapalinu charakteristického zápachu. Z listů rozmarýnu lze extrahovat 0,5 – 2,5 % silice. Složení silice je velmi variabilní v závislosti na původu rostliny. Uvádí se, že obsahuje 20 – 50 % 1,8-cineolu, 15 – 25 % α -pinenu, 10 – 25 % kamphoru, 1 – 5 % bornyl acetátu, 1 – 6 % borneolu, 5 – 10 % kamphenu, 12 – 24 % α -terpineolu a mnoho dalších (European Medicines Agency, 2011).

Silice je účinná proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Celkový biologický efekt ovlivňují všechny látky obsažené v rostlině. Nejúčinnější na mikroorganismy jsou alkoholové extrakty. Opletal *et* Šimerda (2005) uvádějí, že alkoholový extrakt z listů rozmarýnu inhiboval v růstu bakteriální druhy *L. monocytogenes*, *St. aureus*, *Str. mutans* a *Bacillus cereus*. De Rapper *et al.* (2013) zjistili hodnoty MIC rozmarýnové silice pro *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.3.2.5 TERPENTÝNOVÁ SILICE (*TEREBINTHINAE AETHEROLEUM*)

Terpentýnovou silici je možné získat z různých druhů borovic. Jedná se o bezbarvou kapalinu charakteristického zápachu, špatně rozpustnou ve vodě, lépe v ethanolu a etheru. Nejčastějšími druhy borovic, ze kterých se silice získává destilací vodní parou je borovice lesní (*Pinus silvestris*), borovice horská (*Pinus montana*), borovice černá (*Pinus nigra*) a borovice bahenní (*Pinus palustris*).

Látkami, které se s převahou (až 95 %) vyskytují v terpentýnové silici, jsou pineny, limonen, terpinolen a bornylacetát. De Rapper *et al.* (2013) zjistili hodnoty MIC terpentýnové silice pro *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.3.3 KYSELINA ETHYLENDIAMINTETRAOCTOVÁ

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) je pevná látka, dobře rozpustná ve vodě. Jedná se o polyaminokarboxylovou kyselinu, která se používá jako chelatační činidlo tvořící komplexy s většinou kovových iontů. Využití nachází v potravinářském průmyslu jako konzervační činidlo a látka pro zachování barvy, používá se také jako antikoagulant při odběru krve nebo v titrační analýze kovů a rozpouštění kovových sloučenin. V medicíně se EDTA využívá při chelatační terapii, ve které slouží k odstranění těžkých kovů z těla (Lambert *et al.*, 2004).

EDTA sama o sobě vykazuje spíše bakteriostatické účinky a je často používána v kombinaci s antibiotiky nebo jinými antimikrobiálními sloučeninami. Mechanismus jejího působení na mikroorganismy je založen na porušení propustnosti buněčné stěny bakterií zablokováním Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů, které jsou pro stabilitu buněčné stěny zásadní, zejména u gramnegativních bakterií (Hamoud *et al.*, 2014). Abd *et al.* (2011) ve své studii uvádějí, že EDTA potencuje účinek 33 aminoglykosidových antibiotik i proti *Ps. aeruginosa*.

Mikrodiluční metodou zjišťovali Hamoud *et al.* (2014) hodnoty MIC a MBC EDTA pro *St. aureus*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Pro *St. aureus* uvedli MIC $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$, MBC více než $4000 \mu\text{g.ml}^{-1}$, pro *E. coli* byla hodnota MIC $4000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ shodná s MBC, pro *Ps. aeruginosa* byla MIC $4000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a MBC vyšší než $4000 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

2 CÍLE PRÁCE

V rámci celosvětového procesu umělé inseminace je v současnosti produkováno několik stovek miliónů inseminačních dávek ročně. Na parametry kančích ejakulátů prasete domácího a z nich připravené inseminační dávky jsou kladeny vysoké požadavky, které zahrnují i jejich zdravotní nezávadnost. Mezi významný faktor snižující kvalitu ejakulátů kanců určených k umělé inseminaci patří mikrobiální kontaminace. Mikroorganismy mají nejen nežádoucí účinky na spermie, ale mohou se dále podílet na vzniku zánětlivých změn v pohlavním ústrojí prasnic. K inhibici mikrobů v inseminačních dávkách se používají antibiotika nebo kombinace antibiotik. Tato léčiva jsou však určena primárně k terapeutickým účelům. Je proto nutné hledat jiné možnosti dekontaminace inseminačních dávek.

Uvedené skutečnosti byly pro naši práci důvodem k ověřování antimikrobiální aktivity vybraných přírodních látek a stanovení jejich účinných koncentrací. Pro rozšíření spektra účinnosti jsme zjišťovali také jejich vzájemné kombinace a kombinace s dalšími sloučeninami. Vlastnímu zjišťování antimikrobiálních účinků přírodních látek předcházela výběr vhodných metod. Nedílnou součástí bylo ověření jejich toxicity pro kančí spermie a závěrem zhodnocení možnosti využití přírodních sloučenin k dekontaminaci inseminačních dávek kanců a případně pro jiné účely. Uvedené cíle byly řešeny v předložené dizertační práci.

1. Zavedení metod pro kvalitativní a kvantitativní průkaz mikroorganismů v modelovém biologickém materiálu
2. Zavedení a výběr metod pro stanovení antimikrobiálních účinků přírodních látek
3. Stanovení antimikrobiálních účinků přírodních látek a jejich vybraných dvojkombinací na mikroorganismy
4. Zavedení metody pro zjištění toxicity vybraných přírodních látek pro kančí spermie
5. Analýza výsledků a výběr vhodných látek nebo jejich kombinací k dekontaminaci ejakulátů kanců

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MIKROORGANISMY POUŽITÉ PRO ZJIŠŤOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK

Antimikrobiální účinky přírodních látek a jejich kombinací byly ověřovány kmeny bakterií a kvasinek získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně, ze sbírky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a kmeny vykultivovanými z kančích ejakulátů v mikrobiologické laboratoři Katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice. Přehled uvádíme v Tabulkách 1a – c.

Tabulka 1a: Referenční mikroorganismy z České sbírky mikroorganismů použité k testování antimikrobiální aktivity přírodních látek

Mikroorganismus	Původ kmene
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 2215
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 5576
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223
<i>Alcaligenes faecalis</i>	CCM 1052
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Bacteroides fragilis</i>	CCM 4508
<i>Candida albicans</i>	CCM 8186

Tabulka 1b: Mikroorganismy vykultivované z ejakulátů kanců, použité k testování antimikrobiální aktivity přírodních látek

Mikroorganismus	Počet kmenů	Původ kmene (kmenů)
Kmeny vykultivované z ejakulátů kanců		
<i>Enterococcus durans</i>	2	Kančí ejakulát
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	Kančí ejakulát
<i>Streptococcus porcinus</i>	4	Kančí ejakulát
<i>Escherichia coli</i>	4	Kančí ejakulát
<i>Proteus mirabilis</i>	7	Kančí ejakulát
<i>Providencia stuartii</i>	2	Kančí ejakulát
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	Kančí ejakulát
<i>Candida catenulata</i>	1	Kančí ejakulát

Tabulka 1c: Mikroorganismy použité k testování antimikrobiální aktivity přírodních látek

Mikroorganismus	Počet kmenů	Původ kmene (kmenů)
Ostatní kmeny		
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	VFN
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	VFN – VRE
<i>Enterococcus faecium</i>	7	VFN – VRE
<i>Enterococcus faecium</i>	1	VFN
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	VFN – VRE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Sbírka KBBV
<i>Clostridium perfringens</i>	1	Sbírka KBBV
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	Sbírka KBBV

VFN – Vojenská fakultní nemocnice v Praze, VRE – vankomycin rezistentní enterokoky
KBBV – Katedra biologických a biochemických věd

3.2 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

3.2.1 TESTOVANÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY A SILICE

Tabulka 2a: Přehled přírodních látek použitých pro zjištění antimikrobiální aktivity a rozmezí testovaných koncentrací

Přírodní látka	(Výrobce), číslo šarže	Testované rozmezí ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Berberin	(FF) 11828	150 – $38,4 \times 10^3$
Ethyl-gallát	(FF) 1160551, 22005084	18,8 – 9600
Eugenol	(FF) 03522CE-216	150 – $38,4 \times 10^3$
Karvakrol	(FLUKA) 1359583	9,4 – 9600
Knicin	(FF) 13/06.02.27/392/E	37,5 – 19200
Kvercetin	(FF) UN 2811/Lot 42310	150 – 19200
Kyselina gallová	(FF) 320700/1695	150 – $38,4 \times 10^3$
Kyselina rozmarýnová	(FF) 00905 CC/MVV05201	150 – $19,2 \times 10^3$
Kyselina usnová	(Carl Roth) 123182914	2,3 – 9600
Limonen	(FLUKA) 1360549	300 – $19,2 \times 10^3$
Methyl-4-hydroxybenzoát	(FF) S24546-514	82 – $10,6 \times 10^3$
Methyl-gallát	(FF) 12313 EB/MNO 4453	37,5 – 9600
Naringenin	(Carl Roth) 071167688	75 – 4800
Naringin	(Carl Roth) 263197808	75 – 4800
Nerol	(SAFC) 09315HE-228	300 – $19,2 \times 10^3$
Oktyl-gallát	(Sigma-Aldrich) STBC2542V	4,7 – 9600
<i>p</i> -cymen	(Sigma-Aldrich) S33159-386	150 – $38,4 \times 10^3$
Propyl-4-hydroxybenzoát	(FF) 084K1802	82 – $10,6 \times 10^3$
Propyl-gallát	(FF) 11303305, 40405152	75 – 9600
Thymol	(Sigma-Aldrich) 126K0140	9,4 – 9600
α-pinen	(FLUKA) 1330348	75 – 2400
β-pinen	(FLUKA) 1380035	75 – 2400

(FF)- Látky od Prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, u látek zvýrazněných tučně uvádíme v této práci hodnoty účinných koncentrací

Tabulka 2b: Přehled silic použitých pro zjištění antimikrobiální aktivity a rozmezí testovaných koncentrací

Silice	(Výrobce), číslo šarže	Testované rozmezí ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Borovicová silice (<i>Terebinthinae aetheroleum</i>)	(FF) 0248/1002/517	150 – $38,4 \times 10^3$
Eukalyptová silice (<i>Eucalypti aetheroleum</i>)	(FF) 0337/1203/517	150 – $38,4 \times 10^3$
Fenyklová silice (<i>Foeniculi dulcis aetheroleum</i>)	(FF) 0337/1103/517	150 – $38,4 \times 10^3$
Hřebíčková silice (<i>Caryophylli floris aetheroleum</i>)	(FF) 0036/0204/517	150 – $19,2 \times 10^3$
Kmínová silice (<i>Carvi aetheroleum</i>)	(FF) 0329/1004/517	150 – $38,4 \times 10^3$
Levandulová silice (<i>Lavandulae aetheroleum</i>)	(FF) 0180/0604/517	150 – $38,4 \times 10^3$
Rozmarýnová silice (<i>Rosmarini aetheroleum</i>)	(FF) 0278/0904/517	150 – $38,4 \times 10^3$

(FF)- Látky od Prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, u látek zvýrazněných tučně uvádíme v této práci hodnoty účinných koncentrací

3.2.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Krevní agar s 5 % beraní krve

Ke kultivaci, pomnožování, zjišťování MBC a uchování bakteriálních kmenů byl používán krevní agar. Do Blood agar Base NO. 2 firmy (Hi Media, Indie, číslo šarže 117038, 175728) připraveného dle přiloženého návodu bylo po zchladnutí na 45 – 50°C přidáno 5 % defibrinované beraní krve. Připravená média byla skladována při 4°C ve tmě.

Endův agar (EA)

Pro selektivní kultivaci gramnegativních bakterií přítomných v ejakulátech kanců byl používán Endův agar. Do ENDO agar Base (Oxoid, Velká Británie, č. šarže 1025672) připraveného dle přiloženého návodu bylo po zahřátí na 80°C přidáno 1,8 ml 10% bazického

fuchsinu. Připravená média byla skladována při 4°C maximálně 3 týdny v obalu bránícím kontaktu se světlem.

Edwardsův agar s 5 % beraní krve

Edwardsův agar byl používán pro selektivní kultivaci streptokoků a enterokoků přítomných v ejakulátech kanců. Do Edwards Medium Base firmy (Hi Media, Indie, č. šarže 37298) připraveného dle přiloženého návodu bylo po zchladnutí na 40 – 50°C přidáno 5 % defibrinované beraní krve. Připravená média byla skladována při 4°C maximálně tři týdny.

Slanetz Bartleyho agar

Pro selektivní kultivaci enterokoků přítomných v ejakulátech kanců byl používán Slanetz Bartleyho agar. Živná média (Hi Media, Indie, č. šarže 25573) byla připravena dle přiloženého návodu a skladována při 4°C maximálně tři týdny.

Mueller Hintonův agar (MHA)

Mueller Hintonův agar byl používán pro kultivaci většiny mikroorganismů vyjma streptokoků přítomných v ejakulátech kanců a pro ověřování citlivosti na antibiotika. Živná média byla připravena dle přiloženého návodu (Hi Media, Indie, č. šarže 118687) a skladována při 4°C maximálně 3 týdny.

MALT agar

MALT agar jsme používali pro kultivaci kvasinek. Živná média byla připravena dle přiloženého návodu (Hi Media, Indie č. šarže. 53507) a skladována při 4°C maximálně tři týdny.

Mueller Hintonův bujon (MHB)

Mueller Hintonův bujon byl používán pro pomnožení většiny mikroorganismů vyjma streptokoků přítomných v ejakulátech kanců a pro ověřování minimálních inhibičních koncentrací přírodních látek, rozpouštědel a antibiotik. Živná média byla připravena dle přiloženého návodu (Hi Media, Indie, č. šarže YL081) a skladována při 4°C maximálně 3 týdny.

Mozko-srdcový bujon (BHI)

BHI byl používán pro pomnožení mikroorganismů přítomných v ejakulátech kanců. Živná média byla připravena dle přiloženého návodu (Himedia, Indie, č. šarže. 140607) a skladována při 4°C maximálně 3 týdny.

3.2.3 ROZTOKY A ČINIDLA

Ethanol

96% ethanol (Lach-ner s r.o.; Česká republika) byl používán pro rozpouštění přírodních látek. Výsledná nejvyšší koncentrace při testování antimikrobiální aktivity sloučenin nepřesahovala 1 %.

DMSO

DMSO byl používán pro rozpouštění přírodních látek a silic (Sigma-Aldrich, D8418). 99,9% DMSO byl ředěn sterilní destilovanou vodou na 5% roztok.

Roztoky pro barvení mikroskopických preparátů dle Grama

40% ethanolový roztok krystalové violeti v 10% roztoku šřavelanu draselného, 10% vodný roztok jodu a jodidu draselného, 70% ethanol, 10% vodný roztok karbolfuchsinu.

3.3 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.3.1 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE

Během studie jsme používali následující laboratorní vybavení: třepačka IKA MS 3 basic (IKA, Německo), předvážky Kern 440-63 (KERN & Sohn GmbH, Německo), analytické váhy KERN ABJ (KERN & Sohn GmbH, Německo), optický mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko), optický mikroskop Jenalumar (Carl-Zeiss, Německo) parní sterilizátory Sterilab a PS20A (BMT, Česká republika), horkovzdušný sterilizátor Sterimat 5104.2 (BMT, Česká republika), chladnička s kontinuálním monitorováním teploty (Whirlpool Combi, Česká republika), nefelometr Densi-La-Meter II (Erba Lachema, Česká republika), biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje, Česká republika)

3.3.2 LABORATORNÍ POMŮCKY

Skleněné Erlenmayerovy baňky (DURAN, Německo), skleněné odměrné baňky a válce (Fisherbrand, Česká republika), jednokanálové a vícekanálové mikropipety s filtry Biohit o objemu 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l (Biohit, Finsko), mikrozkušavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf, Německo), jednorázové očkovací kličky kalibrované na objem 1 μ l a 10 μ l (Dispolab, Česká republika), skleněné Petriho misky o průměru 90 mm, stojany na zkumavky (Fisher Scientific, Česká republika), plynový kahan Bunsenův (Nedform s r.o., Česká republika), špičky do mikropipet (Eppendorf, Německo), skleněné zkumavky (Vitrum, Česká republika), mikrotitrační destičky (Gamedium, Česká republika), vyvíječ anaerobní atmosféry AnaeroGen Compact (Oxoid, Velká Británie).

3.4 POSTUP VYŠETŘENÍ MODELOVÉHO BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

3.4.1 METODY PRO KVALITATIVNÍ VYŠETŘENÍ

Vzorky nativních ejakulátů kanců byly získány z Výzkumného ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí. Celkem bylo vyšetřeno 30 vzorků, které byly transportovány zchlazené při 17°C a zpracovány nejpozději do 4 hodin od odběru. Před kultivací byly vzorky homogenizovány v třepačce. Ejakuláty byly kultivovány na KA, EA, EDW, SBA a pro pomnožení byl použit BHI. Všechna média a roztoky byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Do každého média bylo pipetováno 100 µl ejakulátu, který byl na pevných půdách homogenně rozprostřen sterilní kličkou. Nárůst mikrobů byl hodnocen po 24, 48 a 72 hodinách. Izolované kmeny byly identifikovány na základě růstových, biochemických, morfologických a antigenních vlastností.

3.4.2 METODY PRO KVANTITATIVNÍ VYŠETŘENÍ

Pro stanovení celkového počtu bakterií a kvasinek bylo současně prováděno ředění spermatu sterilním fyziologickým roztokem. Do zkumavky 2 s 1 800 µl fyziologického roztoku bylo pipetováno 200 µl neředěného homogenizovaného ejakulátu ze zkumavky 1. Obsah zkumavky 2 byl promíchán a z ní přeneseno 200 µl do zkumavky 3 s 1800 µl fyziologického roztoku. Směs ve zkumavce 3 byla promíchána a 200 µl přeneseno do zkumavky 4 s 1800 µl fyziologického roztoku. Tímto byl připraven neředěný ejakulát, 10x, 100x a 1000x zředěný ejakulát. Ze zkumavek 1, 2, 3 a 4 byl přenesen 1 ml směsi na dno Petriho misky a následně byl přidán MHA zchlazený na 40 – 45°C. Krouživými pohyby byl obsah misky promíchán. Po ztuhnutí byla média vložena do termostatu a inkubována 24 a 48 hodin při 37°C. Narostlé kolonie byly počítány ve všech ředěních a následně vyhodnocen celkový počet mikroorganismů v 1 ml ejakulátu.

3.5 METODY PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY TESTOVANÝCH LÁTEK

3.5.1 MIKRODILUČNÍ METODA

Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Zásobní roztoky přírodních látek byly připravovány rozpuštěním zjištěné navážky nebo objemu sloučeniny v 96% ethanolu. Poté byl roztok ve zkumavce doplněn MHB do potřebného objemu tak, aby koncentrace ethanolu nepřesahovala 1 %. Pro snadnější a dokonalejší rozpouštění byly některé sloučeniny zahřívány ve vodní lázni při 30°C a homogenizovány v třepačce. Zásobní roztoky přírodních látek byly připraveny 1,1x koncentrovanější, z důvodu pipetování 135 μl zásobního roztoku a 15 μl bakteriální suspenze. Tímto postupem bylo dosaženo požadované koncentrace přírodní látky.

Příprava mikrobiální suspenze

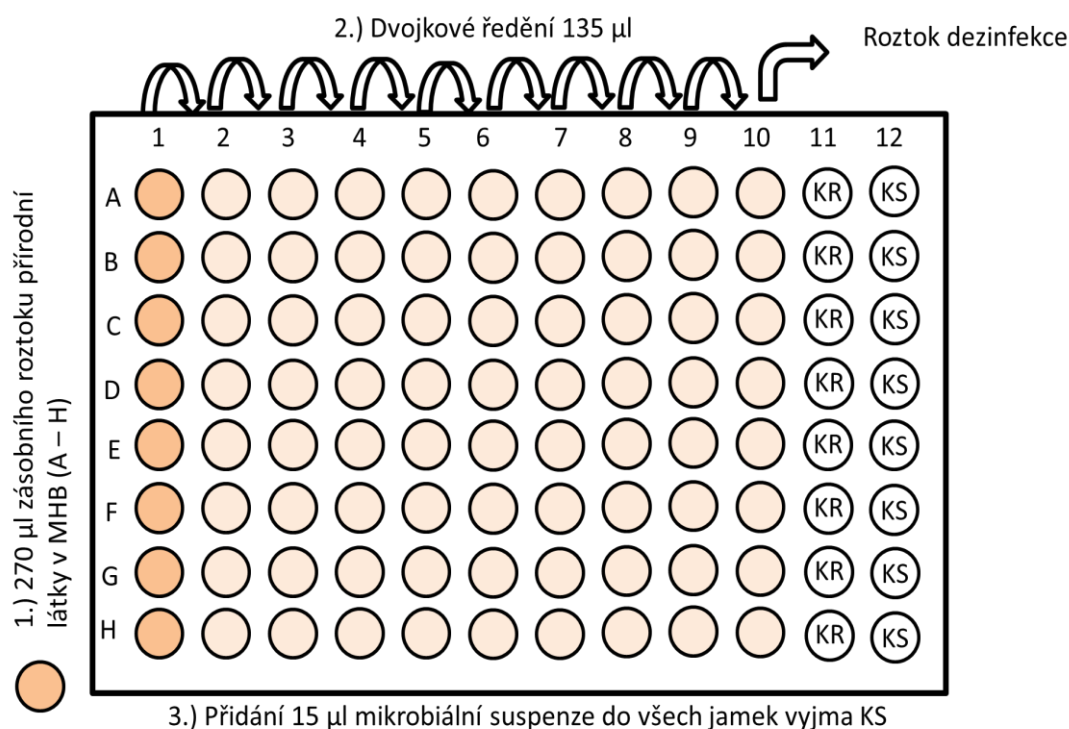
Bakteriální suspenze byla připravována z 24 hodinových kultur narostlých na KA, suspenze kvasinek ze 48 hodinových kultur na MALT agaru. Bakteriologickou kličkou byl potřebný počet kolonií přenesen do fyziologického roztoku ve zkumavce a důkladně homogenizován v třepačce. Zákal suspenzí byl zjišťován nefelometrem a hustota suspenzí byla upravována tak, aby jejich denzita odpovídala stupni 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice, což je přibližně $1,5 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^6$ CFU.ml⁻¹. Následně bylo 20 μl suspenze pipetováno do zkumavky s 2 ml fyziologického roztoku a takto připraveno inokulum o hustotě přibližně $1 \cdot 10^6$ CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^4$ CFU.ml⁻¹. Inokulum bylo přidáváno do jamek mikrotitrační destičky, čímž se výsledná koncentrace buněk snížila na požadovaných 10^5 CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^3$ CFU.ml⁻¹. Inokulum bylo nutné použít v časovém horizontu do 30 minut z důvodu nebezpečí poklesu počtu vitálních mikrobiálních buněk.

Příprava ředící řady pro stanovení antimikrobiálních účinků testovaných látek

Do každé jamky prvního sloupce (řady A – H) sterilní mikrotitrační destičky bylo pipetováno 270 μl zásobního roztoku přírodní látky a do jednotlivých jamek sloupců 2 – 12 (řady A – H) 135 μl MHB. Vícekanálovou pipetou bylo přeneseno 135 μl roztoku přírodní látky z prvního sloupce do druhého, opětovným nasátím a vypuštěním byl roztok promíchán a postup

opakován až do posledního sloupce č. 10. Z jamek 10. sloupce bylo 135 μl roztoku přeneseno do dezinfekčního roztoku.

Takto bylo připraveno dvojnásobné ředění testované sloučeniny o 10 koncentracích (pro každou látku bylo koncentrační rozmezí jiné). Následně bylo do každé jamky přidáno 15 μl mikrobiální suspenze (viz Obr. 22). Destička přikrytá sterilním víčkem byla vložena do fólie pro zamezení vyschnutí a inkubována v aerobním termostatu 24, 48 a 72 hodin při 37°C. V některých případech byl počet koncentrací testované přírodní látky navýšen na 12. Všechny látky byly testovány v triplicátech. Pokud z různých důvodů (kontaminace, špatná viabilita suspenze, vyschnutí) došlo k většímu rozptylu mezi třemi hodnotami koncentrací u jednoho bakteriálního kmene, stanovení bylo opakováno. Součástí každé analýzy antimikrobiální aktivity byla kontrola růstu mikroorganismů v MHB bez inhibičních látek. Další byla kontrola růstu kultury v přítomnosti rozpouštědla v MHB. Kontrolou sterility bylo 150 μl MHB inkubované za stejných podmínek, viz výše.



KR – Kontrola růstu *KS* – Kontrola sterility média

Obrázek 22: Schéma přípravy ředící řady při testování antimikrobiální aktivity přírodních látek

Hodnocení

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla hodnocena jako ředění přírodní sloučeniny v první jamce bez viditelného růstu mikroorganismů (viz Obr. 2). Pro zjištění minimální baktericidní nebo fungicidní koncentrace (MBC nebo MFC) byl přenesen obsah poslední jamky s ještě viditelným růstem a minimálně 3 jamek bez viditelného růstu na krevní agar, který byl dále inkubován 24 – 48 hodin při 37°C. Koncentrace první sloučeniny, u které po vyočkování na krevní agar nebyl zjištěn růst mikrobů, byla hodnocena jako MBC a v případě kvasinek jako MFC.

3.5.2 BUJONOVÁ DILUČNÍ METODA

Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Stanovené navážky přírodních sloučenin byly rozpouštěny v 96% ethanolu. Pro urychlení rozpouštění byly zkumavky s přírodními látkami homogenizovány v třepačce. Poté byl objem zkumavky doplněn do 20 ml MHB. Zásobní roztoky přírodních látek byly připraveny 1,1x koncentrovanější, z důvodu naředění při přípravě ředící řady, viz níže.

Příprava mikrobiální suspenze

Bakteriální suspenze byla připravována z 24 hodinové kultury narostlé na KA. Kvasinky byly inkubovány 48 hodin na MALT médiu. Zákal suspenzí byl zjišťován nefelometrem a hustota suspenzí byla upravována tak, aby jejich denzita odpovídala stupni 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice, což je přibližně $1,5 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^6$ CFU.ml⁻¹. Následně bylo 30 µl suspenze pipetováno do zkumavky s 3 ml fyziologického roztoku a takto připraveno inokulum o hustotě přibližně $1 \cdot 10^6$ CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^4$ CFU.ml⁻¹. Inokulum bylo přidáváno do zkumavek, čímž se výsledná koncentrace buněk snížila na požadovaných 10^5 CFU.ml⁻¹, v případě kvasinek $1,5 \cdot 10^3$ CFU.ml⁻¹. Inokulum bylo nutné použít v časovém horizontu do 30 minut z důvodu nebezpečí poklesu počtu vitálních mikrobiálních buněk.

Příprava ředící řady pro stanovení antimikrobiální aktivity testovaných látek

Do dvou řad sterilních zkumavek umístěných ve stojánku byl pipetován 900 µl MHB, s výjimkou první zkumavky, která obsahovala 1800 µl zásobního roztoku testované sloučeniny. Z první zkumavky bylo přeneseno 900 µl zásobního roztoku testované sloučeniny

do druhé zkumavky a obsah promíchán. Dále bylo přeneseno 900 µl obsahu druhé zkumavky do následující a obsah opět promíchán. Stejným způsobem bylo provedeno ředění až do poslední zkumavky, z níž bylo 900 µl roztoku přeneseno do dezinfekčního roztoku. Následující dvě zkumavky v řadě obsahující pouze MHB byly použity pro kontrolu růstu mikroorganismů a kontrola sterility MHB. Na závěr bylo do všech zkumavek, s výjimkou kontroly sterility, pipetováno 100 µl připraveného mikrobiálních inokula. Poté byly zkumavky inkubovány při 37°C 24, 48 a 72 hodin.

Hodnocení

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla hodnocena jako ředění přírodní sloučeniny v první zkumavce bez viditelného růstu mikroorganismů. Pro zjištění minimální baktericidní koncentrace (MBC) byl vyočkován obsah poslední zkumavky s ještě viditelným růstem a minimálně 3 zkumavek bez viditelného růstu na krevní agar, který byl inkubován 24 – 48 hodin při 37°C. Koncentrace první sloučeniny, u které po vyočkování na krevní agar nebyl zjištěn růst mikrobů, byla hodnocena jako MBC, v případě kvasinek jako MFC.

3.5.3 AGAROVÁ DILUČNÍ METODA

Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Zásobní roztoky přírodních látek byly připravovány rozpuštěním zjištěné navážky nebo objemu sloučeniny v 96% ethanolu. Poté byl roztok ve zkumavce doplněn fyziologického roztoku do potřebného objemu. Zásobní roztoky přírodních látek byly připraveny 10x koncentrovanější z důvodu jejich přidání do agarového média.

Příprava mikrobiální suspenze

Příprava mikrobiální suspenze (viz kap. 3.5.2). Inokulum bylo nanášeno sterilní kalibrovanou 10 µl kličkou na vyznačenou plochu agaru.

Příprava ředící řady pro stanovení antimikrobiálních účinků testovaných látek

Dvojkovým ředěním bylo připraveno 10 koncentrací přírodní látky dvojkovou ředící řadou. Tyto zásobní roztoky byly přidány k 90 ml rozvařeného Mueller Hintonova agaru zchlazeného na 40 – 45°C a důkladně promíchány, čímž byly naředěny na požadovanou koncentraci. Následně bylo přibližně 20 ml směsi látek o různých koncentracích v agaru

přidáno do Petriho misky. Po ztuhnutí bylo médium rozděleno graficky do 16 stejných částí a do každé části byla nanesena suspenze bakteriálního kmene. Média byla inkubována 24, 48 a 72 hodin při 37°C. V každém médiu, kde byla jedna koncentrace jedné testované látky, bylo možno otestovat antimikrobiální aktivitu vůči 16 různým mikroorganismům. Součástí každé analýzy antimikrobiální aktivity byla kontrola růstu mikroorganismů na agaru bez inhibičních látek. Další byla kontrola růstu mikrobů na agaru v přítomnosti rozpouštědla. Kontrolou sterility byl Mueller Hintonův agar inkubovaný za stejných podmínek, viz výše. Experimenty byly provedeny v triplikátu.

Hodnocení

MIC byla hodnocena jako první médium s určitou koncentrací přírodní látky, kde nebyl v příslušném úseku agaru zjištěn růst mikroorganismu (viz Obr. 1).

3.6 METODA PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK V KOMBINACI

3.6.1 MIKRODILUČNÍ METODA

Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Zásobní roztok první přírodní látky byl připraven rozpuštěním zjištěné navážky nebo objemu sloučeniny v 96% ethanolu. Poté byl roztok ve zkumavce doplněn MHB do potřebného objemu tak, aby koncentrace ethanolu nepřesahovala 1 %. Pro snadnější a dokonalejší rozpouštění byly některé sloučeniny zahřívány ve vodní lázni při 30°C a homogenizovány v třepačce. Koncentrace přírodních látek byly připraveny 1,2x vyšší, z důvodu pipetování 125 µl zásobního roztoku a 15 µl bakteriální suspenze a 10 µl zásobního roztoku druhé přírodní látky. Zásobní roztok druhé látky byl připraven 15x koncentrovanější, než bylo požadované množství vzhledem k jeho následnému naředění.

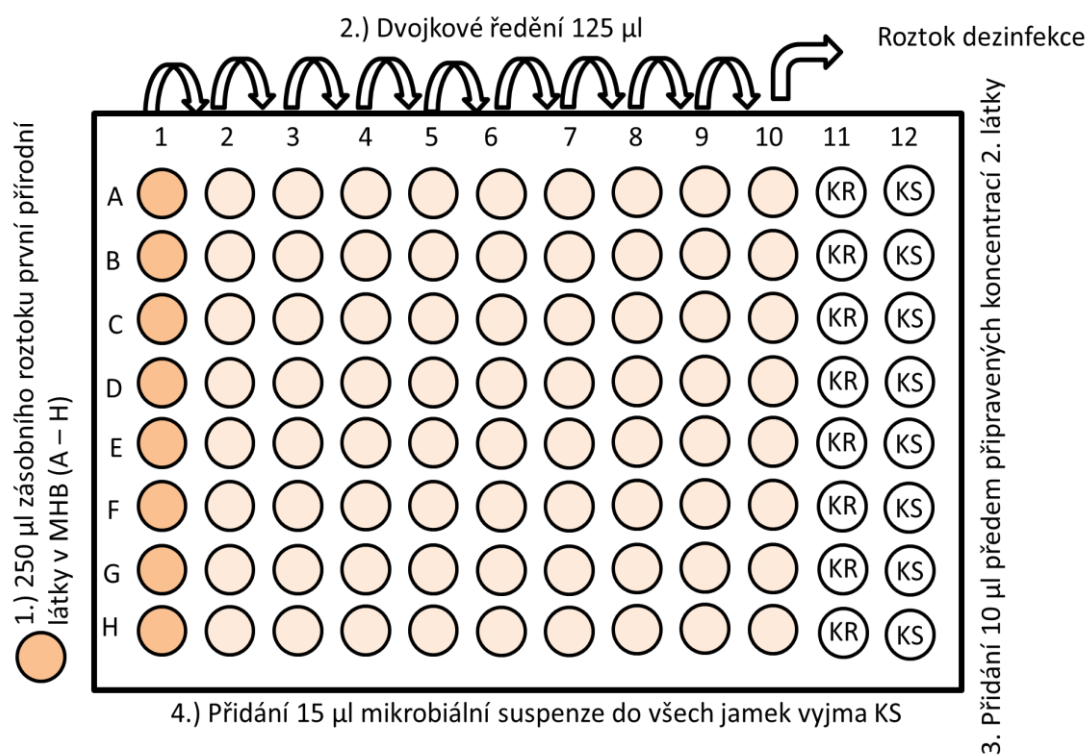
Příprava mikrobiální suspenze byla provedena dle postupu uvedeného v kap. 3.5.1

Příprava ředící řady pro stanovení antimikrobiálních účinků kombinací testovaných látek

Do jamek mikrotitrační destičky s výjimkou jamek sloupce 1 bylo pipetováno 125 µl MHB. Jamky sloupce 1 (A – H) byly naplněny 250 µl zásobního roztoku první testované antimikrobiální látky. Koncentrace první látky byla 1,2x vyšší než požadovaná z důvodu naředění po přidání 10 µl roztoku druhé látky a 15 µl mikrobiální suspenze. Následně bylo vícekanálovou pipetou přeneseno z jamek sloupce 1 (A – H) 125 µl roztoku první sloučeniny do jamek sloupce 2 (A – H). Po důkladném promíchání bylo přenášeno 125 µl směsi do jamek mikrotitrační destičky ve sloupcích 3 – 10 (A – H). Z jamek ve sloupci 10 (A – H) bylo přeneseno 125 µl obsahu do dezinfekčního roztoku. Stejný postup byl opakován v dalších dvou mikrotitračních destičkách pro stejnou přírodní látku.

Jednotlivá ředění druhé antimikrobiální sloučeniny byla připravena v jamkách jiné mikrotitrační destičky. V jamkách řady A (sloupce 1 – 10) byl zásobní roztok 300 µl 2. testované sloučeniny. Do jamek řad B-H (sloupce 1 – 10) bylo přidáno 150 µl MHB. Vícekanálovou pipetou bylo z jamek řady A (sloupce 1 – 10) přeneseno 150 µl roztoku první sloučeniny do jamek řady B (sloupce 1-10). Po důkladném promíchání bylo 150 µl směsi přenášeno do jamek mikrotitrační destičky v řadách C-H (sloupce 1 – 10). Z jamek v řadě H

(sloupce 1 – 10) bylo přeneseno 150 μl obsahu do dezinfekčního roztoku. Celá koncentrační řada druhé testované látky byla 15x koncentrovanější z důvodu jejího přenesení v množství 10 μl do mikrotitrační destičky obsahující první testovanou látku. Po finálním přidání bakteriální suspenze o denzitě $10^5 - 10^6 \text{ CFU.ml}^{-1}$ docházelo ke správnému, patnáctinásobnému zředění druhé přírodní látky (viz Obr. 23). Takto bylo otestováno 10 různých koncentrací první a 8 koncentrací druhé sloučeniny v jedné mikrotitrační destičce. Všechny experimenty byly opakovány třikrát. Součástí byly kontroly růstu a kontroly sterility viz výše. Koncentrace ethanolu, rozpouštědla přírodních látek nepřesáhla 2 %.



KR – Kontrola růstu, KS – Kontrola sterility média

Obrázek 23: Schéma přípravy ředících řad při testování antimikrobiální aktivity kombinace dvou přírodních látek

Analýza účinků přírodních látek v kombinaci

Při zjišťování MIC a MBC kombinací přírodních sloučenin a EDTA byly stanoveny hodnoty MIC a MBC účinné koncentrace samostatných přírodních látek a EDTA. Důvodem bylo srovnání výsledků ve stejném čase a za stejných podmínek, z hlediska zjištění interakcí mezi látkami. Typy interakcí byly analyzovány na základě výpočtu indexu frakční inhibiční koncentrace (FICI – Fractional Inhibitory Concentration Index) a indexu frakční baktericidní koncentrace (FBCI – Fractional Bactericidal Concentration Index) dle studií Hamoud *et al.*

(2014) a Agboke *et* Esimone (2011). Jednalo se o 4 typy interakcí: synergie, aditivita, indiference a antagonismus. FICI a FBCI pro kombinaci dvou látek byly zjišťovány dle níže uvedených vztahů.

Výpočet FICI a FBCI dle Hamoud *et al.* (2014) a Agboke *et* Esimone, (2011):

$$\text{FICI pro MIC} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \left(\frac{\text{MIC látky A v kombinaci}}{\text{MIC látky A samostatně}} \right) + \left(\frac{\text{MIC látky B v kombinaci}}{\text{MIC látky B samostatně}} \right)$$

$$\text{FBCI pro MBC} = \text{FBC}_A + \text{FBC}_B = \left(\frac{\text{MBC látky A v kombinaci}}{\text{MBC látky A samostatně}} \right) + \left(\frac{\text{MBC látky B v kombinaci}}{\text{MBC látky B samostatně}} \right)$$

V naší práci byl vztah pro výpočet FICI a FBCI částečně modifikován z důvodu velkého počtu výsledků a zařazených bakteriálních kmenů a dále poměrně širokého rozmezí výsledků MIC a MBC jednotlivých látek i jejich dvojkombinací. Pro výpočet dle uvedených vztahů byly použity hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀, jednotlivých látek i dvojkombinací, aby byla získána jedna hodnota pro lepší přehled výsledků. Pro zjednodušení jsou v Tabulkách 8a – f uvedeny hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ vždy za 48 hodin, neboť nebyly zaznamenány téměř žádné rozdíly v růstu mikroorganismů mezi 48 a 72 hodinovou inkubací.

$$\text{FICI pro MIC}_{50} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \left(\frac{\text{MIC}_{50} \text{ látky A v kombinaci}}{\text{MIC}_{50} \text{ látky A samostatně}} \right) + \left(\frac{\text{MIC}_{50} \text{ látky B v kombinaci}}{\text{MIC}_{50} \text{ látky B samostatně}} \right)$$

$$\text{FBCI pro MBC}_{50} = \text{FBC}_A + \text{FBC}_B = \left(\frac{\text{MBC}_{50} \text{ látky A v kombinaci}}{\text{MBC}_{50} \text{ látky A samostatně}} \right) + \left(\frac{\text{MBC}_{50} \text{ látky B v kombinaci}}{\text{MBC}_{50} \text{ látky B samostatně}} \right)$$

FIC_A – frakční inhibiční koncentrace látky A

FIC_B – frakční inhibiční koncentrace látky B

FBC_A – frakční baktericidní koncentrace látky A

FBC_B – frakční baktericidní koncentrace látky B

Hodnocení interakcí testovaných látek v kombinaci – převzato a upraveno dle studie Hamoud *et al.* (2014)

FICI, FBCI $\leq 0,5$; jedná se o synergické působení přírodních látek v kombinaci. Antimikrobiální aktivita kombinace sloučenin je významně vyšší než při jejich samostatném použití a zároveň může dojít k rozšíření spektra účinku

FICI, FBCI $> 0,5 \leq 1$; signalizuje aditivní efekt, kdy součet hodnot účinných koncentrací kombinace látek je přibližně shodný nebo nižší s hodnotou účinné koncentrace jednotlivé sloučeniny samostatně. Při použití dvou sloučenin v kombinaci dochází k rozšíření spektra účinku.

FICI, FBCI $> 1 \leq 4$; znamená indiferenční účinek, tedy stav, kdy se součet hodnot koncentrací látek použitých samostatně nijak neliší od hodnot koncentrací jejich kombinací. Sloučeniny se vzájemně neovlivňují, součet jejich účinných koncentrací kombinace látek je stejný jako u látek testovaných jednotlivě.

FICI, FBCI > 4 ; jedná se o antagonismus, kdy se účinnost látek vzájemně inhibuje, součet hodnot jejich účinných koncentrací je mnohem vyšší ve srovnání s hodnotami koncentrací látek testovaných jednotlivě.

3.7 METODA PRO STANOVENÍ SPERMIOTOXICITY TESTOVANÝCH LÁTEK

Do zkumavek vytemperovaných na teplotu 37°C bylo opatrně pipetováno 0,75 ml čerstvě odebraného kančího ejakulátu, který byl ředěn 2,15 ml krátkodobého ředidla BTS (Beltsville Thawing Solution) rovněž vytemperovaným na 37°C. BTS ředidlo s antibiotiky je používáno pro krátkodobé uchovávání kančího spermatu. Pro účely vyšetření spermiotoxicity bylo používáno BTS ředidlo bez antibiotik.

Do takto naředěného ejakulátu bylo po zchlazení na 17°C přidáno 0,1 ml roztoku jednotlivých přírodních látek o různých koncentracích, rozpuštěných ve fyziologickém roztoku s 1% ethanolem. Po opatrném promíchání bylo na podložní sklo předeřtáté na teplotu 38°C přeneseno 15 μ l směsi, která byla přikryta krycím sklíčkem. Při této teplotě dochází k aktivaci spermií původně zchlazených na 17°C. Motilita spermií byla ihned po zhotovení preparátu zjišťována v mikroskopu s fázovým kontrastem při celkovém zvětšení 150x (viz Obr. 24). Změny v pohyblivosti spermií inkubovaných při 17°C pro danou přírodní látku byly sledovány v časech 0, 4, 24, 48 a 72 hodin. Množství pohyblivých spermií bylo pozorováno v 15 – 20 zorných polích. Ze všech zjištěných hodnot byl vypočítán medián počtu pohyblivých spermií pro danou koncentraci látky a v daném časovém intervalu.

Maximální netoxická koncentrace (MNK) testovaných sloučenin byla definována jako nejvyšší koncentraci přírodní látky, při které byl zaznamenán pohyb alespoň 10 % spermií po 24, 48 a 72 hodinách. Celý proces přípravy ejakulátu s obsahem testované přírodní sloučeniny a pozorování pohyblivosti byl organizován tak, aby byl vykonán v co nejkratším čase. Ejakulát kance byl odebrán čerstvý v den stanovení spermiotoxicity přírodních látek. Nejlépe byla v podmínkách našeho experimentu hodnocena taková koncentrace přírodní látky, ve které se pohyblivost spermií blížila kontrole.



Obrázek 24: Mikroskopický snímek zachycující spermie kanců ve fázovém kontrastu

(Foto: Ing. Jan Lipenský, DiS., Výzkumný ústav živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí)

4 VÝSLEDKY

4.1 VÝSLEDKY KVALITATIVNÍHO A KVANTITATIVNÍHO VYŠETŘENÍ KANČÍCH EJAKULÁTŮ

Všechny vyšetřené ejakuláty odebrané od kanců ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí obsahovaly mikroorganismy. Jejich kvalitativní a kvantitativní zastoupení uvádíme v Tabulce 3. Nejčastěji se vyskytovaly *Pseudomonas aeruginosa* a druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tabulka 3: Mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů (n = 30)

Mikroorganismus	Výskyt		Zastoupení druhů dle kvantit ¹		
	absolutně	%	10 ¹ – 10 ²	10 ³ – 10 ⁴	>10 ⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	56,7	4	8	5
<i>Escherichia coli</i>	6	20,0	2	3	1
<i>Morganella morganii</i>	1	3,3	1	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	3	10,0	2	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	23,3	3	2	2
<i>Klebsiella</i> sp.	4	13,3	N	N	N
Gramnegativní nefermentující tyčinky	5	16,7	4	1	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	3	10,0	1	2	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	3,3	N	N	N
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	6,7	1	1	0
Ostatní koaguláza-negativní stafylokoky	3	10,0	3	0	0
Viridující streptokoky	5	16,7	1	2	2
Beta-hemolytické streptokoky	4	13,3	3	1	0
<i>Enterococcus</i> sp.	5	16,7	5	0	0
Kvasinky	2	6,7	2	0	0
Coryneformní tyčinky	4	13,3		3	1
Ostatní	6	20,0	N	N	N

N - nezjišťováno

¹ – Kategorie kvantit (10¹-10², 10³-10⁴, > 10⁵) jsou uvedeny CFU/ml

4.2 VÝSLEDKY STANOVENÍ MINIMÁLNÍCH INHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ A MINIMÁLNÍCH BAKTERICIDNÍCH KONCENTRACÍ PŘÍRODNÍCH LÁTEK

4.2.1 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE SILIC

Silice jsme rozpouštěli v 1% ethanolu a 5% DMSO. Silice rozpuštěné v ethanolu vykazovaly lepší antimikrobiální účinky. Výsledky účinnosti silic na referenční kmeny bakterií i mikrobu vykultivovaných z ejakulátů kanců uvádíme v Tabulce 4. Ze dvou kmenů *Staphylococcus* sp. byl první *St. aureus* a druhý *Staphylococcus hyicus* (*St. hyicus*), oba se řadí mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky.

Z testovaných silic byly účinné kmínová (*Carvi aetheroleum*) a fenyklová (*Foeniculi aetheroleum*) rozpuštěné v 1% ethanolu. Silice rozpuštěné v 5% DMSO byly často neúčinné i v nejvyšších testovaných koncentracích. Hodnoty MIC *Carvi aetheroleum* rozpuštěné v ethanolu pro kmeny *E. coli* a *St. aureus* a *E. faecalis* byly 2400 – 4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U *Foeniculi aetheroleum* jsme pro výše uvedené kmeny zjistili stejnou MIC 4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podobně účinné byly tyto silice na kmeny *E. faecalis*, *St. hyicus*, *Proteus mirabilis* a *E. coli* vykultivované z kancích ejakulátů. U silic jsme, vzhledem k jejich nestabilitě ve složení obsažených sloučenin, hodnoty účinných koncentrací na širší spektrum mikroorganismů nezjišťovali.

Tabulka 4: Hodnoty MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) silic rozpuštěných v 1% ethanolu a 5% DMSO pro kmeny mikroorganismů zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	T ¹	<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 3)		<i>Staphylococcus hyicus</i> (n = 2)		<i>Proteus mirabilis</i> (n = 2)		<i>Escherichia coli</i> (n = 3)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3)	
		DMSO	ethanol	DMSO	ethanol	DMSO	ethanol	DMSO	ethanol	DMSO	ethanol
<i>Carvi aetheroleum</i>	24	> 19,2x10 ³	4800	19,2x10 ³	2400 - 4800	> 19,2x10 ³	4800	> 19,2x10 ³	2400	> 19,2x10 ³	9600
	48	> 19,2x10 ³	4800	19,2x10 ³	2400 - 4800	> 19,2x10 ³	4800	> 19,2x10 ³	2400	> 19,2x10 ³	9600
	72	> 19,2x10 ³	4800	19,2x10 ³	2400 - 4800	> 19,2x10 ³	4800	> 19,2x10 ³	2400	> 19,2x10 ³	9600
<i>Foeniculi aetheroleum</i>	24	19,2x10 ³	4800	9600	4800	19,2x10 ³	4800	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
	48	19,2x10 ³	4800	9600	4800	19,2x10 ³	9600	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
	72	19,2x10 ³	4800	9600	4800	19,2x10 ³	9600	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
<i>Lavandulae aetheroleum</i>	24	19,2x10 ³	19,2x10 ³	> 19,2x10 ³	4800 - 9600	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
	48	19,2x10 ³	19,2x10 ³	> 19,2x10 ³	4800 - 9600	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
	72	19,2x10 ³	19,2x10 ³	> 19,2x10 ³	4800 - 9600	19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	9600	> 19,2x10 ³	19,2x10 ³
<i>Rosmarini aetheroleum</i>	24	19,2x10 ³	9600	19,2x10 ³	4800	9600	9600	19,2x10 ³	4800	38,4x10 ³	9600
	48	19,2x10 ³	9600	19,2x10 ³	4800	9600	9600	19,2x10 ³	4800	38,4x10 ³	9600
	72	19,2x10 ³	9600	19,2x10 ³	4800	9600	9600	19,2x10 ³	4800	38,4x10 ³	9600
<i>Terebinthinae aetheroleum</i>	24	38,4x10 ³	19,2x10 ³	38,4x10 ³	4800	> 38,4x10 ³	9600	19,2x10 ³	9600	38,4x10 ³	19,2x10 ³
	48	38,4x10 ³	19,2x10 ³	38,4x10 ³	9600	> 38,4x10 ³	9600	19,2x10 ³	9600	38,4x10 ³	19,2x10 ³
	72	38,4x10 ³	19,2x10 ³	38,4x10 ³	9600	> 38,4x10 ³	9600	19,2x10 ³	9600	38,4x10 ³	19,2x10 ³

¹ doba hodnocení po hodinách

4.2.2 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK PRO REFERENČNÍ KMENY BAKTERIÍ

Výsledky účinnosti přírodních látek na referenční druhy mikroorganismů uvádíme v Tabulkách 5a – b. Za velmi účinný považujeme thymol rozpuštěný v 1% ethanolu, u kterého jsme zjistili hodnoty MIC 150 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro všechny testované referenční druhy mikrobů i po 72 hodinách. Účinky thymolu rozpuštěného v 5% DMSO byly významně nižší s hodnotami MIC 300 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *St. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Další účinnou látkou byl karvakrol rozpuštěný v 1% ethanolu, který inhiboval referenční druhy v množství 37,5 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ i po 72 hodinách, kromě *Kl. pneumoniae*. Hodnoty MIC karvakrolu rozpuštěného v 5% DMSO byly rovněž vyšší (1200 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Knicin rozpuštěný v 1% ethanolu také vykazoval vyšší inhibiční účinky ve srovnání s knicinem rozpuštěným v 5% DMSO. Hodnoty MIC knicinu pro referenční druhy mikrobů byly v rozmezí 300 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Velmi výrazné účinky na grampozitivní a anaerobní bakterie jsme zjistili u oktyl-gallátu, hodnoty MIC byly 18,8 – 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro gramnegativní bakterie byly hodnoty MIC významně vyšší. U kyseliny gallové a jejích esterů vyjma oktyl-gallátu jsme tak výraznou antibakteriální aktivitu neprokázali. Velmi silný účinek na grampozitivní bakterie jsme zaznamenali u kyseliny usnové s hodnotami MIC 4,7 – 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Antimikrobiální účinky oktyl-gallátu a kyseliny usnové rozpuštěných v 5% DMSO jsme netestovali.

Nepřesvědčivé, velmi nízké účinky na bakterie jsme zaznamenali hlavně u kyseliny rozmarýnové rozpuštěné v 1% ethanolu, (MIC 4800 – $38,4 \times 10^3$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Při použití rozpouštědla 5% DMSO byly hodnoty MIC ještě vyšší. Podobné výsledky MIC jsme zjistili u kvercetinu a zejména *p*-cymenu, jehož hodnoty MIC přesahovaly námi testované koncentrace ($38,4 \times 10^3$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Tabulka 5a: Hodnoty MIC a MBC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v 1% ethanolu pro referenční kmeny mikroorganismů zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2215		<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 5576		<i>Clostridium perfringens</i> KBBV		
	T ¹	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Thymol	24	150	150	300	600	150	150
	48	150	150	300	600	150	150
	72	150	150	300	600	150	150
Karvakrol	24	300	300	300	300	37,5	37,5
	48	300	300	600	600	37,5	37,5
	72	300	300	600	600	37,5	37,5
Eugenol	24	2400	2400	2400	2400	600	600
	48	2400	2400	2400	2400	600	600
	72	2400	2400	2400	2400	600	600
Kyselina gallová	24	4800	4800	- ²	-	> 4800	> 4800
	48	4800	4800	-	-	> 4800	> 4800
	72	4800	4800	-	-	> 4800	> 4800
Oktyl-gallát	24	18,8	18,8	9,4	37,5	18,8	18,8
	48	18,8	18,8	18,8	37,5	18,8	18,8
	72	18,8	18,8	18,8	37,5	18,8	18,8
Knicin	24	150	600	300	600	75	300
	48	600	600	300	600	150	300
	72	600	600	300	600	150	300
Kyselina usnová	24	4,7	9,4	37,5	-	18,8	150
	48	4,7	9,4	37,5	-	18,8	18,8
	72	4,7	9,4	37,5	-	18,8	18,8

¹ doba hodnocení po hodinách

² neprovedeno

Tabulka 5b: Hodnoty MIC, MBC a MFC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v ethanolu pro referenční kmeny mikroorganismů zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	T^1	<i>Alcaligenes faecalis</i> CCM 1052		<i>Klebsiella pneumoniae</i> KBBV		<i>Bacteroides fragilis</i> CCM 4508		<i>Candida albicans</i> CCM 8186	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
Thymol	24	150	300	300	300	37,5	75	300	300
	48	150	300	300	300	75	150	300	300
	72	150	300	300	300	75	150	300	300
Karvakrol	24	300	300	2400	2400	18,8	37,5	150	150
	48	300	300	2400	2400	18,8	18,8	150	150
	72	300	300	2400	2400	18,8	18,8	150	150
Eugenol	24	600	600	2400	2400	75	150	1200	1200
	48	600	600	2400	2400	75	150	1200	1200
	72	600	600	2400	2400	75	150	1200	1200
Kyselina gallová	24	75	75	> 4800	> 4800	4800	> 4800	2400	2400
	48	75	75	> 4800	> 4800	4800	> 4800	2400	2400
	72	75	75	> 4800	> 4800	4800	> 4800	2400	2400
Oktyl-gallát	24	75	75	1200	1200	9,4	18,8	18,8	18,8
	48	75	150	1200	1200	18,8	18,8	18,8	18,8
	72	75	150	1200	1200	18,8	18,8	18,8	18,8
Knicin	24	75	75	1200	1200	75	150	1200	2400
	48	150	150	1200	1200	300	300	1200	2400
	72	150	150	1200	1200	300	300	1200	2400
Kyselina usnová	24	2400	4800	> 9600	> 9600	9,4	75	> 9600	> 9600
	48	2400	4800	> 9600	> 9600	18,8	75	> 9600	> 9600
	72	2400	4800	> 9600	> 9600	18,8	75	> 9600	> 9600

¹ doba hodnocení po hodinách

4.2.3 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA MIKROORGANISMY VYKULTIVOVANÉ Z KANČÍCH EJAKULÁTŮ A Z OSTATNÍCH KLINICKÝCH VZORKŮ

Výsledky účinnosti přírodních látek na kmeny mikrobů převážně vykultivovaných z kančích ejakulátů uvádíme v Tabulkách 6a – 7b. V tabulkách jsou hodnoty MIC a MBC sloučenin rozpuštěných v 1% ethanolu. Z hodnot uvedených v Tabulce 7b je zřejmé, že mezi sloučeniny s výrazným účinkem na enterokoky patří oktyl-gallát s MIC i MBC v rozmezí 75 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kyselina usnová inhibovala růst enterokoků již v množství 9,4 – 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Za účinné na enterokoky rovněž považujeme thymol a karvakrol, u kterých jsme pro enterokoky zjistili hodnoty MIC 300 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 75 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty MBC se pohybovaly v rozmezí 600 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 75 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak kyselina gallová neinhibovala enterokoky ani v koncentraci 4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Gramnegativní druhy *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* a *Klebsiella* sp. vykultivované z ejakulátů kanců byly nejlépe inhibovány thymolem v množství 150 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tabulka 6a, 7a). Podobný efekt jsme zjistili i u karvakrolu. Nižší účinek thymolu a karvakrolu jsme zaznamenali na kmeny *Ps. aeruginosa* vykultivované rovněž z ejakulátů kanců. Hodnoty MIC i MBC se pohybovali v rozmezí 150 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U knicinu jsme také prokázali výrazné antimikrobiální účinky. Hodnoty MIC a MBC pro většinu druhů bakterií vykultivovaných z ejakulátů kanců byli v rozmezí 300 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U kyseliny gallové, gallátů a eugenolu byla antimikrobiální aktivita nižší ve srovnání s výše uvedenými sloučeninami. Za v podstatě neúčinné na gramnegativní druhy bakterií považujeme kyselinu usnovou a oktyl-gallát.

Tabulka 6a: Hodnoty MIC a MBC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v 1% ethanolu pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	T^1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 17)		<i>Escherichia coli</i> (n = 6)		<i>Proteus mirabilis</i> (n = 7)		<i>Providencia stuartii</i> (n = 3)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Thymol	24	150 - 2400	300 - 2400	150 - 600	150 - 600	300	300	300	300
	48	300 - 2400	600 - 2400	150 - 600	150 - 600	300	300	300	300
	72	300 - 2400	600 - 2400	150 - 600	150 - 600	300	300	300	300
Karvakrol	24	150 - 1200	150 - 2400	75 - 300	75 - 300	300	300	600	600
	48	150 - 1200	150 - 2400	75 - 300	75 - 300	300	300	600	600
	72	150 - 1200	150 - 2400	75 - 300	75 - 300	300	300	600	600
Eugenol	24	1200 - 4800	1200 - 4800	300 - 2400	300 - 2400	600	600	2400	2400
	48	1200 - 4800	1200 - 4800	300 - 2400	300 - 2400	600	600	2400	2400
	72	1200 - 4800	1200 - 4800	300 - 2400	300 - 2400	600	600	2400	2400
Knicin	24	300	300 - 600	300 - 600	300 - 600	600	600	150 - 300	300
	48	300 - 600	300 - 600	300 - 600	300 - 1200	600	600	300	300
	72	300 - 600	300 - 600	300 - 600	300 - 1200	600	600	300	300
Kyselina usnová	24	> 4800	> 4800	> 4800	> 4800	- ²	-	1200	2400
	48	> 4800	> 4800	> 4800	> 4800	-	-	2400	> 4800
	72	> 4800	> 4800	> 4800	> 4800	-	-	2400	> 4800
Kyselina rozmarýnová	24	4800	-	4800	-	4800	-	-	-
	48	4800	-	4800	-	4800	-	-	-
	72	4800	-	4800	-	4800	-	-	-
Kvercetin	24	9600	-	9600	-	4800	-	-	-
	48	9600	-	9600	-	4800	-	-	-
	72	9600	-	9600	-	4800	-	-	-

¹ doba hodnocení po hodinách ² neprovedeno

Tabulka 6b: Hodnoty MIC a MBC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v 1% ethanolu pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	t^1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 17)		<i>Escherichia coli</i> (n = 6)		<i>Proteus mirabilis</i> (n = 7)		<i>Providencia stuartii</i> (n = 3)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Kyselina gallová	24	150 - 300	2400 - 4800	4800	4800	2400	2400	1200	4800
	48	150 - 300	2400 - 4800	4800	4800	2400	2400	1200	4800
	72	150 - 300	2400 - 4800	4800	4800	2400	2400	1200	4800
Methyl-gallát	24	600 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	2400	2400	- ²	-
	48	600 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	2400	2400	-	-
	72	600 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	1200 - 2400	2400	2400	-	-
Ethyl-gallát	24	600 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	2400	2400	-	-
	48	600 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	2400	2400	-	-
	72	600 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	2400	2400	-	-
Propyl-gallát	24	1200 - 2400	-	2400	2400	2400	2400	-	-
	48	1200 - 2400	-	2400	2400	2400	2400	-	-
	72	1200 - 2400	-	2400	2400	2400	2400	-	-
Oktyl-gallát	24	1200 - 4800	1200 - 4800	300	300	-	-	150	150
	48	1200 - 4800	1200 - 4800	600	600	-	-	150	150
	72	1200 - 4800	1200 - 4800	600	600	-	-	150	150
<i>p</i> -cymen	24	$38,4 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	-	-
	48	$38,4 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	-	-
	72	$38,4 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	$19,2 \times 10^3$	-	-	-

¹ doba hodnocení po hodinách

² neprovedeno

Tabulka 7a: Hodnoty MIC, MBC a MFC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v 1% ethanolu pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	T ¹	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 20)		<i>Staphylococcus</i> sp. (n = 7)		Beta-hemolytické streptokoky (n = 4)		<i>Klebsiella</i> sp. (n = 4)		<i>Candida catenulata</i> (n = 1)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
Thymol	24	150 - 1200	150 - 1200	300 - 600	300 - 600	600	600	150	300	300	300
	48	150 - 1200	150 - 1200	300 - 600	300 - 600	600	600	300	300	300	300
	72	150 - 1200	150 - 1200	300 - 600	300 - 600	600	600	300	300	300	300
Karvakrol	24	75 - 600	75 - 600	300 - 600	300 - 600	300	300	2400	2400	75	75
	48	75 - 600	75 - 600	300 - 600	300 - 600	300	300	2400	2400	150	150
	72	75 - 600	75 - 600	300 - 600	300 - 600	300	300	2400	2400	150	150
Eugenol	24	1200 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	1200	1200	2400	2400	1200	1200
	48	1200 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	1200	1200	2400	2400	1200	1200
	72	1200 - 2400	1200 - 2400	600 - 2400	600 - 2400	1200	1200	2400	2400	1200	1200
Knicin	24	600 - 1200	600-4800	- ²	-	300	300	1200	1200	1200	1200
	48	600 - 1200	1200-4800	-	-	300	300	1200	1200	1200	1200
	72	600 - 1200	1200-4800	-	-	300	300	1200	1200	1200	1200
Kyselina usnová	24	4,7 - 37,5	-	9,4	-	4,7	-	> 9600	> 9600	> 9600	> 9600
	48	9,4 - 37,5	-	9,4	-	9,4	-	> 9600	> 9600	> 9600	> 9600
	72	9,4 - 37,5	-	9,4	-	9,4	-	> 9600	> 9600	> 9600	> 9600
Kyselina rozmarýnová	24	9600	-	4800	-	-	-	-	-	-	-
	48	9600	-	4800	-	-	-	-	-	-	-
	72	9600	-	4800	-	-	-	-	-	-	-
Kvercetin	24	19,2x10 ³	-	19,2x10 ³	-	-	-	-	-	-	-
	48	19,2x10 ³	-	19,2x10 ³	-	-	-	-	-	-	-
	72	19,2x10 ³	-	19,2x10 ³	-	-	-	-	-	-	-

¹ doba hodnocení po hodinách ² neprovedeno

Tabulka 7b: Hodnoty MIC, MBC a MFC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vybraných přírodních látek rozpuštěných v 1% ethanolu pro mikroorganismů vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků zjištěné v jednotlivých časových intervalech mikrodiluční metodou

Testovaná sloučenina	T^1	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 20)		<i>Staphylococcus</i> sp. (n = 7)		Beta-hemolytické streptokoky (n = 4)		<i>Klebsiella</i> sp. (n = 4)		<i>Candida catenulata</i> (n = 1)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
Kyselina gallová	24	> 4800	> 4800	2400 - 4800	4800	4800	4800	4800	4800	4800	> 4800
	48	> 4800	> 4800	2400 - 4800	4800	4800	4800	4800	4800	> 4800	> 4800
	72	> 4800	> 4800	2400 - 4800	4800	4800	4800	4800	4800	> 4800	> 4800
Methyl-gallát	24	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	- ²	-	-	-	-	-
	48	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	-	-	-	-	-	-
	72	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	-	-	-	-	-	-
Ethyl-gallát	24	2400 - 4800	2400 - 4800	600 - 2400	600 - 2400	-	-	-	-	-	-
	48	2400 - 4800	2400 - 4800	600 - 2400	600 - 2400	-	-	-	-	-	-
	72	2400 - 4800	2400 - 4800	600 - 2400	600 - 2400	-	-	-	-	-	-
Propyl-gallát	24	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	-	-	-	-	-	-
	48	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	-	-	-	-	-	-
	72	2400 - 4800	2400 - 4800	1200 - 2400	1200 - 2400	-	-	-	-	-	-
Oktyl-gallát	24	37,5 - 75	37,5 - 75	-	-	18,8	18,8	-	-	4,7	4,7
	48	75 - 150	75 - 150	-	-	18,8	18,8	-	-	4,7	4,7
	72	75 - 150	75 - 150	-	-	18,8	18,8	-	-	4,7	4,7
<i>p</i> -cymen	24	$38,4 \times 10^3$	$38,4 \times 10^3$	$19,2 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-
	48	$38,4 \times 10^3$	$38,4 \times 10^3$	$19,2 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-
	72	$38,4 \times 10^3$	$38,4 \times 10^3$	$19,2 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-

¹ doba hodnocení po hodinách ² neprovedeno

4.3 MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ A MINIMÁLNÍ BAKTERICIDNÍ KONCENTRACE TESTOVANÝCH LÁTEK V KOMBINACI

Přírodní sloučeniny k testování jejich účinků ve vzájemných kombinacích jsme rovněž rozpouštěli v 1% ethanolu. DMSO jsme již k rozpouštění pro tyto účely nepoužívali. Zjištění MIC₅₀ a MBC₅₀ přírodních látek v kombinaci uvádíme u druhů *Ps. aeruginosa* (n = 10), *E. faecalis* (n = 6) a *E. faecium* (n = 6), které patří mezi problematické z hlediska přirozené rezistence k některým antibiotikům, používaným k dekontaminaci ejakulátů kanců. Výsledky účinnosti látek v kombinaci na uvedené mikroby vykultivované z ejakulátů kanců jsou přehledně zpracovány v Tabulkách 8a – f. Hodnoty MIC a MBC jsme odečítali po 24, 48 a 72 hodinách. V tabulkách jsou zaznamenány pouze hodnoty účinných koncentrací zjištěných po 48 hodinách, neboť rozdíly v MIC a MBC po 48 a 72 hodinách nebyly významné.

Nejlepší účinky jsme zaznamenali u kombinací thymolu s EDTA (Tabulka 8a), karvakrolu s EDTA (Tabulka 8b) a thymolu s karvakrolem (Tabulka 8a). Synergické účinky jsme zjistili zejména u karvakrolu v kombinaci s EDTA na kmeny *E. faecalis* a *Ps. aeruginosa*. Hodnoty MIC₅₀ karvakrolu a EDTA samostatně pro kmeny *E. faecalis* byly 300 µg.ml⁻¹ a 600 µg.ml⁻¹. Ve směsi došlo ke snížení MIC₅₀ karvakrolu a EDTA na 37,5 µg.ml⁻¹ a 150 µg.ml⁻¹. U kmenů *Ps. aeruginosa* došlo k snížení MIC₅₀ karvakrolu a EDTA z 600 µg.ml⁻¹ a 1200 µg.ml⁻¹ na 75 µg.ml⁻¹ a 150 µg.ml⁻¹. Hodnoty MBC₅₀ karvakrolu ve směsi s EDTA pro uvedené bakterie byly shodné s MIC₅₀.

Dále jsme prokázali synergické účinky na všechny kmeny enterokoků u kombinace knicinu s EDTA (Tabulka 8f), kde došlo ve směsi k 3 – 6 násobnému snížení hodnot MIC₅₀ a MBC₅₀ ve srovnání s účinnými koncentracemi samostatně testovaných látek. Synergické účinky jsme rovněž zjistili u kombinace karvakrolu s thymolem pro kmeny *E. faecalis* a u kombinace karvakrolu s methyl-gallátem pro kmeny *Ps. aeruginosa*.

Antagonistické účinky jsme zjistili u kombinace knicinu s kyselinou usnovou pro kmeny *Ps. aeruginosa* a další gramnegativní bakterie. Tyto výsledky v tabulkách neuvádíme.

Tabulka 8a: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (µg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Thymol	EDTA	Thymol+EDTA	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 6)	MIC ₅₀	600	600	300+18,8	0,53	ADI
	MBC ₅₀	600	1200	300+37,5	0,53	ADI
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 6)	MIC ₅₀	600	300	150+75	0,50	SYN
	MBC ₅₀	600	600	75+150	0,50	SYN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 10)	MIC ₅₀	600	1200	150+75	0,31	SYN
	MBC ₅₀	1200	1200	150+75	0,19	SYN

		Thymol	Methyl-gallát	Thymol+methyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 6)	MIC ₅₀	600	2400	300+300	0,63	ADI
	MBC ₅₀	600	2400	¹	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 10)	MIC ₅₀	600	1200	300+300	0,75	ADI
	MBC ₅₀	1200	1200	600+600	1,00	ADI

		Thymol	Ethyl-gallát	Thymol+ethyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 6)	MIC ₅₀	600	2400	300+300	0,63	ADI
	MBC ₅₀	600	2400	600+600	1,25	IND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 10)	MIC ₅₀	600	1200	600+600	1,5	IND
	MBC ₅₀	1200	2400	600+600	0,75	ADI

		Thymol	Karvakrol	Thymol+karvakrol	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n = 6)	MIC ₅₀	600	300	75+75	0,38	SYN
	MBC ₅₀	600	600	150+150	0,5	SYN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 10)	MIC ₅₀	600	600	300+600	1,5	IND
	MBC ₅₀	1200	1200	300+600	0,75	ADI

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

¹ nehodnoceno

Tabulka 8b: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (µg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Thymol	Eugenol	Thymol+eugenol	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus</i>	MIC ₅₀	600	2400	600+600	1,25	IND
<i>faecalis</i> (n=6)	MBC ₅₀	600	2400	600+600	1,25	IND
<i>Pseudomonas</i>	MIC ₅₀	600	2400	1200+1200	2,5	IND
<i>aeruginosa</i> (n=10)	MBC ₅₀	1200	2400	1200+1200	1,5	IND

		Thymol	Knicin	Thymol+knicin	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus</i>	MIC ₅₀	600	600	300+300	1,00	ADI
<i>faecalis</i> (n=6)	MBC ₅₀	600	2400	300+300	0,63	ADI
<i>Pseudomonas</i>	MIC ₅₀	600	300	300+600	1,5	IND
<i>aeruginosa</i> (n=10)	MBC ₅₀	1200	600	300+1200	2,5	IND

		Karvakrol	EDTA	Karvakrol+EDTA	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus</i>	MIC ₅₀	300	600	37,5+150	0,38	SYN
<i>faecalis</i> (n=6)	MBC ₅₀	600	1200	37,5+150	0,19	SYN
<i>Enterococcus</i>	MIC ₅₀	150	300	150+75	1,25	IND
<i>faecium</i> (n = 6)	MBC ₅₀	150	600	150+75	1,13	IND
<i>Pseudomonas</i>	MIC ₅₀	600	1200	75+150	0,25	SYN
<i>aeruginosa</i> (n=10)	MBC ₅₀	1200	1200	75+150	0,19	SYN

		Karvakrol	Methyl-gallát	Karvakrol+methyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus</i>	MIC ₅₀	300	2400	300+300	1,13	IND
<i>faecalis</i> (n=6)	MBC ₅₀	600	2400	300+300	0,63	ADI
<i>Pseudomonas</i>	MIC ₅₀	600	1200	150+300	0,50	SYN
<i>aeruginosa</i> (n=10)	MBC ₅₀	1200	1200	150+300	0,38	SYN

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

Tabulka 8c: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (μg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Karvakrol	Ethyl-gallát	Karvakrol+ethyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	300	2400	300+300	1,13	IND
	MBC ₅₀	600	2400	300+300	0,63	ADI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	600	1200	600+600	1,50	IND
	MBC ₅₀	1200	2400	600+600	0,75	ADI

		Karvakrol	Knicin	Karvakrol+knicin	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	300	600	150+600	1,50	IND
	MBC ₅₀	600	2400	150+1200	0,75	ADI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	600	300	600+300	2,00	IND
	MBC ₅₀	1200	600	600+300	1,00	ADI

		Eugenol	EDTA	Eugenol+EDTA	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	2400	600	75+600	1,03	IND
	MBC ₅₀	2400	1200	75+600	0,53	ADI
<i>Enterococcus faecium</i> (n = 6)	MIC ₅₀	2400	300	1200+75	0,75	ADI
	MBC ₅₀	2400	600	1200+300	1,00	ADI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	2400	1200	600+75	0,31	SYN
	MBC ₅₀	2400	1200	1200+75	0,56	ADI

		Eugenol	Knicin	Eugenol+knicin	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	2400	600	2400+1200	3	IND
	MBC ₅₀	2400	2400	2400+1200	1,5	IND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	2400	300	150+300	1,06	IND
	MBC ₅₀	2400	600	150+300	0,56	ADI

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

Tabulka 8d: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (μg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Kyselina gallová	EDTA	Kyselina gallová+EDTA	FICI/ FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	> 4800	300	4800+1200	- ¹	-
	MBC ₅₀	> 4800	600	4800+1200	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	600	150+600	1,5	IND
	MBC ₅₀	4800	1200	300+1200	1,06	IND

		Kyselina gallová	Thymol	Kyselina gallová+thymol	FICI/ FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	> 4800	600	1200+300	-	-
	MBC ₅₀	> 4800	600	1200+300	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	600	150+300	1,00	ADI
	MBC ₅₀	4800	1200	150+300	0,28	SYN

		Kyselina gallová	Karvakrol	Kyselina gallová+karvakrol	FICI/ FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	> 4800	300	1200+600	-	-
	MBC ₅₀	> 4800	600	1200+600	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	600	300+300	1,50	IND
	MBC ₅₀	4800	1200	1200+600	0,75	ADI

		Kyselina gallová	Knicin	Kyselina gallová+knicin	FICI/ FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	> 4800	600	300+600	-	-
	MBC ₅₀	> 4800	2400	300+600	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	300	75+75	0,50	SYN
	MBC ₅₀	4800	600	75+75	0,14	SYN

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

¹ nehodnoceno

Tabulka 8e: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (µg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Kyselina gallová	Oktyl-gallát	Kyselina gallová+ oktyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	> 4800	75	4800+75	- ¹	-
	MBC ₅₀	> 4800	75	4800+75	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	MIC ₅₀	4800	150	600+75	0,63	ADI
	MBC ₅₀	4800	150	600+75	0,63	ADI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	4800	300+300	1,06	IND
	MBC ₅₀	4800	4800	300+600	0,19	SYN

		Oktyl-gallát	EDTA	Oktyl-gallát+EDTA	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	75	300	75+300	2,00	IND
	MBC ₅₀	75	600	75+300	1,50	IND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	4800	600	600+600	1,13	IND
	MBC ₅₀	4800	1200	1200+600	0,75	ADI

		Knicin	Oktyl-gallát	Knicin+oktyl-gallát	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	600	75	300+37,5	1,00	ADI
	MBC ₅₀	2400	75	300+37,5	0,63	ADI
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	MIC ₅₀	1200	150	300+150	1,25	IND
	MBC ₅₀	1200	150	300+150	1,25	IND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10)	MIC ₅₀	300	4800	300+150	1,03	IND
	MBC ₅₀	600	4800	300+150	0,53	ADI

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

¹ nehodnoceno

Tabulka 8f: Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ (µg.ml⁻¹) kombinací testovaných látek zjištěné mikrodiluční metodou a analýza jejich vzájemných interakcí pro mikroorganismy vykultivované z kančích ejakulátů a ostatních klinických vzorků

		Knicin	Kyselina usnová	Knicin+kyselina usnová	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	600	18,8	9,4+18,8	1,02	IND
	MBC ₅₀	2400	18,8	9,4+18,8	1,01	IND
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	MIC ₅₀	1200	9,4	18,8+9,4	1,01	IND
	MBC ₅₀	1200	9,4	18,8+9,4	1,01	IND

		Knicin	EDTA	Knicin+EDTA	FICI/FBCI	Efekt
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	MIC ₅₀	600	600	75+75	0,25	SYN
	MBC ₅₀	2400	1200	75+75	0,09	SYN
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	MIC ₅₀	1200	300	300+75	0,50	SYN
	MBC ₅₀	1200	600	300+75	0,38	SYN

FICI: index frakční inhibiční koncentrace, FBCI: index frakční baktericidní koncentrace

MIC₅₀: minimální inhibiční koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

MBC₅₀: minimální baktericidní koncentrace pro 50 % bakteriálních buněk

SYN (synergický efekt): FICI, FBCI ≤ 0,5

ADI (aditivní efekt): FICI, FBCI > 0,5 až ≤ 1

IND (indiferentní efekt): FICI, FBCI > 1 až ≤ 4

ANT (antagonistický efekt): FICI, FBCI > 4

¹ *nehodnoceno*

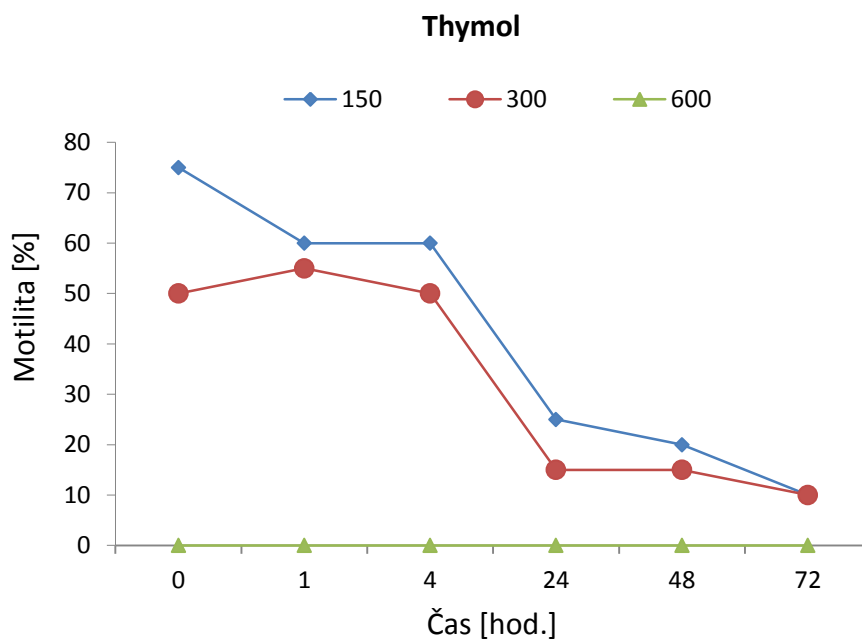
4.4 SPERMIOTOXICITA TESTOVANÝCH LÁTEK PRO KANČÍ POHLAVNÍ BUŇKY

Toxické účinky přírodních látek pro spermie kanců jsme ověřovali ve spolupráci s pracovníky Výzkumného ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí. U nativních ejakulátů byly bezprostředně po jejich získání zjišťovány a do protokolu zaznamenávány spermatologické parametry, zejména progresivní motilita, aglutinace spermií nebo různé deformity. Kančí ejakulát bylo nutné odebrat před začátkem vlastního experimentu. Motilita spermií byla hodnocena mikroskopii v zástinu při 150-ti násobném zvětšení (provedení, viz kap. 3.7).

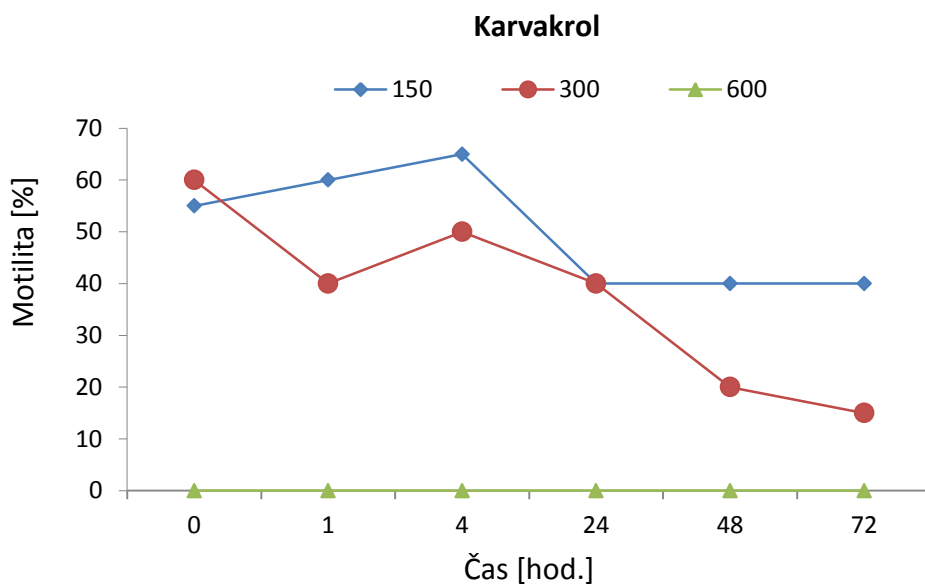
Výsledky stanovení spermiotoxicity přírodní látek jsou uvedeny níže (Obr. 25 – 36). Koncentrace přírodních látek v grafech jsou uvedeny v $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Motilita je vyjádřena v % pohyblivých spermií. K ředění přírodních látek jsme používali BTS ředidlo bez antibiotik.

Nejméně ovlivňovala kančí pohlavní buňky EDTA, v ejakulátu obsahujícím tuto sloučeninu v množství 300 – 600 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ bylo i po 72 hodinách inkubace patrné 35 % pohyblivých spermií (viz Obr. 36). U esterů kyseliny gallové, methyl-gallátu a ethyl-gallátu jsme zaznamenali nízkou toxicitu pro spermie. V ejakulátu obsahujícím 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ methyl-gallátu jsme pozorovali 30 % a 15 % pohyblivých spermií za 72 hodin. U ethyl-gallátu v množství 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ jsme za 72 hodin zjistili 45 % motilních kančích pohlavních buněk. Nízkou toxicitu jsme rovněž zjistili u karvakrolu, kde při koncentracích 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ bylo i po 72 hodinové inkubaci mikroskopicky patrné 10-40 % motilních spermií (viz Obr. 26).

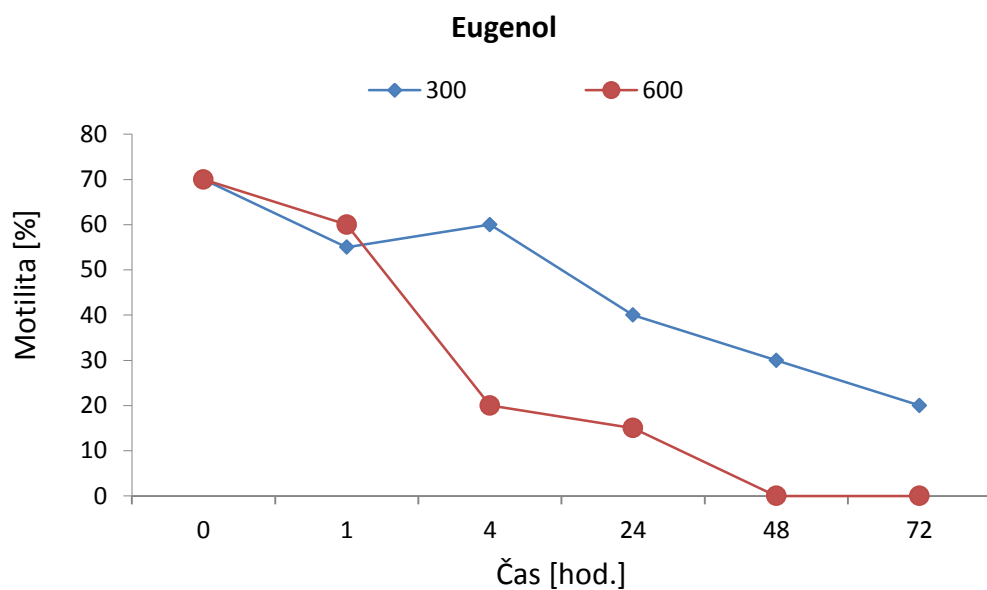
Nejvyšší toxicitu pro spermie jsme prokázali u oktyl-gallátu a knicinu. U všech testovaných koncentrací oktyl-gallátu a knicinu po 24 hodinách inkubace při 17°C nebyly mikroskopicky patrné pohyblivé spermie (viz Obr. 32 a 33). U propyl-gallátu dokonce ustal pohyb spermií ve všech koncentracích bezprostředně po jeho přidání (viz Obr. 31).



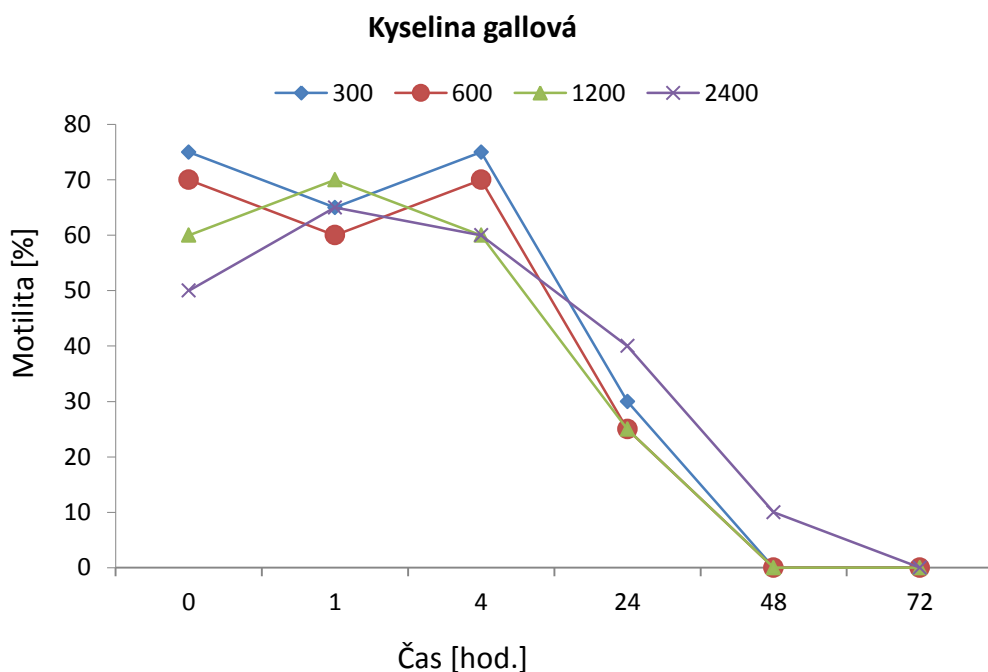
Obrázek 25: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) thymolu v časových intervalech



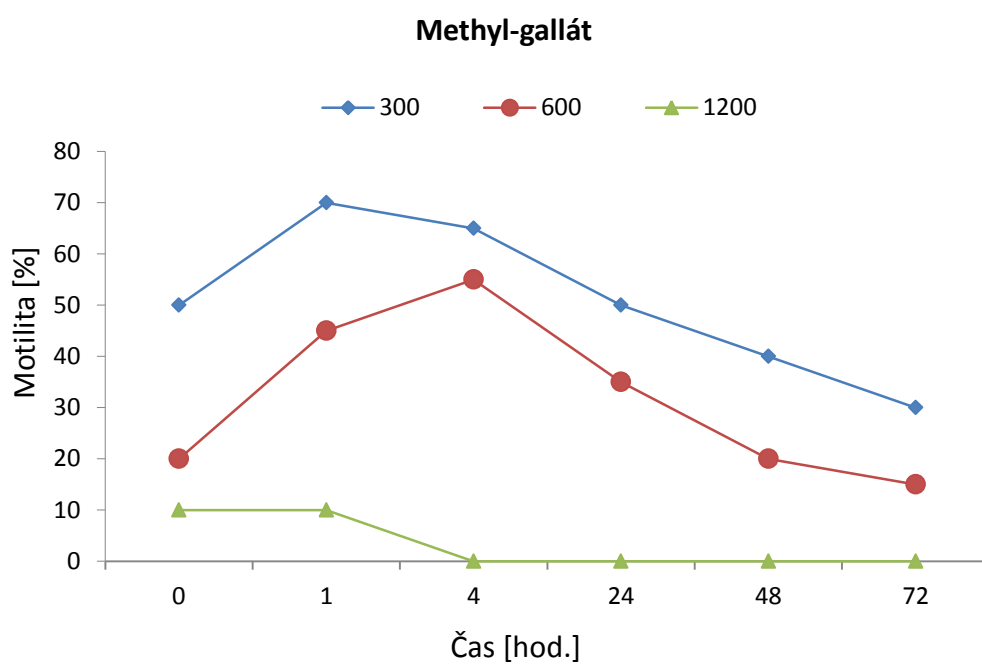
Obrázek 26: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) karvakrolu v časových intervalech



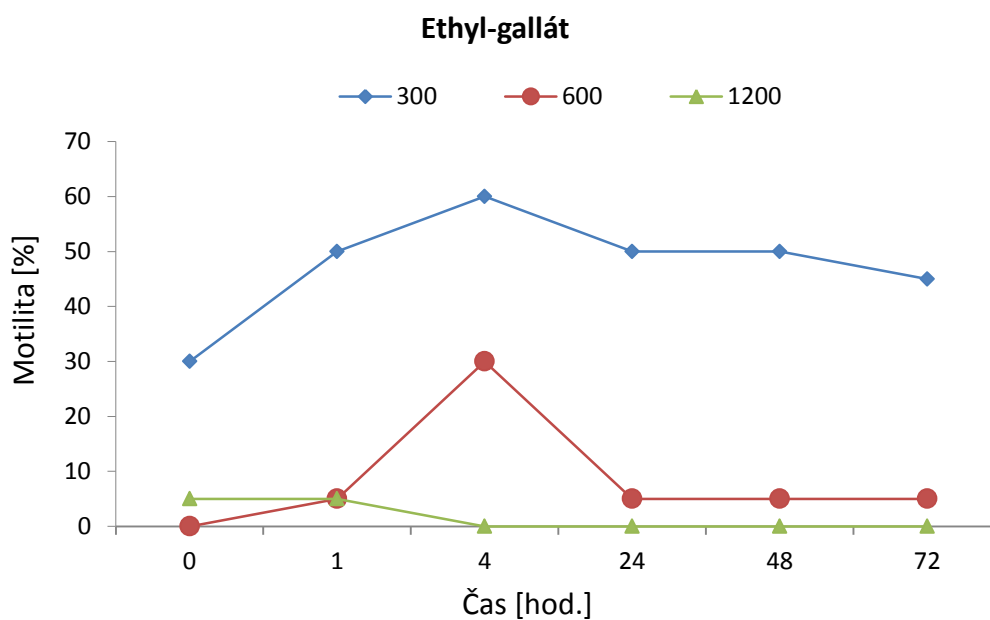
Obrázek 27: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) eugenolu v časových intervalech



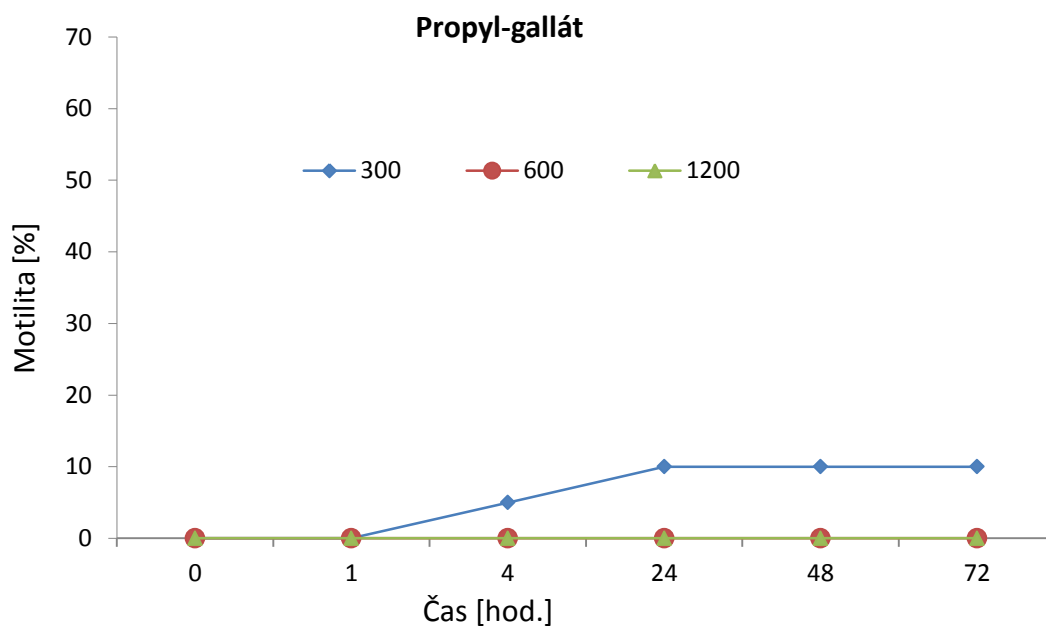
Obrázek 28: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) kyseliny gallové v časových intervalech



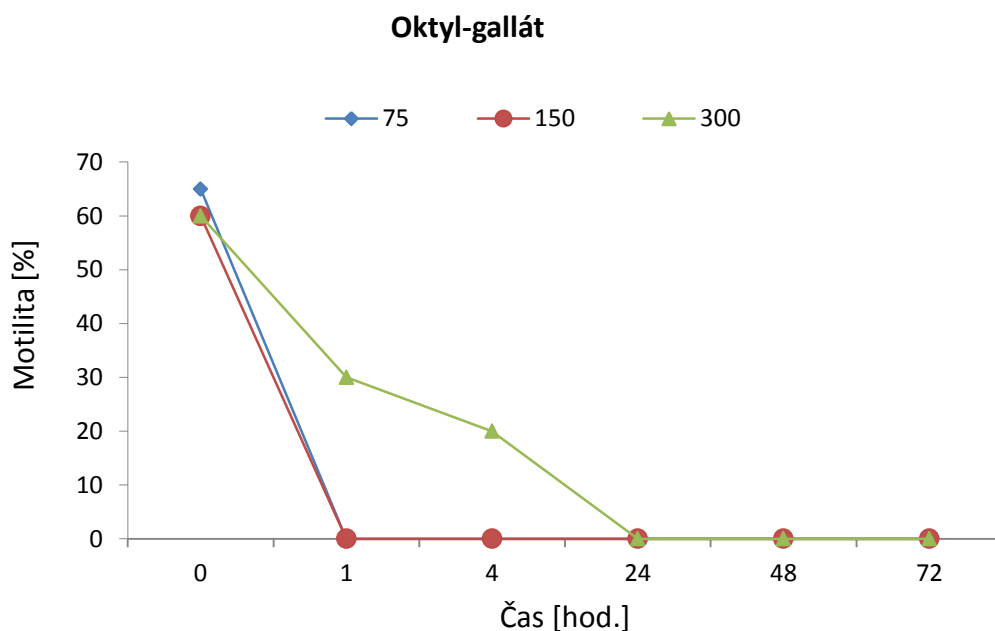
Obrázek 29: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) methyl-gallátu v časových intervalech



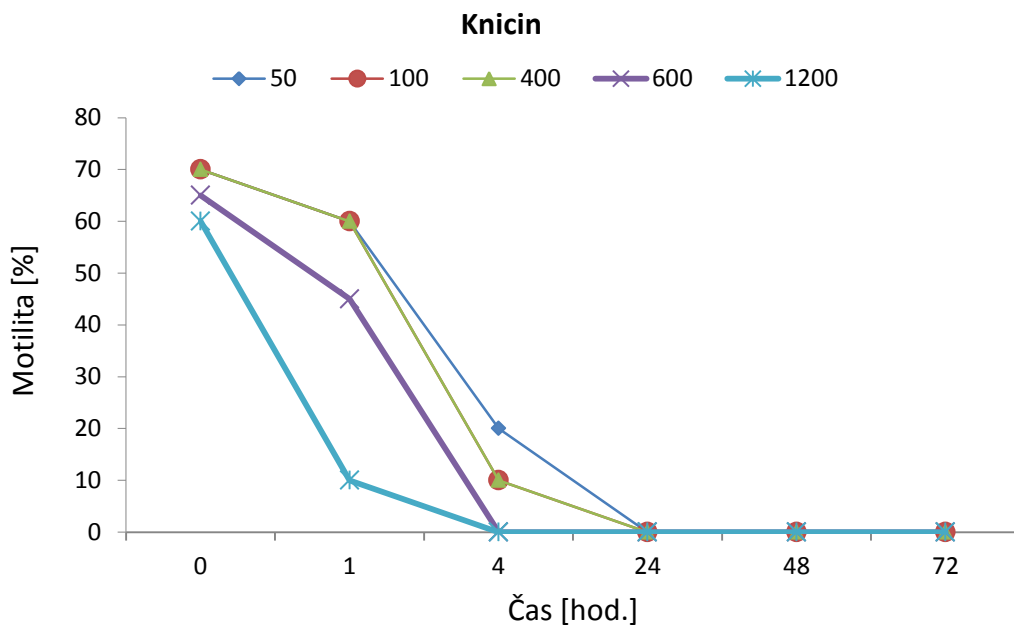
Obrázek 30: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) ethyl-gallátu v časových intervalech



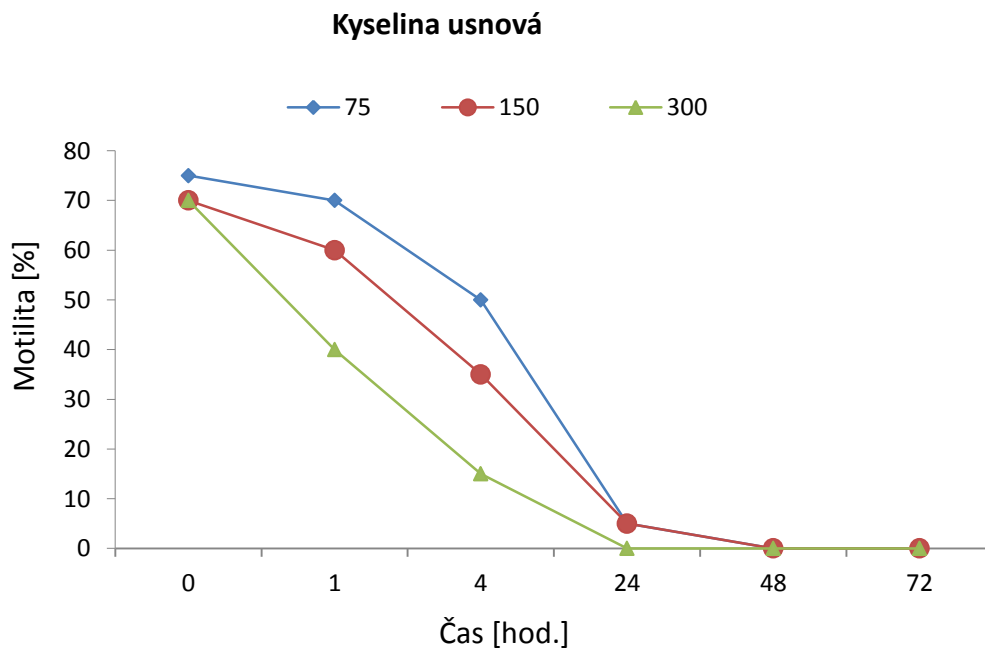
Obrázek 31: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) propyl-gallátu v časových intervalech



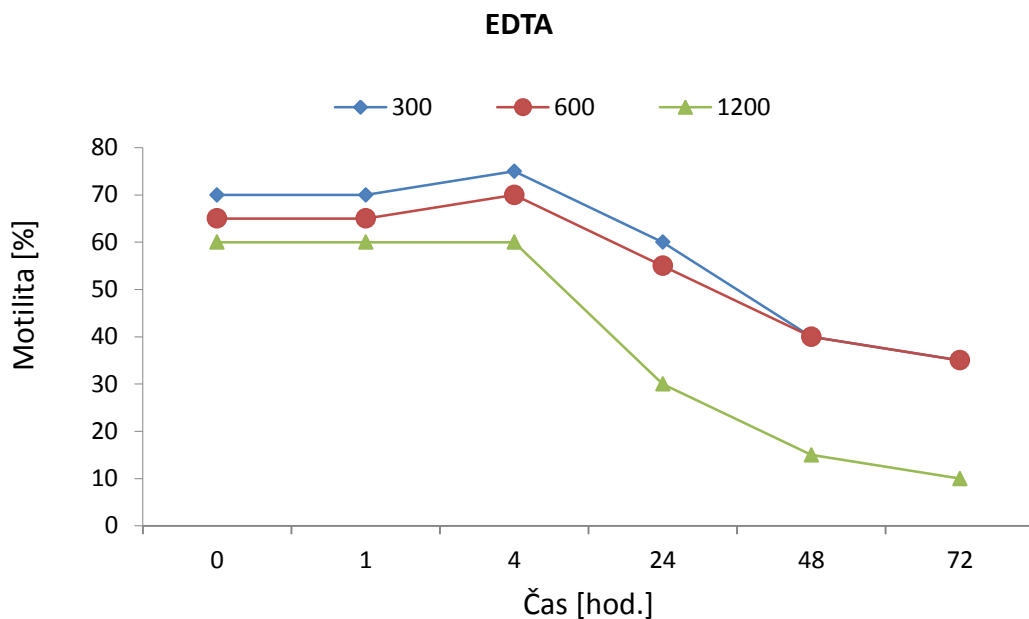
Obrázek 32: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) oktyl-gallátu v časových intervalech



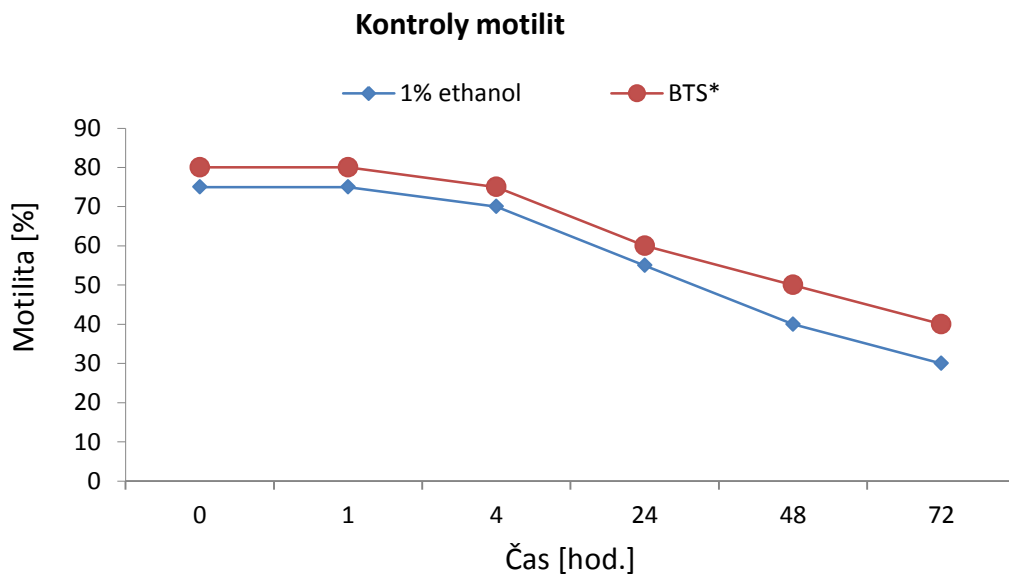
Obrázek 33: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) knicinu v časových intervalech



Obrázek 34: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) kyseliny usnové v časových intervalech



Obrázek 35: Vyjádření závislosti motility kančích spermií v různých koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) EDTA v časových intervalech



* ředící roztok rutinně používaný k ředění ejakulátů kanců

Obrázek 36: Kontrolní stanovení motility kančích spermií v BTS ředidle a ředidle s 1% ethanolem v časových intervalech

5 DISKUZE

Výsledek umělé inseminace mohou ovlivnit různé, negativně působící faktory. Mezi významné patří i použití ejakulátů kontaminovaných mikroorganismy v různém kvalitativním i kvantitativním zastoupení. V nativních ejakulátech kanců jsou často přítomny druhy čeledi *Enterobacteriaceae* zejména rody *Escherichia*, *Enterobacter* a *Proteus*, dále enterokoky, stafylokoky a *Pseudomonas aeruginosa*. Většina z nich patří mezi podmíněně patogenní, metabolicky velmi aktivní druhy, které nejen, že snižují biologickou kvalitu spermatu, podílejí se na aglutinaci pohlavních buněk a zhoršují jejich motilitu i viabilitu, ale mohou se podílet také na vyvolání zánětlivých procesů na děložní sliznici prasnic (Althouse, 2008).

K eliminaci nežádoucí mikroflóry jsou používána různá antibiotika a to jednotlivě nebo v různých kombinacích, která jsou přidávána do konzervačních roztoků. Vzhledem k narůstající rezistenci mikrobů na antibiotika následkem častého používání až „nadužívání“ nejen k léčebným účelům, je nezbytná jejich eliminace, případně náhrada těchto léčiv za jiné účinné sloučeniny.

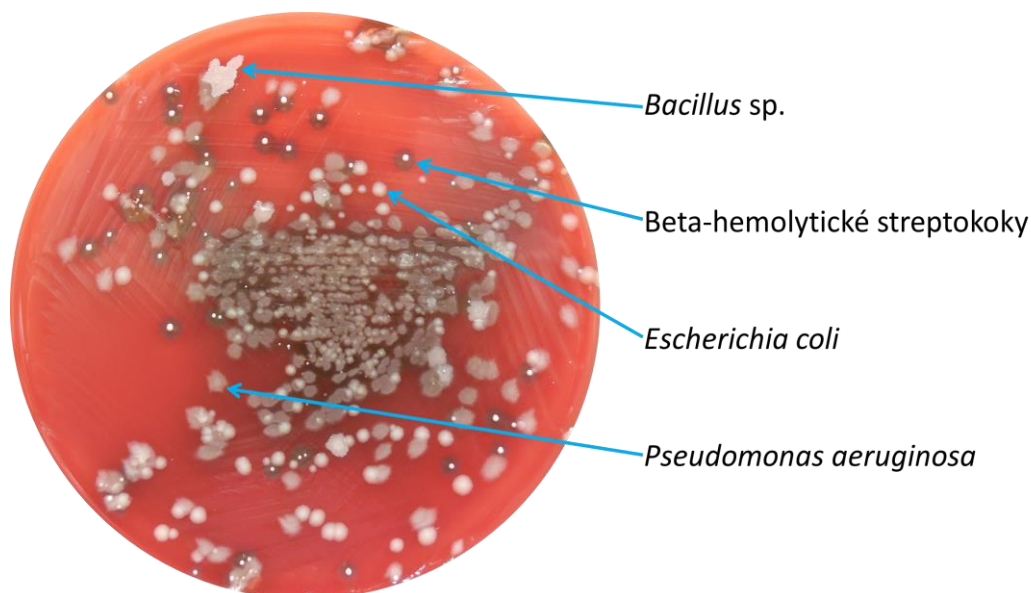
Jednou z možností alternativního řešení je využití přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. Je však nutné ovládat vhodné metody pro zjištění antimikrobiálních a toxických účinků přírodních látek. Práce je proto zaměřena na ověření metod pro zjištění antimikrobiálních účinků vybraných přírodních látek a stanovení jejich toxických účinků pro spermie s cílem využití těchto látek k dekontaminaci ejakulátů kanců.

Bakteriologickým vyšetřením jsme prokázali, že mezi nejčastější bakterie kontaminující ejakuláty kanců patří *Ps. aeruginosa*, druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*, koaguláza-negativní stafylokoky, enterokoky a streptokoky. Naše zjištění se shodují s výsledky autorů Bresciani *et al.* (2014); Dagnall *et al.* (1984); Sone *et al.* (1989); Althouse *et al.* (2005). Běžný mikrobiologický nález v ejakulátu kance je pro lepší představu znázorněn na Obrázku 37. Vzhledem k rozmanitosti mikrobů vyskytujícím se v ejakulátech kanců lze inseminačním stanicím doporučit jejich pravidelné vyšetření.

Zejména *Ps. aeruginosa* je jedním ze závažných podmíněně patogenních druhů, který jsme často kultivovali z ejakulátů kanců. Jedná se o bakterii, která je přirozeně rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům (penicilin, aminopeniciliny, chráněné aminopeniciliny, cefalosporiny 1., 2. a částečně 3. generace), dále k trimetoprimu a kotrimoxazolu. Uvedený druh však pod selekčním tlakem antibiotik může získat rezistenci k většině dostupných antibakteriálních léčiv včetně chinolonů, karbapenemů, aminoglykosidů a ureidopenicilinů.

Za získanou rezistencí je zodpovědná především produkce beta-laktamáz, aktivní efflux, změněná permeabilita až impermeabilita vnější membrány a modifikace cílového místa pro působení antibiotik (Strateva *et* Yordanov, 2009). Z výše uvedeného je zřejmé, o jak nebezpečný druh se jedná a je nevhodné jej vystavovat selekčnímu tlaku antibiotik přidávaných do kančích ejakulátů.

Další nebezpečí přítomnosti *Ps. aeruginosa* v ejakulátu kanců spočívá v jeho schopnosti množit se i při nižších teplotách (15 - 17°C), při kterých se skladují inseminační dávky. Uvedený druh významně snižuje množství spermií s progresivní motilitou, jejich vitalitu a integritu akrozomu. Jedná se o mikroorganismus odolný k nepříznivým podmínkám prostředí a rychle se šířící mezi kanci chovanými v inseminačních stanicích. I při dodržování hygienických opatření je eliminace *Ps. aeruginosa* z prostředí problematická. Opakovaně byla prokázána i rezistence *Ps. aeruginosa* k běžně používaným dezinfekčním látkám, zejména z důvodu použití nedostatečně koncentrovaných dezinfekčních roztoků nebo nedodržení dezinfekčního programu. V přítomnosti sub-inhibiční koncentrace dezinfekční látky dochází k selekčnímu tlaku na *Ps. aeruginosa* mající za následek přežití odolnějších druhů, které jsou pak rezistentní i k dezinfekční látce o správné koncentraci. Nejinak je tomu v nemocničních zařízeních, kde je *Ps. aeruginosa* závažným, často multi-rezistentním nozokomiálním patogenem i z výše uvedených důvodů (Strateva *et* Yordanov, 2009).



Obrázek 37: Ukázka mikrobiologického nálezu nativního neředěného kančího ejakulátu kultivovaného na krevním agaru

Dalším závažným druhem je *Escherichia coli*, které je přisuzována schopnost aglutinace spermií. Bakterie přítomné v ejakulátech kanců ochuzují pohlavní buňky o živiny za vzniku často i toxických metabolitů, které nepříznivě ovlivňují biologickou kvalitu spermatu (Bresciani *et al.*, 2014; Sepúlveda *et al.*, 2014).

Problematickými bakteriemi jsou rovněž enterokoky. Patří mezi mikroby přirozeně rezistentní k první až třetí generaci cefalosporinů, jsou často rezistentní k aminoglykosidům včetně gentamicinu, který je používán pro dekontaminaci ejakulátu kanců. Pro *E. faecium* je charakteristická přirozená rezistence k ampicilinu, který je rovněž přidáván do konzervačních roztoků spermatu kanců v kombinaci s gentamicinem. U dalších druhů může být citlivost k uvedenému antibiotiku snižena (Mazurová *et Vinter*, 1991). Také narůstá počet kmenů rezistentních ke glykopeptidům a linezolidu, rezervním antibiotikům určeným k léčbě závažných infekcí u lidí (Hollenbeck *et Rice*, 2012; Ntokou *et al.*, 2012; Kristich *et al.*, 2014). Enterokoky použité v naší práci byly izolovány jak z kančích ejakulátů, tak z humánního klinického materiálu. Enterokoky vykultivované z kančích ejakulátů nebo z humánního klinického materiálu jsme ve výsledcích neodlišovali (viz Tab. 7a, b), jelikož výsledky citlivosti k přírodním látkám byly totožné.

Z mikroorganismů zařazených do studie tedy považujeme z hlediska rezistence na antimikrobiální léčiva nejzávažnější *Ps. aeruginosa* a enterokoky. Neustálé používání antibiotik, ke kterým jsou uvedené bakterie přirozeně rezistentní, vede k selekci a dalšímu navyšování jejich rezistence na antimikrobiální léčiva.

S cílem náhrady antibiotik přidávaných do konzervačních roztoků používaných při přípravě inseminačních dávek jsme po zavedení a vybrání vhodných metod ověřili antimikrobiální účinky velkého počtu přírodních látek, z nichž v této práci jich uvádíme 19 včetně silic a EDTA. Na podkladě získaných výsledků jsme vybrali 10 přírodních látek (thymol, karvakrol, eugenol, kyselina gallová, methyl-gallát, ethyl-gallát, propyl-gallát, oktyl-gallát, kyselina usnová, knicin) a EDTA, u kterých jsme dále zjišťovali jejich MIC, MBC a toxicitu pro kančí spermie.

U těchto sloučenin jsme mikrodiluční metodou rovněž zjišťovali hodnoty MIC a MBC jejich dvojkombinací. Pro hodnocení účinků dvojkombinací jsme pro zjednodušení používali hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀. Vzájemné interakce dvojkombinací přírodních látek a EDTA jsme hodnotili zjištěním indexu frakční inhibiční a baktericidní koncentrace (FICI, FBCI). V testech jsme používali referenční kmeny *E. faecalis* CCM 4224, *Ps. aeruginosa* CCM 3955, *St. aureus* CCM 4223 a *E. coli* CCM 3954, dále kmeny enterokoků (n = 19) a *Ps. aeruginosa* (n = 17) vykultivované z kančích ejakulátů a kmeny další. Přírodní

sloučeniny jsme během počátečních měření rozpouštěli v 5% DMSO a 1% ethanolu, později pouze v ethanolu.

Některé sloučeniny jsme vyřadili, často z důvodu špatné rozpustnosti (kvercetin) nebo pro velmi vysoké hodnoty účinných koncentrací na mikroorganismy (většina silic, *p*-cymen, kvercetin, kyselina rozmarýnová). Dále jsme z dalšího testování vyřadili silice z důvodu špatné opakovatelnosti měření pro variabilní množství účinných složek, které obsahují.

5.1 ZHODNOCENÍ METOD PRO STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK

Pro zjišťování antimikrobiálních účinků přírodních látek jsme použili tři metodické postupy – mikrodiluční metodu, diluční metodu a agarovou diluční metodu. Nejlépe se nám z hlediska reprodukovatelnosti, časové, pracovní i ekonomické náročnosti osvědčilo stanovení antimikrobiálních účinků přírodních látek mikrodiluční metodou, kdy lze v jedné 96-jamkové destičce otestovat až 10 různých koncentrací jedné přírodní látky a provádění opakování v rámci jedné destičky. Vlastní provedení významně urychluje použití vícekanálové pipety. Další pozitivem je o řád nižší spotřeba chemikálií a živných médií ve srovnání s diluční metodou ve zkumavkách. Nevýhodou může být menší objem směsi média, přírodní látky a mikrobiální suspenze v jamkách (150 μ l), kdy po prolongované inkubační době dochází k vysychání média a tím zkreslování výsledků. V našem testování jsme však za hraniční inkubační dobu zvolili 72 hodin, při které objem jamek zůstává konstantní. Vzhledem k výše uvedenému jsme tuto metodu zvolili rovněž pro testování antimikrobiálních účinků přírodních látek v kombinacích.

Mikrodiluční metodu zvolili Francolini *et al.* (2001) pro stanovení MIC kyseliny usnové pro kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Ingólfssdóttir (2002) rovněž použil tuto metodu pro stanovení MIC kyseliny usnové. Také Ilić *et al.* (2014) použili mikrodiluční metodu pro stanovení antimikrobiálních účinků složek esenciálních olejů a chloramfenikolu v kombinaci. Bujonovou metodu i mikrodiluční metodu používali ve své studii i autoři práce Mazurová *et al.* (2007).

Bujonová diluční metoda pro nás byla časově i pracovně náročnější vzhledem k vysokému počtu testovaných přírodních látek na velkém souboru mikroorganismů. Výsledky získané bujonovou diluční metodou se významně nelišily od výsledků dosažených mikrodiluční metodou. Při ověřování této metody jsme rovněž zaznamenali vysokou spotřebu přírodních látek.

Zvláštní postavení má agarová diluční metoda, neboť se jedná o metodu referenční. Výhodou je možnost otestovat až 32 mikrobiálních kmenů na agarovém médiu s jednou koncentrací jedné přírodní látky. Nevýhodou je časová náročnost a pracnost metody. U těkavých látek (thymol, karvakrol, eugenol) existuje riziko vypařování látek z agarového média při přípravě a v průběhu inkubace, což může vést ke snižování množství přítomné látky a zkresleným výsledkům. Nicméně naše výsledky účinných koncentrací vybraných přírodních látek zjištěné

agarovou diluční metodou byly velmi konzistentní s výsledky získanými mikrodiluční metodou.

5.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY TESTOVANÝCH LÁTEK

MIC a MBC látek zjištěné mikrodiluční metodou v jednotlivých časových intervalech po 24, 48 a 72 hodinách jsme zaznamenali do Tabulek 5a – 7b. Hodnoty MIC a MBC jsme odečítali po 24, 48 a 72 hodinách inkubace, abychom ověřili, zda účinky testovaných látek přetrvávají nebo se mění v čase. U většiny sloučenin jsme nezjistili významné rozdíly mezi 24 a 48 hodinovou inkubací. Hodnoty MIC a MBC po 72 hodinách byly až na výjimky shodné s hodnotami po 48 hodinách inkubace.

Thymol

Z výsledků uvedených v Tabulkách 5a – b, 6a, 7a je zřejmé, že nejúčinnějšími látkami pro většinu testovaných mikroorganismů byly thymol a karvakrol. Obě sloučeniny lze považovat za antimikrobiální látky s širokým spektrem účinnosti. Hodnoty MIC thymolu pro kmeny *Ps. aeruginosa* (n = 17) se pohybovaly v rozmezí 300 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podobné výsledky publikovali Walsh *et al.* (2003), kteří jako rozpouštědlo rovněž používali ethanol. Uvedení autoři prokázali MIC thymolu pro *Ps. aeruginosa* 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ stejně jako Soković *et al.* (2010). Didry *et al.* (1998), Cosentino *et al.* (1999) a Zarrini *et al.* (2010) zjistili hodnoty MIC pro *Ps. aeruginosa* 400 – 900 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Růst enterokoků - *E. faecalis* (n = 6), *E. faecium* (n = 10), *E. gallinarum* (n = 1) a *E. durans* (n = 2), které jsme zařadili v testech stanovení MIC byl inhibován thymolem v koncentraci 300 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Obdobné výsledky publikovali Gutiérrez-Fernández *et al.* (2013a). Autoři uvedli MIC thymolu pro kmeny *E. faecalis* 800 – 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Růst kvasinek *C. albicans* a *C. catenulata* byl inhibován thymolem v množství 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Braga *et al.* (2007) a Botelho *et al.* (2007) zjistili hodnoty MIC pro *C. albicans* 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respektive 625 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Karvakrol

V průběhu testování antimikrobiálních účinků karvakrolu při inkubační teplotě 37°C pro kmeny *Ps. aeruginosa* jsme prokázali, že uvedená sloučenina inhibovala kmeny v koncentracích 150 – 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rozmezí hodnot MBC bylo 150 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podobných výsledku dosáhli Soković *et al.* (2010), kteří uvedli hodnotu MIC 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *Ps. aeruginosa*.

U referenčního kmene *Ps. aeruginosa* jsme zjistili významný rozdíl v hodnotách MIC v závislosti na použitém rozpouštědle. U karvakrolu rozpuštěném v 5% DMSO jsme zaznamenali nižší antibakteriální účinky (MIC 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ve srovnání s karvakrolem

rozpuštěném v 1% ethanolu (MIC 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), porovnání účinnosti rozpouštědel ve výsledcích neuvádíme. Hodnoty MIC pro kmeny *E. faecalis*, *E. gallinarum* a *E. durans* se pohybovaly v poměrně úzkém rozmezí 300 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výjimkou byly kmeny *E. faecium*, které jsou přirozeně rezistentní k ampicilinu. U těchto kmenů bylo rozmezí hodnot MIC 75 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Obdobné výsledky (MIC 600 – 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pro *E. faecalis* uvedli autoři Gutiérrez-Fernández *et al.* (2013a).

Eugenol

Eugenol je hlavní sloučeninou obsaženou v silici z hřebíčku. Již dříve byl známý pro své protizánětlivé a analgetické účinky. Jeho antibakteriální účinky publikovali Dorman *et Deans*, (2000), Hemaiswarya *et Doble*, (2009). K inhibici růstu mikroorganismů byly ve srovnání s thymolem a karvakrolem nutné vyšší koncentrace, což jsme potvrdili i v naší práci (viz Tabulky 5a – b, 6a, 7a). Pro kmeny *Ps. aeruginosa* jsme stanovili hodnoty MIC eugenolu 1200 – 4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro enterokoky se rozmezí MIC pohybovalo mezi 1200 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, hodnoty MBC byly shodné. Výraznější účinky eugenolu jsme prokázali proti *Bacteroides fragilis*, MIC 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MBC 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dle výsledků studií Medina *et al.* (2009) a Joshi (2013) eugenol inhiboval *Ps. aeruginosa* v rozmezí 1200 – 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což se shoduje s našimi výsledky. Signifikantně nižší hodnoty MIC 273 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a MIC 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zjistili Bassolé *et al.* (2010) pro *E. faecalis*. Zmínění autoři rovněž použili k rozpouštění přírodních látek ethanol.

Tippayatum *et Chonhenchob* (2007), kteří rozpouštěli eugenol v DMSO, zjistili pro *E. coli* a *St. aureus* hodnoty MIC 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což jsou ve srovnání s našimi výsledky (MIC 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *E. coli* a 2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *St. aureus*) hodnoty podstatně vyšší.

Kyselina gallová

Z námi získaných výsledků, které jsou přehledně zpracovány v Tabulkách 5a – b, 6b a 7b, je zřejmé, že kyselina gallová byla na enterokoky mnohem méně účinná ve srovnání s kmeny *Ps. aeruginosa*. Naše zjištění potvrzuje studie autorů Barcelo *et al.* (2014), kteří uvedli MIC kyseliny gallové pro *E. faecalis* 62,5x10³ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro *Ps. aeruginosa* 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty MIC kyseliny gallové zjištěné v naší práci se pro většinu kmenů *Ps. aeruginosa* pohybovaly v rozmezí 150 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MBC byly výrazně vyšší (2400-4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Přesto považujeme kyselinu gallovou za látku účinnou zejména na *Ps. aeruginosa*. Binutu *et Cordell* (2000) zjistili MIC kyselina gallové 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro kmeny *P. aeruginosa*. Borges *et al.* (2013) uvedli pro tento druh MIC a MBC kyseliny gallové shodně 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dalším

kladem kyseliny gallové je její velmi dobrá rozpustnost ve vodě. Velmi silné inhibiční účinky kyseliny gallové jsme zaznamenali na *Alcaligenes faecalis*, kde MIC a MBC byly shodně $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zajímavé bylo zjištění změny zbarvení kyselina gallové, v ředěném ejakulátu i v MHB při zjišťování MIC, z odstínu světle zelené na hnědou. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že se kyselina gallová řadí mezi antioxidanty, tedy látky se silnými redukujícími účinky. Kyselina gallová je náchylná k oxidaci za vzniku semichinonů a dalších sloučenin, což vede ke změně zbarvení (Eslami *et al.*, 2010). Stejně tak jsme u této sloučeniny často pozorovali dvě hodnoty MIC pro jeden testovaný kmen, první MIC při velice nízké hodnotě $75 - 150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, druhá hodnota MIC $2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Proto jsme prováděli opakovaná stanovení MIC a MBC zejména pro kmeny *Ps. aeruginosa*. Tuto skutečnost lze vysvětlit schopností některých bakterií metabolizovat kyselinu gallovou za vzniku katecholu a 4-(hydroxymethyl)fenolu, 4-hydroxybenzaldehydu a dalších sloučenin, jejichž antimikrobiální efekt může převyšovat účinky samotné kyseliny gallové (Alberto *et al.*, 2004).

Galláty

Pro své antioxidační vlastnosti jsou známé i estery kyseliny gallové – methyl-, ethyl-, propyl- a oktyl-gallát, které rovněž disponují antimikrobiální aktivitou. Byly publikovány jejich synergické účinky s antibiotiky i na MRSA kmeny (Stapleton *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2009). Při ověřování antimikrobiálních účinků esterů kyseliny gallové jsme zjistili variabilní hodnoty MIC v závislosti na druhu mikroorganismů. Galláty jsme v naší studii použili do ověřování účinků kombinací přírodních sloučenin. Podobné údaje jsme zjistili i pro ethyl-gallát a propyl-gallát. O antimikrobiálních účincích methyl-gallátu a ethyl-gallátu je v odborné literatuře prozatím velmi málo informací. U propyl-gallátu, který je o něco hůře rozpustný ve vodě než předchozí dvě sloučeniny jsme zjistili hodnoty MIC a MBC pro *St. aureus*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa* shodně $2400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tabulky 5b, 6b a 7b). Námi zjištěné hodnoty korespondují s údaji od autorů Kubo *et al.* (2002), kteří u propyl-gallátu zjistili následující: pro *St. aureus* MIC $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MBC $3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro *E. coli* MIC i MBC $1600 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro *Ps. aeruginosa* MIC $3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MBC $> 3200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rozdíly ve srovnání s našimi výsledky nepovažujeme za významné.

Oktyl-gallát

Četnější jsou informace o oktyl-gallátu zaměřené na jeho antimikrobiální účinky. Jedná se o sloučeninu, která je v Evropě a Spojených státech amerických přidávána do vybraných

potravin k potlačení oxidace nenasycených mastných kyselin. Dále byly u této látky prokázány výrazné antimykotické, antibakteriální i antivirové účinky (Kubo *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2004; Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2013b). V naší práci jsme u oktyl-gallátu potvrdili výrazné účinky proti grampozitivním aerobním a anaerobním bakteriím a kvasinkám. Hodnota MIC pro *St. aureus*, *C. albicans*, *Clostridium perfringens* a *Bacteroides fragilis* byla shodně 18,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Odolnější byly enterokoky s MIC 37,5 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naše výsledky se shodují s poznatky Kubo *et al.* (2001). Autoři uvádějí MIC oktyl-gallátu pro *St. aureus* a *Candida albicans* 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Růst gramnegativních bakterií ovlivňoval oktyl-gallát v mnohem vyšších koncentracích (MIC > 1200), výjimkou byl *Alcaligenes faecalis*, u něhož jsme zjistili MIC 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz Tab. 5b). U *Ps. aeruginosa* jsme zjistili MIC oktyl-gallátu v rozmezí 1200 – 4800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Kubo *et al.* (2001) uvádějí MIC > 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, vyšší koncentrace autoři netestovali.

Mechanismus účinku je dáván do souvislosti s přítomností lipofilního postranního řetězce v kombinaci s hydrofilními hydroxylovými skupinami na benzenovém kruhu. Tyto vlastnosti umožňují sloučenině penetrovat přes buněčnou membránu mikroorganismů a inhibovat respiraci na membránové úrovni. Další vlastností oktyl-gallátu je schopnost potlačit funkci effluxních pump u některých kvasinek (Kubo *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2010).

Kyselina usnová

Kyselina usnová je jedinou z námi testovaných látek, která se přirozeně vyskytuje v lišejnících, zejména rodu *Parmelia* nebo *Usnea*. U této látky jsme prokázali nejsilnější inhibiční účinky v rozmezí MIC 4,7 – 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na grampozitivní a anaerobní bakterie. Stejně hodnoty MIC jsme zjistili u 19 kmenů enterokoků (viz Tabulka 4a). Tyto poznatky odpovídají výsledkům studie Lauterwein *et al.* (1995), kteří uvádějí MIC kyseliny usnové pro *E. faecalis* i *E. faecium* 4 – 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podobné hodnoty zaznamenali Ranković *et al.* (2008) pro *St. aureus*. Výsledky MIC kyseliny usnové pro gramnegativní bakterie se naopak rozcházejí, Ranković *et al.* (2008) uvádí rozmezí hodnot MIC 3,7 – 31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *E. coli*, *Kl. pneumoniae* a *Enterobacter cloacae*. Lauterwein *et al.* (1995) však nezjistili inhibiční účinky kyseliny usnové na *E. coli*, *Ps. aeruginosa* a *C. albicans* ani při koncentraci 32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vyšší, což je ve shodě s našimi údaji uvedenými v Tabulkách 5a, 6a.

Uvedená sloučenina prokazatelně inhibuje růst bakterií v nízkých koncentracích, ale rozdíly v hodnotách MIC a MBC u některých bakterií byly více než dvojnásobné, často až stonásobné. Z uvedeného usuzujeme, že účinky kyseliny usnové nejsou baktericidní ale pouze

bakteriostatické. Proto v naší práci uvádíme u vybraných druhů pouze hodnoty MIC kyseliny usnové. Výjimkou jsou *Bacillus subtilis* a anaerobní druhy *Clostridium perfringens* a *B. fragilis*, na které tato látka působila baktericidně. Námi zjištěné výsledky zjištěné na velkém souboru kmenů *Ps. aeruginosa* i dalších gramnegativních bakteriích potvrzují, že kyselina usnová na tyto druhy nepůsobí vůbec nebo jen ve vysokých koncentracích (viz Tab. 6a). Shodné poznatky publikovali Lauterwein *et al.* (1995).

Knicin

V naší práci jsme testovali knicin, který byl extrahovaný ze semen Benediktu lékařského (*Cnicus benedictus*), sloupcovou chromatografií. Látku nám poskytl profesor Lubomír Opletal z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Antimikrobiální účinky uvedené látky jsme zjišťovali na ve studii zařazených mikroorganismech, většinou opakovaně pro potvrzení výsledků. Jedná se o látku s poměrně univerzálními účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Hodnoty MIC se pohybovali v rozmezí 300 – 600 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ s výjimkou některých enterokoků, *Kl. pneumoniae* a kvasinek. Jak uvádíme v kapitole 2.3.1.10, na rozdíl od ostatních testovaných látek, má knicin specifický mechanismus účinku na bakterie spočívající v inhibici počátečního kroku biosyntézy peptidoglykanu a tedy i buněčné stěny bakterií (Bugg *et al.*, 2011).

Dosud je v odborné literatuře velmi málo údajů o antibakteriálních účincích knicinu, které by byly srovnatelné s našimi výsledky. Nevýhodou knicinu je jeho relativně náročná izolace s nízkým výtěžkem, vyšší cena a špatná rozpustnost v ethanolu i DMSO. V roce 2003 testovali účinky knicinu na *Ps. aeruginosa* Bruno *et al.* (2003). Autoři uvedli hodnoty MIC pro *St. aureus*, *Proteus mirabilis*, *Ps. aeruginosa* a *E. coli* 25, 25, 50, respektive 12,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Mazurová *et al.* (2007) rovněž ověřovali účinky knicinu. Ve své studii uvádějí MIC knicinu rozpuštěného v ethanolu pro *E. faecalis* 600 – 2400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 300 – 600 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro *Ps. aeruginosa*.

5.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY LÁTEK TESTOVANÝCH V KOMBINACI

Hodnoty MIC a MBC přírodních látek na mikroorganismy po 72 hodinách byly až na výjimky shodné s hodnotami po 48 hodinách inkubace. Pro uvedené skutečnosti jsme do hodnocení vzájemných interakcí přírodních látek ve směsi použili hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ zjištěné za 48 hodin. Cílem ověřování antimikrobiálních účinků přírodních látek v dvojkombinacích bylo zjistit vzájemné interakce podobně, jako je často uváděno u některých antibiotik. Analyzovali jsme, zda dochází k synergickému působení, kdy je FICI, FBCI $\leq 0,5$; aditivnímu účinku (FICI, FBCI $> 0,5 \leq 1$), indiferenci (FICI, FBCI $> 1 \leq 4$) nebo antagonistickým účinkům (FICI, FBCI > 4). Výsledky účinků přírodních látek v kombinaci jsou uvedeny v Tabulkách 8a – f.

Kmeny *E. faecalis*, *E. faecium* i *Ps. aeruginosa* dobře inhibovaly kombinace fenolických látek zejména karvakrolu nebo thymolu s EDTA. Účinné koncentrace fenolických látek ve směsi s EDTA byly několikrát nižší v porovnání s MIC₅₀ a MBC₅₀ samotné látky, což svědčí o synergických účincích. Tyto poznatky jsme u některých kombinací potvrdili výpočtem FICI a FBCI dle Hamoud *et al.* (2014). Jednalo se o kombinaci thymolu s EDTA na kmeny *Ps. aeruginosa*, kdy jsme porovnáním hodnot MIC₅₀ a MBC₅₀ jednotlivých látek s MIC₅₀ a MBC₅₀ kombinací těchto látek zjistili FICI a FBCI 0,31 a 0,19, tedy synergické působení. Z těchto výsledků je zřejmé, že došlo výraznému 3 – 5 násobnému snížení MIC₅₀ a MBC₅₀ uvedených látek v kombinaci ve srovnání s MIC₅₀ a MBC₅₀ látek testovaných jednotlivě. U kombinace thymolu s EDTA na kmeny *E. faecalis* a *E. faecium* jsme prokázali spíše aditivní účinky (viz Tab. 8a).

Výrazně byla u kmenů *E. faecalis* snížena MIC₅₀ i MBC₅₀ karvakrolu v kombinaci (z 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) s EDTA (snížení z 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podobné výsledky jsme zaznamenali i pro *Ps. aeruginosa*, kdy došlo k 3 – 5 násobnému snížení hodnot MIC₅₀ a MBC₅₀ karvakrolu s EDTA ve směsi ve srovnání s účinnými koncentracemi jednotlivých komponent (viz Tab. 8b). Synergické účinky karvakrolu s antibiotiky prokázali ve své studii Fadli *et al.* (2012). MIC antibiotik byly v přítomnosti karvakrolu sníženy 4 – 16x. Zajímavé bylo zjištění, že u kombinace karvakrolu s EDTA jsme prokázali synergické účinky na kmeny *E. faecalis*, ale pouze indiferentní účinky na *E. faecium*. Důvodem je pravděpodobně to, že samotný karvakrol jen na *E. faecium* velmi účinný, účinnější než na *E. faecalis*.

Již dříve byly popsány úspěšné experimenty při testování EDTA s jinými látkami přírodního charakteru včetně antibiotik (Hamoud *et al.*, 2014). Autoři prokázali synergické účinky kombinace thymolu s EDTA na *E. coli* a na MRSA. U každé látky došlo v kombinaci k čtyřnásobnému snížení MIC ve srovnání s hodnotami MIC jednotlivých látek. Du *et al.* (2015) ověřovali vzájemné účinky kombinace thymolu s karvakrolem. Uvedení autoři zjistili hodnotu FICI 0,5 – 1 u této kombinace na *E. coli*, *Clostridium perfringens* a *Salmonella* sp., z čehož plyne, že se jedná o aditivní účinek. O aditivních antibakteriálních účincích thymolu s karvakrolem na kmeny *Ps. aeruginosa* a *St. aureus* rovněž informují ve své práci Lambert *et al.* (2001).

Aditivní a synergické účinky kombinace EDTA s thymolem nebo karvakrolem objasňujeme schopností EDTA zeslabit odolnost bakteriální stěny a umožnění průniku přírodních látek k cytoplazmatické membráně a dále do buňky.

EDTA je chelatační činidlo Ca^{2+} , Mg^{2+} a dalších iontů. Uvedené ionty jsou důležité pro rigiditu a normální funkci bakteriální buněčné stěny. Pokud dojde k významnému snížení koncentrace těchto iontů vlivem působení EDTA, dochází ke změně propustnosti bakteriální stěny. U gramnegativních bakterií dochází působením EDTA k významné ztrátě polysacharidů přítomných ve vnější membráně. Přes porušenou buněčnou stěnu pak snáze pronikají látky s antibakteriálním účinkem. Thymol a karvakrol primárně ovlivňují cytoplazmatickou membránu, zvyšují její propustnost, snižují membránový potenciál, což vede k úniku intracelulárních látek a smrti bakterie (Xu *et al.*, 2008; Hamoud *et al.*, 2014).

Dále byly kmeny *Ps. aeruginosa* a *E. faecalis* dobře inhibovány kombinací karvakrolu s thymolem. Podle uvedených FICI vykazovala tato kombinace synergické účinky kmeny *E. faecalis* a aditivní účinky na kmeny *Ps. aeruginosa*. Synergické účinky na kmeny *Ps. aeruginosa* jsme zaznamenali u kombinace knicinu a kyseliny gallové. Také v tomto testu došlo k signifikantnímu snížení MIC_{50} a MBC_{50} obou látek v kombinaci oproti MIC_{50} a MBC_{50} látek testovaných jednotlivě. Tyto údaje byly potvrzeny hodnotami FICI a FBCI (viz Tab 8c). Výrazné účinky na enterokoky a to jak *E. faecalis* tak *E. faecium* jsme zaznamenali u kombinace knicinu s EDTA, kde hodnoty FICI a FBCI byly velmi nízké. Výsledný efekt jsme vyhodnotili jako synergický. U uvedených sloučenin v kombinaci došlo k 3 – 4 násobnému snížení MIC_{50} a MBC_{50} ve srovnání s účinnými koncentracemi jednotlivých látek (viz Tabulka 8e).

5.4 SPERMIOTOXICITA TESTOVANÝCH LÁTEK PRO KANČÍ POHLAVNÍ BUŇKY

Kančí ejakulát je směs sekretů přídatných pohlavních žláz - seminální plazmy a spermií, které tvoří maximálně 5 % celkového množství objemu ejakulátu. U dospělého kance se objem ejakulátu pohybuje v rozmezí 100 – 500 ml. Celkový objem zahrnuje tři frakce: prespermální, spermální, která obsahuje nejvyšší koncentraci spermií a frakci postspermální (King *et al.*, 1973; Shipley, 1999; Maroto Martín *et al.*, 2010). Hodnota pH čerstvě odebraného ejakulátu je za fyziologických podmínek 7,2 – 7,5 (Ciornei *et al.*, 2008).

Seminální plazma obsahuje proteiny, sacharidy, ionty, kyseliny citrónovou a askorbovou, enzymy a biologicky aktivní látky, zejména prostaglandiny, estrogeny nebo androgeny. Významným iontem je zinek, který ovlivňuje nejen proces spermiogeneze ale i pohyblivost spermií (Frydrychová *et al.*, 2007).

Ve spolupráci s pracovníky Výzkumného ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí jsme ověřovali toxické účinky testovaných sloučenin na pohlavní buňky kanců. Metodika je velice náročná na provedení, neboť kančí spermie jsou na rozdíl od ostatních savčích spermií velmi citlivé na teplotní šok a oxidační poškození cytoplazmatické membrány pro vysoký obsah nenasycených mastných kyselin a relativně nízkou antioxidační kapacitu semenné plazmy (Přinosilová *et al.*, 2012).

Výsledky jsme vyjadřovali procentem pohyblivých spermií v ejakulátu, které jsme zjistili pozorováním ve fázovém mikroskopu v různých časových intervalech od přidání různých koncentrací přírodní látky. Závislosti motilit kančích spermií na různých koncentracích testovaných látek v časech jsou přehledně znázorněny v Obr. 25 – 35. Maximální netoxická koncentrace byla definována jako nejvyšší koncentrace přírodní látky, při které bylo ve vzorku pozorováno alespoň 10 % motilních spermií.

Z hodnot uvedených v Obr. 25 – 35 je zřejmé, že pro kančí spermie byla nejméně toxická EDTA. V ředěném ejakulátu obsahujícím 300 – 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ této sloučeniny bylo po 24 hodinách 55 – 60 %, po 48 hodinách 40 % a 72 hodinách 35 % pohyblivých spermií, což je takřka shodné s kontrolou. Nejedná se však o přírodní látku. Uvedená sloučenina je známa pro své chelatační vlastnosti, schopnosti tvorby komplexů s ionty některých kovů. EDTA není primárně považována za antimikrobiální sloučeninu, často je používána v kombinaci s antibiotiky nebo jinými antimikrobiálními sloučeninami (Lambert *et al.*, 2004). Nízkou toxicitu jsme zaznamenali také u karvakrolu, který zároveň patří k nejúčinnějším antimikrobiálním látkám testovaným v naší studii. V ejakulátu obsahujícím 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ této

sloučeniny bylo po 48 – 72 hodinách 40 % pohyblivých spermií. V koncentraci 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl počet pohyblivých spermií po 24 hodinách 40 %, po 48 hodinách 20 % a po 72 hodinách 15 %. Ve srovnání s kontrolou, kde bylo za 72 hodin přítomno 40 % motilních spermií, se jedná o velmi dobrý výsledek. Pohyblivé spermie jsme po 72 hodinách pozorovali v ejakulátu s koncentracemi 150 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ thymolu (10 %) a v koncentraci 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ eugenolu (20 %).

Kyselinu gallovou jsme hodnotili jako poměrně málo toxickou pro spermie. V ejakulátu s kyselinou gallovou jsme po 24 hodinách pozorovali 30 % pohyblivých kančích pohlavních buněk při koncentraci 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 25 % při 600 a 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Za 72 hodin pohyb spermií v přítomnosti všech testovaných koncentrací kyseliny gallové ustal (viz Obr. 28).

U dvou esterů kyseliny gallové, methyl-gallátu a ethyl-gallátu jsme rovněž zaznamenali nižší toxicitu pro spermie. V ejakulátu obsahujícím 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ methyl-gallátu jsme pozorovali 30 % a 15 % pohyblivých spermií za 72 hodin. U ethyl-gallátu v množství 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ jsme za 72 hodin zjistili 45 % motilních kančích pohlavních buněk. Výše uvedené koncentrace gallátů však nemají dostatečné inhibiční účinky na většinu použitých mikrobiálních kmenů. Perspektiva jejich použití k dekontaminaci insemináčnických dávek není reálná.

Zajímavé výsledky jsme zaznamenali při ověřování spermiotoxicity oktyl-gallátu, v množství 75 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ této sloučeniny bylo po přidání do ejakulátu 60 – 65 % pohyblivých spermií, po 1 hodině pohyb ustal. V ejakulátu obsahujícím 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oktyl-gallátu jsme v čase 0 pozorovali 60 % pohyblivých kančích pohlavních buněk, po 1 hodině 30 % a po 4 hodinách 20 %, za 24 hodin nebyly patrné pohyblivé spermie. Pohyblivost spermií v ejakulátech s kyselinou usnovou a knicinem dosahovala v čase 0 ve všech testovaných koncentracích 70 – 75 %. Již po 1 hodině však došlo k snížení na 60 % a při kontrole po 4 hodinách jsme zaznamenali pouze ojediněle pohybující se kančí pohlavní buňky (viz Obr. 32, 33).

Naše zjištění o toxicitě přírodních sloučenin pro kančí spermie dále nediskutujeme, neboť jsme v dostupné odborné literatuře nenalezli podobně zaměřené studie.

5.5 ANALÝZA ÚČINKU VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH LÁTEK, JEJICH KOMBINACÍ A VYHODNOCENÍ MOŽNOSTI POUŽITÍ K DEKONTAMINACI KANČÍCH EJAKULÁTŮ

Tabulka 9: Porovnání nejúčinnějších přírodních látek, jejich dvojkombinací a vyhodnocení možnosti použití k dekontaminaci kančích ejakulátů

Látka	MIC50(MBC50) ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		MNK ¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	MIC50(MBC50) vybraných látek v kombinaci ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)			Ano/ne ²
	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 12)	<i>Ps. aeruginosa</i> (n = 10)		Kombinace	<i>Enterococcus</i> sp. (n = 12)	<i>Ps. aeruginosa</i> (n = 10)	
Thymol	600(600)	600(1200)	300	Thymol+EDTA	300+75(300+300)	150+75(150+75)	ANO
				Thymol+karvakrol	75+75(150+150)	300+600(300+600)	(NE) ⁴
Karvakrol	300(600)	600(1200)	300	Karvakrol+EDTA	150+150(150+150)	75+150(75+150)	ANO
Oktyl-gallát	75(75)	4800(>4800)	< 75	Oktyl-gallát+EDTA	75+300(75+300)	600+600(1200+600)	NE
Knicin	600(2400)	300(600)	< 50	Knicin+thymol	300+300(300+300)	600+300(1200+300)	NE
				Knicin+karvakrol	600+150(1200+150)	300+600(300+600)	NE
				Knicin+EDTA	75+75(75+75)	-	NE
Kyselina usnová	18,8(-)	>9600(-)	< 75	Kyselina usnová+knicin	9,4+18,8(-)	-	NE
EDTA ³	600(1200)	600(1200)	1200	-	-	-	ANO

¹ Maximální netoxická koncentrace

² Perspektivní použití k dekontaminaci ejakulátů kanců

³ Látka určená pro použití v kombinacích

⁴ Pro ejakuláty neobsahující *Ps. aeruginosa* by použití bylo možné

V Tabulce 9 uvádíme porovnání MIC₅₀ a MBC₅₀ jednotlivých sloučenin i jejich kombinací, které považujeme v naší práci za nejúčinnější. Thymol, karvakrol a knicin jsou látkami, které inhibovaly růst všech mikroorganismů používaných v naší práci v poměrně úzkém koncentračním rozmezí. Do testování dvojkombinací přírodních látek a EDTA jsme zařadili kromě kmenů *Ps. aeruginosa* a enterokoků i další druhy. V této práci uvádíme výsledky účinnosti dvojkombinací látek na kmeny *Ps. aeruginosa* a kmeny enterokoků (*E. faecalis*, *E. faecium*), neboť je považujeme z hlediska odolnosti k vnějším podmínkám, metabolické aktivitě a přirozené rezistence k mnoha antibiotikům za problematické. Druh *Ps. aeruginosa* jako zástupce gramnegativních bakterií je navíc schopen růstu v širokém rozmezí teplot, včetně 17 °C, tedy při teplotě, ve které se skladují inseminační dávky (La Bauve *et* Wargo, 2012).

Z vybraných výsledků a porovnání v Tabulce 9 je zřejmé, že některé látky i přes výraznou antibakteriální aktivitu nelze použít k dekontaminaci kančích ejakulátů, neboť jsou toxické pro kančí pohlavní buňky i v nejnižších testovaných koncentracích. Konkrétně se jedná kyselinu usnovou a oktyl-gallát, které ve velmi nízkých koncentracích inhibují grampozitivní druhy bakterií. Vzhledem k jejich silnému antimikrobiálnímu účinku je nutné zvážit jejich další testování pro jiné účely. Knicin, který dobře účinkuje na druhy grampozitivních i gramnegativních bakterií, je rovněž v nízkých koncentracích toxických pro kančí spermie. Jako nadějně se jeví látky thymol a karvakrol v kombinaci s EDTA. Kombinace thymolu s EDTA a karvakrolu s EDTA inhibují *Ps. aeruginosa* i enterokoky v koncentracích nižších než je maximální netoxická koncentrace (viz Tabulka 9). Tyto kombinace účinkují stejně nebo lépe i na ostatní druhy bakterií, které zde však pro rozsáhlost výsledků neuvádíme. Kombinace thymolu s karvakrolem rovněž velmi dobře účinkuje na testované bakterie, na *Ps. aeruginosa* bohužel v koncentracích vyšších nebo stejných než je jejich maximální netoxická koncentrace. Přesto je však nutno kombinaci thymolu s karvakrolem k dekontaminaci kančích ejakulátů také zvážit, zejména u ejakulátů, které nejsou kontaminovány druhem *Ps. aeruginosa*. Logicky lze tímto doporučit pravidelné provádění kultivačního vyšetření ejakulátů kanců pro znalost přítomnosti kontaminujících druhů a nalezení optimálního řešení.

6 ZÁVĚR

Dizertační práce byla zaměřena na zavedení metod pro ověření antimikrobiální aktivity a spermio toxicity přírodních látek a silic s cílem jejich možného využití k validaci postupů pro dekontaminaci kančích inseminačních dávek. Pro zjištění antimikrobiální účinků přírodních látek i jejich kombinací jsme vybrali mikrodiluční metodu. Součástí práce bylo rovněž zavedení kultivačních metod pro kvalitativní a kvantitativní průkaz mikroorganismů v ejakulátech kanců. Znalost mikrobiální kontaminace je velmi důležitá a proto doporučujeme pravidelně provádět kultivačních vyšetření ejakulátů kanců v inseminančních stanicích.

Na základě literárních údajů a našich předběžných výsledků jsme zařadili do rozsáhlých experimentů 10 sloučenin (thymol, karvakrol, eugenol, kyselina gallová, methyl-gallát, ethyl-gallát, propyl-gallát, oktyl-gallát, knicin, kyselina usnová) s nejvýraznější antimikrobiální aktivitou a EDTA, které jsme testovali na velkém souboru mikrobiálních kmenů. U těchto látek jsme stanovili hodnoty MIC a MBC.

Pro zjištění antibakteriálních účinků přírodních látek a EDTA ve směsi jsme porovnávali MIC₅₀ a MBC₅₀ dvojkombinací testovaných látek s hodnotami MIC₅₀ a MBC₅₀ látek jednotlivých. Vzájemné účinky kombinací přírodních látek (synergické, aditivní, indiferentní a antagonistické) jsme analyzovali na základě hodnot FICI. Z námi testovaných vzájemných kombinací přírodních sloučenin byly na kmeny enterokoků i *Ps. aeruginosa* nejúčinnější karvakrol ve směsi s EDTA (FICI = 0,19 – 1,25), thymol s EDTA (FICI = 0,19 – 0,63) a karvakrol s thymolem (FICI = 0,38 – 1,5). Vzájemné interakce uvedených dvojkombinací jsme hodnotili převážně jako synergické, případně aditivní. Hodnoty MIC₅₀ a MBC₅₀ uvedených sloučenin ve směsích byly opakovaně sníženy 2 – 6x ve srovnání s látkami testovanými jednotlivě.

Při ověřování toxických účinků přírodních látek jsme prokázali, že pouze thymol, karvakrol a EDTA jsou pro spermie v koncentracích účinných na mikroorganismy méně toxické než ostatní testované sloučeniny. Lze předpokládat jejich použití k dekontaminaci inseminačních dávek kanců, a to zejména kombinace thymolu s EDTA a karvakrolu s EDTA. Tento předpoklad je však nutno dále ověřit na větším souboru ejakulátů kanců. Je nutno dodat, že thymol i karvakrol jsou látky, které se nachází v silicích z mnoha rostlin ve vysokých koncentracích. Jedná se tedy o látky dobře dostupné.

Ostatní látky (kyselina usnová, oktyl-gallát, knicin), u kterých jsme i přes jejich vyšší spermio toxicitu prokázali inhibiční účinky na většinu testovaných mikroorganismů, mohou najít uplatnění v dalším výzkumu v oblasti veterinární i humánní medicíny. Význam hledání

nových zdrojů antimikrobiálních léčiv je zřejmý, neboť používání antibiotik mimo léčebné účely podporuje vznik a šíření rezistentních bakterií. U přírodních látek pro jejich nesespecifický mechanismus účinku na bakterie a houby nedochází k vývoji specifické rezistence jako u antibiotik. Proto je lze řadit k perspektivním antimikrobiálním látkám.

7 LITERÁRNÍ ZDROJE

- ABD, A. K. H.; ABU-RAGHIF, A. R.; AL-AZZAWI, A. N. The effect of EDTA with single or combination of antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* isolates in vitro. *Iraqi Journal of Medical Sciences*, 2011, 9(3), s. 285-291.
- AGBOKE, A. A.; ESIMONE C. O.: Antimicrobial evaluation of the interaction between methanol extract of the lichen, *Ramalina farinacea* (*Ramalinaceae*) and ampicilin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(4), s. 644-648.
- AHN, Y-J.; LEE, H-S.; OH, H-S.; KIM, H-T.; LEE, Y-H. Antifungal activity and mode of action of Galla rhois-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, 81, s. 105-112.
- ALBERTO, M. R.; GOMEZ-CORDOVES, C.; MANCA DE NADRA, M. Metabolism of Gallic Acid and Catechin by *Lactobacillus hilgardii* from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, s. 6465-6469.
- ALMA, M. H., MAVI, A., YILDIRIM, A., DIGRAK, M., HIRATA, T. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 26, s. 1725-1729.
- ALTHOUSE, G. C. Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(2), s. 374-378. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x
- ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 2005, 63, s. 573-584.
- AL-ZAHRANI, S. H. M. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of American Science*, 2012, 8, s. 7-12.
- ANDREWS, J. M.: Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48, s. 5-16.
- ASTANI, A.; SCHNITZLER, P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. *Iranian Journal of Microbiology*, 2014, 6(3), s. 149-155.
- ATTI-SANTOS, A. C., ROSSATO, M., PAULETTI, G. F., ROTA, L. D., RECH, J. C., PANSERA, M. R., AGOSTINI F., SERAFINI L. A., MOYNA, P. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2005, 48, s. 1035-1039.
- BACÍLKOVÁ, B., PAULUSOVÁ, H. Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. Praha: Národní archiv. 2012, s. 28.
- BAGAMBOULA, C. F; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.: Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 2004, 21(1), s. 33-42.
- BACHELIER, A.; MAYER, R.; KLEIN, C. D. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, s. 5605-5609.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, s. 446-475.

- BARCELO, M. J., GUIEB, M., VENTRUA, A., NACINO, A., PINASEN, H., VIERNES, L., YODONG, T., LOU ESTRADA, B., VALDEZ, D., BINWAG, T. *Asia Pacific Journal of Multidisciplinary Research*, 2014, 2(6), s. 45-56.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combinations and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 2012, 17, s. 3989-4006.
- BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIE, R. C.; DICKO, M. H. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in combination. *Molecules*, 2010, 15, s. 7825-7839.
- BATTU, S. K.; REPKA, M. A.; MADDINENI, S.; CHITTIBOYINA, A. G.; AVERY, M. A.; MAJUMDAR, S. Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(3), s. 1466-1475. doi: 10.1208/s12249-010-9520-y.
- BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T.: Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 2004, 15(3), s. 169-172.
- BINUTU, O. A.; CORDELL, G. A. Gallic Acid Derivatives from *Mezoneuron benthamianum* Leaves. *Pharmaceutical Biology*, 2000, 38, s. 284-286.
- BLOMQUIST, G.; PERSSON, M.; WALLGREN, M.; WALLGREN, P.; MORRELL, J. M. Removal of virus from boar semen spiked with porcine circovirus type 2. *Animal Reproduction Science*, 2011, 126, s. 108-114.
- BORGES, A., FERREIRA, C., SAAVEDRA, M. J., SIMOES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 2013, 19(4), s. 255-265. DOI: 10.1089/mdr.2012.0244
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, karvakrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2007, 40, s. 349-356.
- BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*, 2007, 78, s. 396-400.
- BRESCIANI, C.; CABASSI, C. S.; MORINI, G.; TADDEI, S.; BETTINI, R.; BIGLIARDI, E.; DI IANNI, F.; SABBIONI, A.; PARMIGIANI, E. Boar Semen Bacterial Contamination in Italy and Antibiotic Efficacy in a Modified Extender. *Journal of Animal Science*, 2014, 13(1), s. 3082. <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2014.3082>
- BRUNO, M.; ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.; RACCUGLIA, R. A.; NAPOLITANO, F.; senatore, f. Antibacterial evaluation of cnicin and some natural and semisynthetic analogues. *Planta Medica*, 2003, 69(3), s. 277-281.
- BUGG, T. D. H.; BRADDICK, D.; DOWSON, C. G.; ROPER, D. I. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29, s. 167-173.

- BURT, S. A.; VLIELANDER, R.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUZIEN, E. J. A.: Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(5), s. 919-926.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, roč. 94, s. 223-253.
- BUTNARIU, M.; BOSTAN C. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium). *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10, s. 5900-5909.
- CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular and molecular life sciences*, 1997, 53, s. 667-672.
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(6), s. 1914-1920. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIENTINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 79(2), 213-220.
- CIORNEI, ȘG.; RUNCEANU, L.; DRUGOCIU, D.; ROSCA, P. Research and correlation between microbiological spermogram and biological parameters value extended of boar semen. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 2008, 65, s. 114-118.
- COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 2002, 89, s. 137-146.
- COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C. Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. *Microbe*, 2011, 6(6), s. 274-279.
- COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTÀ, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 29, s. 130-135.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12(4), s. 564-582. 0893-8512/99/\$04.0010
- CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, s. 6300-6308.
- CUNY, C.; WIELER, L. H.; WITTE, W. Livestock-associated MRSA: The impact on humans. *Antibiotics (Basel)*, 2015, 4(4), 521-543
- DA SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; DE AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 2012, 17, s. 6305-6316. doi:10.3390/molecules17066305
- DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*),

Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(26), s. 8255-8260.

DAGNALL, G. J. R. An investigation of the bacterial flora of the preputial diverticulum and of the semen of boars. M. Ph. Thesis, Royal Veterinary College, Hertfordshire, 1984.

DARVISHI, E.; OMIDI, M.; BUSHEHRI, A. A. S.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. The Antifungal Eugenol Perturbs Dual Aromatic and Branched-Chain Amino Acid Permeases in the Cytoplasmic Membrane of Yeast. *PLOS one*, 2013, 8, s. 1-10.

DE RAPPER, S.; KAMATOU, G.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Other Aroma-Therapeutic Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013, s. 1-10.

DEMIRCI, B., KOSAR, M., DEMIRCI, F., DINC, M., BASER, K. H. C. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food Chemistry*, 2007, 105(4), s. 1512-1517.

DEMIRCI, B., TABANCA, N., BASER, H. C. Enantiomeric distribution of some monoterpenes in the essential oils of some *Salvia species*. *Flavour and Fragrance Journal*, 2002, 17, s. 54-58.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, S.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130, s. 107-115.

DHAR, P.; CHAN, P.; COHEN, D. T.; KHAWAM, F.; GIBBONS, S.; DICKSTEIN, E.; RAI, P. K.; WATAL, G. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure-activity relationship of α -pinene derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(16), S. 3548-3552. DOI: 10.1021/JF403586T. EPUB 2014 APR 9.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; TROTIN, F.; PINKAS, M. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998,60, s. 91-96.

DIXON, A. R. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 2001, 411, s. 843-847.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88, s. 308-316.

DU, E.; GAN, L.; LI, Z.; WANG, W.; LIU, D.; GUO, Y. *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 58(6), s. 1-12. doi: 10.1186/s40104-015-0055-7.

DUETZ, W. A.; BOUVMEESTER H.; VAN BEILEN, J. B.; WITHOLT, B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61, s. 269-277. DOI 10.1007/s00253-003-1221-y

ELISSONDO, M. C.; ALBANI, C. M.; GENDE, L.; EQUARAS, M.; DENEGRI, G. Efficacy of thymol against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitology International*, 2008, 57, s. 185-190.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Naturwissenschaften*, 2007, 94, s. 465-468.

- ESLAMI, A. C.; PASANPHAN, W., WAGNER B. A.; BUETTNER, G. R. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. *Chemistry Central Journal*, 2010, 4, s. 1-4.
- ESMAEILI, A.; KHODADADI, A. Antioxidant Activity of a Solution of Thymol in Ethanol. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 2012, 14(7), s. 14-18.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2011 Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-MPC_assessment_report/2011/02/WC500101693.pdf Staženo 15.7.2016
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014: Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-MPC_assessment_report/2014/12/WC500179585.pdf Staženo 15.7.2016
- FADLI, M., SAAD, A., SAYADI, S., CHEVALIER, J., MEZRIOUI, N. E., PAGÈS, J. M., HASSANI, L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 2012, 19(5), s. 464-471.
- FALAGAS, M. E.; KASTORIS, A. C.; KAPASKELIS, A. M.; KARAGEORGOPOULOS, D. E. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(1), s. 43-50. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70325-1.
- FILIPOWICZ, N.; KAMIŃSKI, M.; KURLEND, J.; ASZTEMBORSKA, M.; OCHOCKA, J. R. Antibacterial and Antifungal Activity of Juniper Berry Oil and its Selected Components. *Phytotherapy Research*, 2003, 17, s. 227-231. DOI : 10.1002/ptr.1110
- FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J.; GIRÃO DA CRUZ, M. T.; CORDEIRO, M. N. D. S.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. M. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12, s. 3581-3589.
- FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUÑOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; MAYA, J. D.; FERREIRA, J. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, 146, s. 520-527.
- FRYDRYCHOVÁ, S.; ČEŘOVSKÝ, J.; LUSTYKOVÁ, A.; ROZKOT, M. Relation of seminal plasma components and PRLR gene incidence to morphologically abnormal spermatozoa of boars. *Research in Pig Breeding*, 2007, 1, s. 22-25.
- GAO, C.; LOU Z-C.; LIN, F-T.; LIN, M-CH.; SCHIFF, L. Quaternary alkaloids of *Thalictrum cultratum*. *Phytochemistry*, 1987, 26(11), s. 3003-3004.
- GARCÍA-GARCÍA, R.; LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 2011, 76, s. 95–100.
- GILL A. O.; HOLLEY R. A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria Monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, s. 5750-5755.
- GLUPCZYNSKI, Y.; BROUTET, N.; CANTAGREL, A.; ANDERSEN, L.; ALARCON, T.; LÓPEZ-BREA, M.; MÉGRAUD, F.: Comparison of the e-test and agar dilution method for

- antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 21(7), s. 549-552.
- GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146, s. 144-150.
- GUO, N.; LIU, J.; WU, X.; BI, X.; MENG, R.; WANG, X.; XIANG, H.; DENG, X.; YU, L. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58, s. 1074-1079.
- GUPTA, V. K.; VERMA, S.; GUPTA, S.; SINGH, A.; PAL, A.; SRIVASTAVA, S. K.; SRIVASTAVA, P. K.; SINGH, S. C.; DAROKAR, M. P. Membrane-damaging potential of natural L-(–)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2012, 31, s. 3375-3383.
- GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; ÁLVAREZ-ALONSO, R.; DEL VALLE, P.; RÚA, J. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *Dairy Science*, 2013a, 96, s. 4219-4920. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6643>.
- GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; RÚA, J.; DE ARRIAGA, D.; DEL VALLE, P.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 2013b, 30, s. 393-399.
- HA, T. J.; NIHEI, K-I.; KUBO, I. Lipoxigenase Inhibitory Activity of Octyl gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, s. 3177-3187.
- HAMOUD, R.; REICHLING, J.; WINK, M.: Synergistic antibacterial activity of the combination of the alkaloid sanguinarine with EDTA and the antibiotic streptomycin against multidrug resistant bacteria. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014, 67(2), s. 264-273.
- HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67, s. 439-451.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 2009, 16, s. 997-1005.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus.
- HOLT W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 2000, 62, s. 3-22.
- HORVÁTH, G. KOCSIS, B., LEMBERKOVICS, É., BÖSZÖRMÉNYI, A., OTT, P. G., MÓRICZ, Á. M. Detection of antibacterial activity of essential oil components by TLC – bioautography using luminescent bacteria. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 2013, 26, s. 114-118.
- HOSKERI, H. J.; KRISHNA, V.; AMRUTHAVALLI, C. Effects of extracts from lichen *Ramalina pacifica* against clinically infectious bacteria. *Researcher*, 2010, 2, s. 81-85.
- HSIEH, P-C.; MAU, J-L.; HUANG, S-H.: Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, 2001, 15(1), s. 35-43.

HSIEH, T-J.; LIU, T-Z.; CHIA, Y-C.; CHERN, C-L.; LU, F-J.; CHUANG, M-C.; MAU, S-Y.; CHEN, S-H.; SYU, Y-H.; CHEN, C-H. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42, s. 843-850.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N.: Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, 2007, 100(3), s. 1044-1048.

CHOI, J-G.; KANG, O-H.; LEE, Y-S.; OH, Y-C.; CHAE, H-S.; JANG, H-J.; SHIN, D-W.; KWON, D-Y. Antibacterial Activity of Methyl Gallate Isolated from *Galla Rhois* or Carvacrol Combined with Nalidixic Acid Against Nalidixic Acid Resistant Bacteria. *Molecules*, 2009, 14, s. 1773-1780.

CHOI, J-G.; KANG, O-H.; LEE, Y-S.; OH, Y-C.; CHAE, H-S.; JANG, H-J.; KIM, J-H.; SOHN, D-H.; SHIN, D-W.; PARK, H.; KWON, D-Y. In vitro activity of methyl gallate isolated from *Galla rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18, s. 1848-1852.

CHOI, J-G.; MUN, S-H.; CHACAR, HS.; BHARAJ, P.; KANG, O-H.; KIM, S-G.; SHIN, D-W.; KWON, D-Y. Methyl Gallate from *Galla rhois* Successfully Controls Clinical Isolates of Salmonella Infection in Both In Vitro and In Vivo Systems. *PLOS one*, 2014, 9, s-1-7.

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Damage of staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52, s. 565-572.

IACOBELLIS, N. S.; LO CANTORE, P.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, s. 57-61.

ILIĆ, B. S.; KOCIĆ, B. D.; ĆIRIĆ, V. M.; CVETKOVIĆ, O. G.; MILADINOVIĆ, D. L. An in vitro synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with Chloramphenicol. *The Scientific World Journal*, 2014, s. 1-12.

IMELOUANE, B., AMHAMDI, H., WATHELET, J. P., ANKIT, M., KHEDID, K., BACHIRI, A. E. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture Biology*, 2009, 11, s. 205-208.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, 2002, 61, s. 729-736.

ITO, S.; NAKAGAWA, Y.; YAZAWA, S.; SASAKI, Y.; YAJIMA, S. Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24, s. 1812-1814.

IVANOVA, A.; DELCHEVA, I.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; KOSTOVA, I. GC-MS Analysis and Anti-Microbial Activity of Acidic Fractions Obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* Roots. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2002, 57c, s. 624-628.

IWASA, K.; KAMIGAUCHI, M.; UEKI, M.; TANIGUCHI, M. Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1996, 31(6), s. 469-478.

JACOBSEN, C.; HARTVIGSEN, K.; LUND, P.; MEYER, A. S.; ADLER-NISSEN, J.; HOLMER, J. H. G. Oxidation in fish-oil-enriched mayonnaise 1. Assessment of propyl

- gallate as an antioxidant by discriminant partial least squares regression analysis. *European Food Research and Technology*, 1999, 210, s. 13-30.
- JIN, J.; RAO, Y.; BIAN, X.; ZENG, A.; YANG, G. Solubility of (+)-Usnic Acid in Water, Ethanol, Acetone, Ethyl Acetate and n-Hexane. *Journal of Solution Chemistry*, 2013, 42, s. 1018-1027.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 2000, 62, s. 143-172.
- JOHNSTONE, D. B.; LITTLE, J. E. Bacteriostatic, bactericidal, and drug resistance studies of ethyl gallate on *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 1953, 66, s. 320-323.
- JOSHI, R. K. Chemical Composition, *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their Major Constituents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 75, s. 457-462.
- KALEMBA, D.; KUNICKÁ, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, roč. 10, s. 813-829.
- KAMALI, M. J.; MOUSAVI, M. Analytic, neural network, and hybrid modeling of supercritical extraction of alpha-pinene. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, 47, s. 168-173.
- KANE, C. J. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Bioscience reports*, 1988, 8(1), s. 95-102.
- KANG, M. S., OH, J. S., KANG, I. C., HONG, S. J., CHOI, C. H. Inhibitory effect of Methyl Gallate and Gallic acid on Oral Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(6), s. 744-750.
- KAUFFOLD, J.; MELZER, F.; HENNING, K.; SCHULZE, K.; LEIDING, C.; SACHSE, K. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology*, 2006, 65, s. 1750-1758.
- KELEN, M., TEPE, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 2008, 99, s. 4096-4104.
- KING, G. J.; MACPHERSON, J. W. A comparison of two methods for boar semen collection. *Journal of Animal Science*, 1973, 36, s. 563-565.
- KLEIN, A. H.; JOE, C. L.; DAVOODI, A.; TAKECHI, K.; CARSTENS, M. I.; CARSTENS, E. Eugenol and Carvacrol Excite First- and Second-Order Trigeminal Neurons and Enhance Their Heat-Evoked Responses. *Neuroscience*, 2014, 241, s. 45-55.
- KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. V.; GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. Enterococci. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Boston 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420>
- KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, 54, s. 1447-1452.
- KUBO, I.; FUJITA, K-I.; NIHEI, K-I. Anti-Salmonella Activity of Alkyl Gallates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, s. 6692-6696.

- KUBO, I.; FUJITA, K-I.; NIHEI, K-I.; NIHEI, T. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, s. 1072-1076.
- KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T. J.; SHIMIZU, K.; NIHEI, K-I. Multifunctional Antioxidant Activities of Alkyl Gallates. *The Open Bioactive Compounds Journal*, 2010, 3, s. 1-11.
- KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal Activity of Octyl Gallate: Structural Criteria and Mode of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11, s. 347-350.
- KULEVANOVA, S., STEFKOV, G., RISTIC, M., Examination of flowers and essential oil of *Lavandula officinalis* grown on mountain Kozjak (Macedonia), *Bulletin of Chemists and Technologists Macedonia*, 2000, 19(2), s. 165-169.
- LA BAUVE, A. E., WARGO. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protocols in Microbiology*, 2012, 6, s. 1-11.
doi: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25
- LAMBERT, R. J. W.; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96, s. 244-253.
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J., NYCHAS, G-J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91, 453-462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- LATHA, R. C. R.; DAISY, P. Therapeutic potential of octyl gallate isolated from fruits of *Terminalia bellerica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51, s. 798-805.
- LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39, s. 2541-2543.
- LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYKA, P. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 2008, 69, s. 1732-1738.
- LU, L-L.; LU, X-Y. Solubilities of Gallic Acid and Its Esters in Water. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2007, 52, s. 37-39.
- LU, Y-CH.; Lin, Q.; Luo, G-S.; Dai Y-Y. Solubility of Berberine Chloride in Various Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2006, 51, s. 642-644.
- LUCARINI, R.; TOZATI, M. G.; SALLOUM, A. I. O.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; GIMENEZ, V. M. M.; GROppo, M.; JANUÁRIO, A. H.; MARTINS, C. H. G.; CUNCHA, W. R. Antimycobacterial activity of *Usnea steineri* and its major constituent (+)-usnic acid. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11, s. 4636-4639.
- MAHER, O.; SHATNAWI, M.; AL – ALAWI, M.; AL – ZU’BI, E.; AL – DMOOR, H.; AL – QUDAH, M.; EL – QUDAH, J.; OTRI, I. Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Research Journal of Microbiology*, 2012, 7, s. 59-67.
- MACHADO, M.; DINIS, A. M.; SALQUEIRO, L.; COSTÓDIO, J. B. A.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology*, 2011, 127, s. 732-739.

- MAROTO MARTÍN, L. O.; CRUZ MUÑOZ, E.; DE CUPERE, F.; VAN DRIESSCHE, E.; ECHEMENDIA-BLANCO, D.; MACHADO RODRÍGUEZ, J. M.; BEECKMANS, S. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*, 2010, 120, s. 95-104.
- MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MENGHIBI, A.; FASULO, M. Biological screening of Italian medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research*, 1987, 1, s. 28-31.
- MAZUROVÁ, J.; LYSKOVÁ, P.; VYDRŽALOVÁ, M.; ČAPKOVÁ, M.; KROUPA, T. Bactericidal activity of natural substances on microorganisms contaminating boar semen. *Research in Pig Breeding*, 2007, 1, s. 1-3.
- MAZUROVÁ, J.; VINTER, P. Účinnost vybraných antibiotik na mikroorganismy kontaminující ejakuláty kanců. *Veterinární Medicína*, 1991, 36, s. 213-223.
- MEDINA, E.; BRENES, M.; GARCIA, A.; ROMERO, C.; DE CASTRO, A. Bactericidal Activity of Glutaraldehyde-like Compounds from Olive Products. *Journal of Food Protection*, 2009, 72, s. 2611–2614.
- MEEPAGALA, K. M.; OSBRING, W.; STURTZ, G.; LAX, A. Plant-derived natural products exhibiting activity against Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *Pest Management Science*, 2006, 62, s. 565-570.
- MILLER, D.; HAWTHORNE, S. B. Solubility of Liquid Organic Flavor and Fragrance Compounds in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2000, 45, s. 315-318.
- MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 240, s. 337-347.
- MORAVCOVÁ, J. Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha, 2003, s. 11-91.
- MOUDRÝ, J. a kol. Chov zvířat v ekologickém zemědělství. 1. vydání, České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2007. 52 s. ISBN: 978-80-7394-042-3.
- MUROTA, K.; TERAJO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 417, s. 12-17.
- NIHO, N.; SHIBUTANI, M.; TAMURA, T.; TOYODA, K.; UNEYAMA, C.; TAKAHASHI, N.; HIROSE, M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39, s. 1063-1070.
- NIKOLIĆ, M.; GLAMOČLIJA, L.; FERREIRAB, I. C. F. R.; CALHELHA, R. C.; FERNANDES, A.; MARKOVIĆ, T.; MARKOVIĆ, D.; GIWELIE, A.; SOKOVIĆ, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumoractivity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 2014, 52, s. 183-190.
- NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMSMicrobiology Letters*, 2004, 230, s. 191-195.
- NTOKOU, E.; STATHOPOULOS, C.; KRISTO, L.; DIMITROULIA, E.; LABROU, M.; VASDEKI, A.; MAKRIS, D.; ZAKYNTHINOS, E.; TSAKRIS, A.; POURNARAS, S.

- Intensive care unit dissemination of ple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67, s. 1819-1823.
- ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMANC, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAR, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103, s. 59-65.
- OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2000, 48, s. 1467-1469.
- OKE, F.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALTUNDAG, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 2009, 112, s. 874-879.
- OPLETAL, L.; ČOPÍKOVÁ, J.; UHER, M.; LAPČÍK, O.; MORAVCOVÁ, J.; DRAŠAR, P. Přírodní látky hořké chuti. *Chemické listy*, 2007, 101, s. 895-906.
- OPLETAL, L.; ŠIMERDA B. Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv. Ministerstvo zemědělství ČR - Vědecký výbor pro výživu zvířat, 2005 [online]: Dostupné z <http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Opletal%20Antiinvazni%20latky.pdf> staženo 15.8.2014.
- PALABHANVI, B.; BELUR, P. D. Enhancing gallic acid content in green tea extract by using novel cell-associated tannase of *Bacillus massiliensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 2013, 37, s. 528-535.
- PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 140, s. 164-168.
- PETERSEN, M.; SIMMONS, M. S. J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 2003, 62(2), s. 121-125
- PŘINOSILOVÁ, P.; SEDLÁČKOVÁ, M.; KOPECKÁ, V.; HLAVICOVÁ, J. Boar sperm head membrane damage during cryopreservation evaluated by electron microscopy. *Research in Pig Breeding*, 2012, 6(2), s. 58-61
- QIU, J.; FENG, H.; LU, J.; XIANG, H.; WANG, D.; DONG, J.; WANG, J.; WANG, X.; LIU, J.; DENG, X. Eugenol Reduces the Expression of Virulence-Related Exoproteins in *Staphylococcus aureus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76, s. 5846-5851.
- RANGEL, L. P.; FRITZEN, M.; YUNES, R. A.; LEAL, PC.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; FERREIRA-PEREIRA, A. Inhibitory effects of gallic acid ester derivatives on *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *FEMS Yeast Research*, 2010, 10(3), s. 244-251. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00603.x. Epub 2010 Feb 1.
- RANKOVIĆ, B.; MIŠIĆ, M.; SUKDOLAK, S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichen *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24, s. 1239-1242.
- RATHER, M. A.; DAR, B. A.; SOFI, S. N.; BHATA, B. A.; QURISHI, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012. In Press <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>

- RAUHA, J-P.; REMESSA, S.; HEINONEN, M.; HOPIAB, A.; Kähkönen, M.; KUJALAC, T.; PIHLAJAC, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 56, s. 3-12.
- SEGURA-SANCHEZ, F.; BOUCHEMAL, K.; LEBAS, G.; VAUTHIER, C.; SANTOS-MAGALHAES, NS.; PONCHEL, G. Elucidation of the complexation mechanism between (+)-usnic acid and cyclodextrins studied by isothermal titration calorimetry and phase-solubility diagram experiments. *Journal of Molecular Recognition*, 2009, 22, s. 232-241.
- SEPÚLVEDA, L.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 2014, 150(3-4), s. 96-106. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.001. Epub 2014 Sep 17.
- SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 2009, 113, s. 1202-1205.
- SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49, s. 549-555.
- SHIPLEY, C. F. Breeding soundness examination of the boar. *Swine health and production*, 1999, 7(3), s. 117-120.
- SCHABES, F. I.; SIGSTAD, E. E. A calorimetric study of the allelopathic effect of cnicin isolated from *Centaurea diffusa* Lam. on the germination of soybean (*Glycine max*) and radish (*Raphanus sativus*). *Thermochimica Acta*, 2007, 458, s. 84-87.
- SCHÖNE, F.; VETTER, A.; HARTUNG, H.; BERGMANN, H.; BIERTÜMPFEL, A.; RICHTER, G.; MÜLLER, S.; BREITSCHUH, G. Effects of essential oils from fennel (*Foeniculi aetheroleum*) and caraway (*Carvi aetheroleum*) in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2006, 90, p. 500-510. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2006.00632.x
- SINGH, A.; DUGGAL, S.; KAUR, N.; SINGH, J. Berberine: Alkaloid with wide spectrum of pharmacological activities. *Journal of Natural Products*, 2010, 3, s. 64-75. ISSN 0974 – 5211.
- SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; MONTANARI, C.; TABANELLI, G.; BARGOSSO, E.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Characterization of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and definition of its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in vitro system and on foodstuff surfaces. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8, s. 2746-2753.
- SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; MARIN, P. D.; BRKIĆ, D.; VAN GRIENSVEN L. J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. *Molecules*, 2000, 15, s. 7532-7546. DOI: 10.3390/molecules15117532
- SONBOLI S. A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from *Salvia*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 2006, 61c, s. 160-164.
- SONE, M.; KAWARASAKI, T.; OGASA, A.; NAKAHARA, T. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *The Japanese Journal of Animal Reproduction*, 1989, 35, s. 159-164.

- STAPLETON, P. D.; SHAHA, S.; ANDERSON, J. C.; HARA, Y.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; TAYLOR, P. W. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 23, s. 462-467.
- STERMITZ, F. R.; LORENZ, P.; TAWARA, J. N.; ZENEWICS, L. A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(4), s. 1433-1437.
- STRATEVA, T., YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58, s. 1133-1148.
- SUN, H.; COURTNEY H. S.; BEACHEY, E. H. Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1988, 32(9), s. 1370-1374.
- TAMURA, K.; LI, X.; LI, H. Temperature dependence on mutual solubility of binary (methanol + limonene) mixture and (liquid + liquid) equilibria of ternary (methanol + ethanol + limonene) mixture. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2009, 41, s. 564-568.
- TAN, S. P.; O'SULLIVAN, L.; PRIETO, M.L.; GARDINER, G. E.; LAWLOR, P. G.; LEONARD, F.; DUGGAN, P.; McLOUGHLIN, P.; HUGHES, H. Extraction and bioautographic – guided separation of antibacterial compounds from *Ulvea lactua*. *Springer – Science + Business Media B.V.* 2011.
- TAPALOAGA, P. R.; TAPALOAGA, D.; NEAGU, I.; IANCU, A.; PARASCHIVESCU, M. T.; CHISA, E. Researches concerning swine artificial insemination economic efficiency in a private production unit. *Lucrări Științifice - Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Seria Zootehnie*, 2011, 55, s. 37-39.
- TAY, T.; TÜRK, Ö. A.; YILMAZ, M.; TÜRK, H.; KIVANÇ, M. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Acetone Extract of the Lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-Usnic Acid, Norstictic Acid, and Protocetraric Constituents. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2004, 59, s. 384-388.
- TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol, and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. *Kasetsart Journal–Natural Science*, 2007, 41, s. 319-323.
- ULTEE, A.; SMID, E. J.: Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64(3), s. 372-378.
- UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A. H. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *Antiviral Research*, 2007, 73, s. 85-91.
- VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J. C. M.; STRIK, J. J. T. W. A. Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, 24, s. 1067-1070.
- VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M.; Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007, 22(6), s. 540-544. DOI: 10.1002/ffj.1843
- VANHAELEN-FASTRE, R. Antibiotic and cytotoxic activity of cnicin isolated from *Cnicus benedictus* L. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 1972, 27, s. 683-688.
- VAQUERO, R. M. J.; ALBERTO M. R. A.; MANCA DE NADRA, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 2007, s. 93-101.

- VELDHUIZEN, E. J. A., BOKHOVEN, J. L. M. T., ZWEIJTZER, C., BURT, S. A., HAAGSMAN, H. P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, s. 1874-1879.
- WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y., RUSSELL, A. D., CATRENICH, C. E., CHARBONNEAU, D. L., BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94, s. 240-247.
- WAN, L. S. C.; HWANG, C. L. Antioxidant solubility and efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1969, 58, s. 889-891.
- WARGOVICH, M. J. Anticancer properties of fruits and vegetables. *Hortscience*, 2000, 35(4), s. 573-575.
- WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opinion Microbiol.*, 2003, 6, s. 439-445.
- WONG, S. Y. Y.; GRANT, I. R.; FRIEDMAN, M.; ELLIOTT, CH. T.; SITU, CH. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19), s. 5986-5990.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47, s. 174-179.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, s. 255-260.
- ZARRINI, G.; DELGOSHA, Z. B.; MOGHADDAM, M. K.; SHAHVERDI, A. R. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical Biology*, 2010, 48, s. 633-636.
- ZHOU, L.; WANG, L. D.; LIU, Y.; WU, J. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Natural Product Research*, 2007, 21, s. 283-291.
- ZOTTI, M.; COLAIANNA, M.; MORGESE, M. G.; TUCCI, P.; SCHIAVONE, S.; AVATO, P.; TRABACE, L. Carvacrol: From Ancient Flavoring to Neuromodulatory Agent. *Molecules*, 2013, 18, s. 6161-6172.

Webové odkazy k Obrázkům 5 – 21

- [1] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21105998.html>
- [2] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21105867.html>
- [3] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13876103.html>
- [4] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html>
- [5] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7150.html>
- [6] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.12693.html>
- [7] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propyl_gallate#section=Top
- [8] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octyl_gallate#section=Top
- [9] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/usnic_acid#section=Top

- [10] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281435#section=Names-and-Identifiers>
- [11] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-pinene#section=Top>
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-pinene#section=Top>
- [13] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/-Limonene#section=Top>
- [14] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/berberine#section=Top>
- [15] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quercetin#section=Top>
- [16] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rosmarinic_acid#section=Top
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-cymene#section=Names-and-Identifiers>