

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti prokyanidinů
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra Večeřová**
Osobní číslo: **C22266**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti prokyanidinů**
Téma práce anglicky: **Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Procyanidins**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte přírodním matricím s antimikrobiálním potenciálem a možností jejich testování.
2. Detailněji se věnujte polyfenolickým látkách a jejich biologickému potenciálu.
3. Shrňte dostupné informace o skupině prokyanidinů (vlastnosti, výskyt, aj.) a jejich antimikrobiálním a antibiofilmovém potenciálu.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti prokyanidinů**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2025

Petra Večeřová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, doc. Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D., za jeho trpělivost, odborné vedení a cenné rady při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla po celou dobu studia velkou oporou.

ANOTACE

Frekvence infekcí způsobených patogenními bakteriemi, kvasinkami a mikroskopickými vláknitými houbami se neustále zvyšuje, a to hlavně v důsledku vzrůstajícího výskytu mikroorganismů rezistentních k současně používaným antimikrobiálním látkám. Právě proto je v poslední době kladem velký důraz na výzkum nových sloučenin s možnými antimikrobiálními účinky. Práce popisuje metody stanovení antimikrobiální a antibiofilmové aktivity přírodních látek a také metody jejich extrakce z přírodních matric. Text bakalářské práce je zaměřen především na poznatky z aktuální odborné literatury týkající se antimikrobiálního potenciálu skupiny prokyanidinů. Práce také popisuje mechanismus účinků prokyanidinů na patogenní mikroorganismy se zaměřením na účinky antimikrobiální a antibiofilmové.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antibiofilmové vlastnosti, antimikrobiální vlastnosti, biofilm, flavonoidy, prokyanidiny, přírodní látky

TITLE

Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Procyanidins

ANNOTATION

The frequency of infectious caused by pathogenic bacteria, yeasts and fungi is continuously increasing, mainly due to the rising occurrence of microorganisms resistant to currently used antimicrobial agents. Therefore, increasing emphasis is being placed on the research of new compounds with potential antimicrobial effects. This bachelor's thesis summarizes findings from recent scientific literature regarding natural substances with antimicrobial potential, focusing specifically on the group of procyanidins. Furthermore, the thesis describes methods for determining the antimicrobial and antibiofilm activity of natural compounds, as well as techniques for their extraction from natural matrices. It also discusses the mechanisms of procyanidin activity against pathogenic microorganisms, with particular emphasis on their antimicrobial and antibiofilm effects.

KEYWORDS

Antibiofilm properties, antimicrobial properties, biofilm, flavonoids, procyanidins, natural compounds

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	7
ÚVOD.....	10
1. Přírodní substance s antimikrobiálním potenciálem.....	11
1.1. Stanovení antimikrobiální aktivity přírodních látek.....	12
1.1.1. Difuzní metody.....	12
1.1.2. Diluční metody.....	14
1.1.3. Time-kill test.....	16
1.1.4. ATP bioluminiscenční test.....	17
1.1.5. Průtoková cytometrie.....	18
2. Mikrobiální biofilm.....	20
2.1. Tvorba biofilmu.....	21
2.2. Složení a stavba biofilmu.....	22
2.3. Metody detekce tvorby biofilmu.....	23
2.3.1. Detekce tvorby biofilmu v mikrotitračních destičkách.....	23
2.3.2. Detekce tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody.....	24
2.3.3. Detekce biofilmu metodou kultivace na agaru s kongo červení.....	24
2.3.4. Dynamické metody stanovení biofilmu.....	25
2.3.5. Zobrazovací metody detekce biofilmu.....	26
3. Flavonoidy.....	27
3.1. Chemická struktura flavonoidů.....	27
4. Prokyanidiny.....	29
4.1. Chemická struktura prokyanidinů.....	29
4.2. Výskyt prokyanidinů.....	31
4.3. Metody extrakce prokyanidinů.....	32
4.3.1. Jednoduché extrakční techniky.....	32
4.3.2. Soxhletova extrakce.....	33
4.3.3. Ultrazvukem asistovaná extrakce.....	34
4.3.4. Mikrovlnná extrakce.....	35
4.3.5. Superkritická fluidní extrakce.....	35
4.3.6. Extrakce za zvýšeného tlaku.....	36

4.4. Mechanismy účinku prokyanidinů.....	37
4.4.1. Antioxidační účinek prokyanidinů.....	37
4.4.2. Protizánětlivý efekt prokyanidinů.....	38
4.4.3. Antineoplastická aktivita prokyanidinů	38
5. Biologické účinky prokyanidinů.....	40
5.1. Antimikrobiální účinky prokyanidinů	40
5.1.1. Antimikrobiální účinky způsobené narušením buněčné membrány.....	41
5.1.2. Další mechanismy antimikrobiálních účinků.....	43
5.1.3. Synergický efekt prokyanidinů a dalších látek	43
5.2. Antibiofilmové účinky prokyanidinů.....	44
5.2.1. Antibiofilmové účinky způsobené narušením QS	45
5.2.2. Antibiofilmové účinky způsobené narušením schopnosti adheze	46
5.2.3. Antibiofilmové účinky způsobené narušením schopnosti pohybu	47
5.3. Prováděné klinické studie a patentová ochrana	48
ZÁVĚR	50
POUŽITÁ LITERATURA	51

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Výsledek testování citlivosti <i>Echerichia coli</i> k pěti antibiotikům pomocí diskové difuzní metody	13
Obrázek 2: Ukázka odečítání výsledných MIC při testování pomocí Etestu.....	14
Obrázek 3: Schéma provedení makrodiluční bujónové metody	15
Obrázek 4: Ukázka výsledku makrodiluční bujónové metody	16
Obrázek 5: Princip stanovení citlivosti bakterie k antimikrobiální látce pomocí ATP bioluminiscenčního testu	17
Obrázek 6: Princip průtokové cytometrie – měřené interakce světla s buňkou (A), schéma průtoku suspenze buněk přístrojem (B)	18
Obrázek 7: Životní cyklus biofilmu	21
Obrázek 8: Zkumavková metoda pro detekci tvorby biofilmu	24
Obrázek 9: Produkce biofilmu bakterií <i>Staphylococcus aureus</i> na agaru s kongo červení	25
Obrázek 10: Schéma sestavy pro stanovení biofilmu s pomocí průtokové cely	25
Obrázek 11: Flavanové jádro	28
Obrázek 12: Chemická struktura katechinu a epikatechinu	30
Obrázek 13: Chemická struktura prokyanidinu typu A a prokyanidinu typu B.....	30
Obrázek 14: Nákres Soxhletova extraktoru	34
Obrázek 15: Obraz buněk <i>Staphylococcus aureus</i> pořízený elektronovým mikroskopem bez/s prokyanidinů z kůry modřínu (LBPC).....	42
Obrázek 16: Průkaz pohybu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – u kontrolního vzorku a u vzorku s extraktem prokyanidinů z klikvy velkoplodé.....	47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	Adenosintrifosfát
BHI	Mozkosrdcová infúze (z angl. Brain Heart Infusion)
C.	<i>Candida</i>
CFU	Kolonie tvořící jednotky (z angl. Colony-Forming Units)
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy (z angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)
di-GMP	Diguanosil monofosfát
DP	Stupeň polymerace (z angl. Degree of Polymerization)
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EPS	Exopolysacharidy
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (z angl. EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
HSL	Homoserinové laktony
LBPC	Prokyanidiny z kůry modřínu (z angl. Larch Bark Procyanidins Complex)
MAE	Mikrovlnná extrakce (z angl. Microwave-Assisted Extraction)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (z angl. Minimum Inhibitory Concentration)
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NF- κ B	Nukleární faktor κ B
P.	<i>Pseudomonas</i>
PB2	Prokyanidin B2
PLE	Extrakce za zvýšeného tlaku (z angl. Pressurized Liquid Extraction)
QS	Způsob buněčné komunikace na základě hustoty buněk (z angl. Quorum Sensing)

RLU	Relativní světelné jednotky (z angl. Relative Light Units)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
S.	<i>Staphylococcus</i>
SC-CO ₂	Extrakce superkritickým oxidem uhličitým (z angl. SuperCritical CO₂)
SEM	Elektronová rastrovací mikroskopie (z angl. Scanning Electron Microscopy)
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SWE	Extrakce subkritickou vodou (z angl. Subcritical Water Extraction)
TEM	Elektronová transmisní mikroskopie (z angl. Transmission Electron Microscopy)
UAE	Ultrazvukem asistovaná extrakce (z angl. Ultrasound-Assisted Extraction)
UV	Ultrafialové záření (z angl. UltraViolet radiation)

ÚVOD

Prokyanidiny jsou skupinou organických látek patřících mezi polyfenoly, konkrétně do skupiny látek nazývaných kondenzované třísloviny. Nacházejí se ve velkém množství přírodních matric, v kůře, listech i plodech rostlin. Jedná se o látky biologicky aktivní, které prokázaly významné antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a antibiofilmové účinky.

Antimikrobiální účinky prokyanidinů a dalších substancí přírodního původu jsou předmětem mnohých výzkumů. Vzhledem ke vzrůstající míře rezistence mikroorganismů k běžně používaným antibiotikům jsou právě přírodní látky potenciálním řešením léčby infekcí způsobených rezistentními patogenními mikroorganismy. Antibiofilmové účinky prokyanidinů jsou rovněž aktuálním tématem, protože právě přítomnost biofilmu je spojována s většinou nosokomiálních infekcí a chronických onemocnění.

Tato práce shrnuje poznatky z aktuální odborné literatury týkající se přírodních substancí s antimikrobiálním potenciálem. Konkrétně se zaměřuje na skupinu prokyanidinů. Dále práce popisuje metody stanovení antimikrobiální a antibiofilmové aktivity přírodních látek a také metody používané k extrakci prokyanidinů z přírodních matric. Druhá část práce popisuje mechanismy účinků prokyanidinů na patogenní mikroorganismy se zaměřením na účinky antimikrobiální a antibiofilmové. Dále je v textu popisován synergický efekt prokyanidinů a dalších antimikrobiálních látek.

1. Přírodní substance s antimikrobiálním potenciálem

Patogenní bakterie způsobují nespočet onemocnění nejen u lidí, ale také u zvířat. Frekvence výskytu bakteriálních infekcí se neustále zvyšuje, a to hlavně v důsledku vzrůstajícího výskytu rezistentních mikroorganismů k současně používaným antimikrobiálním látkám. Problémem mnoha léčiv jsou také nežádoucí vedlejší účinky, nebo dokonce prokázání jejich toxicity pro lidský organismus. Také proto je v posledních letech kladen velký důraz na výzkum nových sloučenin, které by mohly nahradit některé dosud používané látky (Sanchez *et al.*, 2021).

Předmětem současných výzkumů jsou mimo jiné i přírodní substance s antimikrobiálním potenciálem. Jedná se o chemické látky přírodního původu, které by potenciálně mohly mít schopnost léčit infekce způsobené patogenními mikroorganismy (Sanchez *et al.*, 2021). Dalším důvodem pro hlubší výzkum těchto látek je možnost nalezení nových chemických struktur a mechanismů jejich fungování, které by mohly sloužit jako podklad k vytvoření nových chemoterapeutik. Zájem o výzkum přírodních léčivých látek dokládá také fakt, že sloučeniny přírodního původu činily 33 % nových nízkomolekulárních léčiv uvedených na trh v letech 1980–2014. Dalších 32 % léčiv bylo syntetizováno dle známé struktury přírodních látek (Igarashi, 2019).

V současnosti jsou testovány možné antimikrobiální účinky látek z různých zdrojů, a to z prokaryot (bakterie) i z eukaryot (mikrobiální eukaryota, rostliny a živočichové). Jedná se o látky různé chemické struktury, od rostlinných extraktů až po mnohé sekundární metabolity či esenciální oleje (Balouiri *et al.*, 2016). Z výzkumů vyplývá, že právě esenciální oleje by mohly být vhodné při léčbě infekcí způsobených dokonce i rezistentními kmeny bakterií. Hlavními přednostmi je jejich přírodní původ, nízká toxicita, širokospektré antimikrobiální účinky a nízká pořizovací cena. Antimikrobiální aktivita bývá často spojována s určitou specifickou strukturou. Ve většině případů se jedná o areny nebo o hydroxyderiváty uhlovodíků (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). Další zkoumanou skupinou přírodních látek jsou polyfenoly nacházející se např. ve slupkách mandlí. Tyto látky prokázaly významné antivirotické a antimikrobiální účinky, proto je také možné uvažovat o jejich využití. Nesmíme zapomenout také na antimikrobiální látky izolované z bakterií, např. z řádu *Actinomycetales*. Metabolity těchto bakterií byly identifikovány jako možná antituberkulotika a antibiotika účinná i proti rezistentním kmenům bakterií (Igarashi, 2019). Mezi zkoumané antimikrobiální látky patří také flavonoidy a prokyanidiny, o kterých pojednávají další kapitoly.

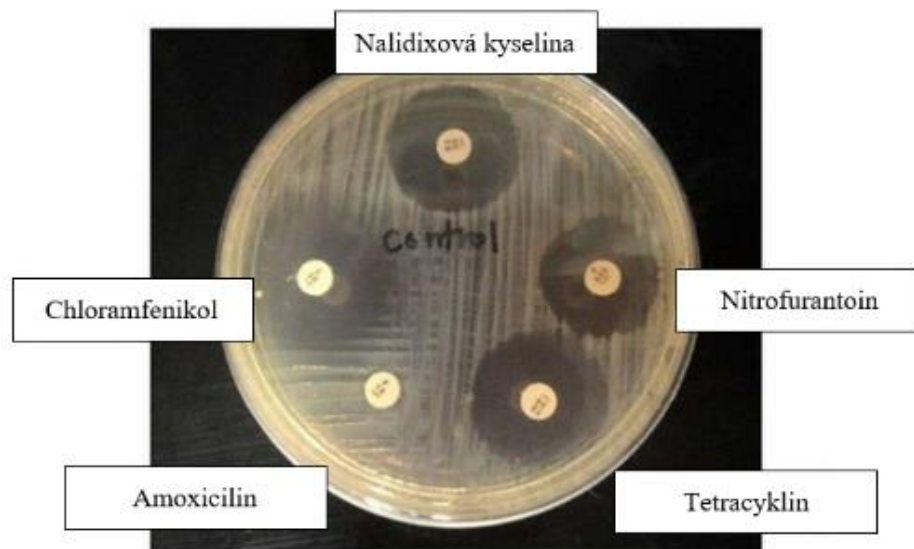
1.1. Stanovení antimikrobiální aktivity přírodních látek

Pro *in vitro* stanovení antimikrobiální aktivity přírodních látek mohou být použity různé metody. Nejčastěji se jedná o difuzní a diluční metody (Sanchez *et al.*, 2021). Pro hlubší prozkoumání účinků látek je využíván též tzv. *time-kill test*. Tímto testováním můžeme zjistit, zda se jedná o mikrobistatickou či mikrobicidní látku a zda je účinek závislý na době expozice či koncentraci sledované látky (Balouiri *et al.*, 2016). Je však možné použít i metody průtokové cytometrie nebo např. bioluminiscenční test pro zjištění přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP). U posledních dvou metod je však potřeba použití specifického vybavení s vyšší pořizovací cenou. Nejedná se tedy o časté způsoby stanovení antimikrobiální aktivity (Sanchez *et al.*, 2021). Přínosy a nevýhody jednotlivých metod jsou shrnuty v následujících odstavcích.

1.1.1. Difuzní metody

Disková difuzní metoda je jedna ze standardních metod využívaných v klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování citlivosti bakterií k antibiotikům. Tato metoda byla v určitých modifikacích používána již v roce 1940, jak také dokládá historická literatura (Heatley, 1944). Pro tyto účely jsou stanoveny a průběžně upravovány mezní hodnoty (tzv. breakpointy) definované autoritami jako je EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) nebo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Balouiri *et al.*, 2016).

Při diskové difuzní metodě jsou nejprve naočkovány agarové plotny standardizovaným inokulem daného mikroorganismu o určité buněčné densitě. U bakterií jde nejčastěji o inokulum, odpovídající stupni 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice, což je $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Poté jsou na inokulované živné médium naneseny disky filtračního papíru (nejčastěji o průměru 6 mm) napuštěné testovanou látkou. Takto připravené Petriho misky jsou následně inkubovány za daných podmínek dle nároků daného mikroorganismu. Většina bakterií je inkubována při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 16–18 hod. Pro kultivačně náročné mikroorganismy je doporučeno použití speciálních médií a také inkubačních podmínek. Testované látky difundují do agarů v okolí disků. Následně je změřen průměr vzniklé inhibiční zóny (viz obrázek 1).

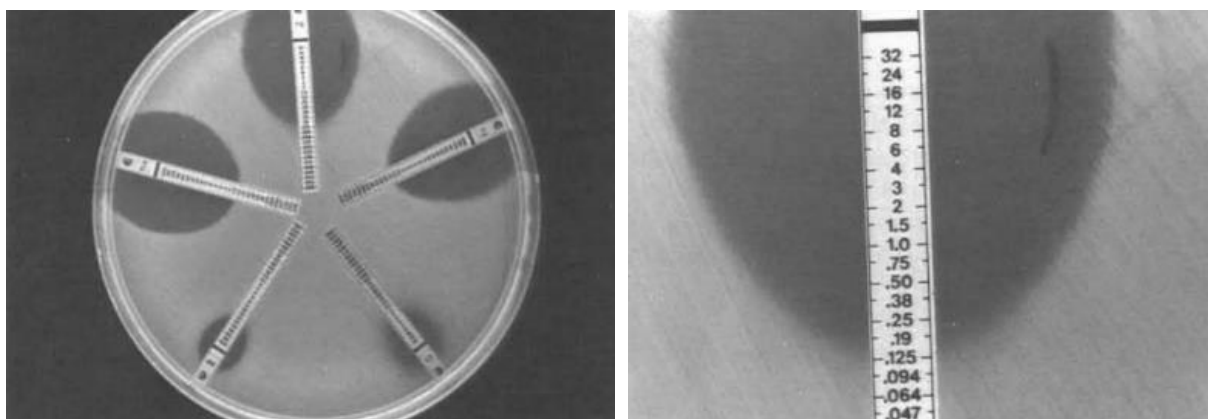


Obrázek 1: Výsledek testování citlivosti *Echerichia coli* k pěti antibiotikům pomocí diskové difuzní metody (upraveno dle Sien et al., 2022)

Pokud je k testované látce daný mikroorganismus citlivý, dochází k významné inhibici růstu naočkovaného kmene a ke vzniku inhibiční zóny o větším průměru. Po porovnání průměrů inhibičních zón se standardy můžeme mikroorganismy rozdělit na citlivé a rezistentní. Toto rozdělení je však pouze na kvalitativní úrovni, neříká nám tedy přesné informace o vhodné koncentraci antimikrobiální látky. Tato metoda také nedokáže rozlišit, zda se jedná o bakteriostatický, či bakteriocidní účinek dané substance. Metoda má však i spoustu výhod, je jednoduchá na provedení i na interpretaci, je také nenákladná a umožňuje testování citlivosti velkého počtu mikroorganismů k mnoha látkám. Výhodou také je, že výsledky testování *in vitro* často odpovídají působení látky *in vivo*. Díky všem zmiňovaným výhodám je tato metoda hojně využívána ke stanovování antimikrobiálních účinků přírodních extraktů, esenciálních olejů a dalších látek (Balouiri *et al.*, 2016).

Difuzní jamková metoda je jednou z modifikací metody diskové. Rozdílem je, že nejsou použity disky filtračního papíru napuštěné testovanou látkou. Do agarového média jsou asepticky vyraženy jamky o průměru 6–8 mm, do kterých je napipetováno 20–100 µl testované látky. Další postup inkubace a vyhodnocení je shodný s diskovou metodou (Balouiri *et al.*, 2016). Kromě výše zmiňovaných difuzních metod je možné použít jejich další modifikace. Liší se např. specifitou pro určité mikroorganismy nebo způsobem aplikace testovaných látek.

Etest je gradientová metoda rovněž patřící mezi difuzní metody. Tato metoda slouží k určení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Při testování citlivosti určitého mikroorganismu ke zkoumané látce je potřeba vytvořit koncentrační gradient na agaru s naočkovaným mikroorganismem. Gradient je vytvořen vložením stripu napuštěného testovanou látkou. Po inkubaci je možné odečíst MIC, a to podle místa, kde se vzniklá inhibiční zóna protne se stripem (Sader and Pignatari, 1994). Odečítání výsledné MIC ukazuje obrázek 2.



Obrázek 2: Ukázka odečítání výsledných MIC při testování pomocí Etestu (Sader and Pignatari, 1994)

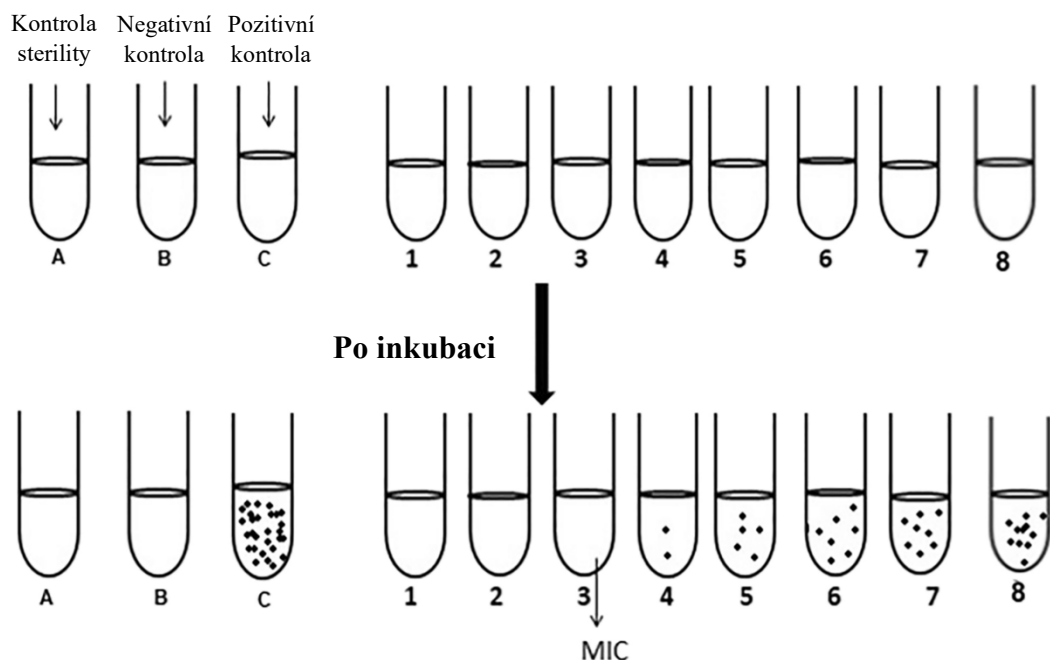
Příprava stripů přímo v laboratoři je technicky, finančně i časově náročná. Tato metoda se tedy využívá zejména v klinické praxi pro stanovení citlivosti mikroorganismů k běžným antibiotikům, pro které jsou stripy komerčně dostupné. Nákup stripů může být poměrně nákladný. Výhodou tohoto stanovení však je možnost prověření vzájemných interakcí více zkoumaných látek. Pro zjištění kombinovaných efektů dvou látek je nejprve na naočkovanou půdu umístěn strip s první testovanou látkou a po jedné hodině je strip odstraněn a na půdu je umístěn strip s další látkou. Jako synergický účinek můžeme vzájemnou interakci označit, pokud dojde k výraznému snížení MIC při kombinaci oproti hodnotě MIC samostatně působící látky o vyšší antimikrobiální účinnosti (Balouiri *et al.*, 2016).

1.1.2. Diluční metody

Diluční metody umožňují kvantitativně stanovit antimikrobiální vlastnosti zkoumaných látek a jsou proto hojně používané pro přesné stanovení MIC. Při dilučních metodách je vytvořen gradient dané látky v agaru (agarová diluční metoda), či v bujónu (makrodiluční nebo mikrodiluční metoda). Jako MIC je poté označena nejnižší koncentrace látky, při které je možné pozorovat inhibici viditelného nárůstu mikroorganismů. Většinou je vyjadřována v $\mu\text{g/ml}$ nebo v mg/l . Také pro tyto metody jsou dané doporučené postupy a breakpointy prostřednictvím CLSI a EUCAST. Tyto postupy lze při volbě správných podmínek použít i

při stanovování antimikrobiálních vlastností přírodních látek či extraktů ve výzkumných laboratořích (Balouiri *et al.*, 2016).

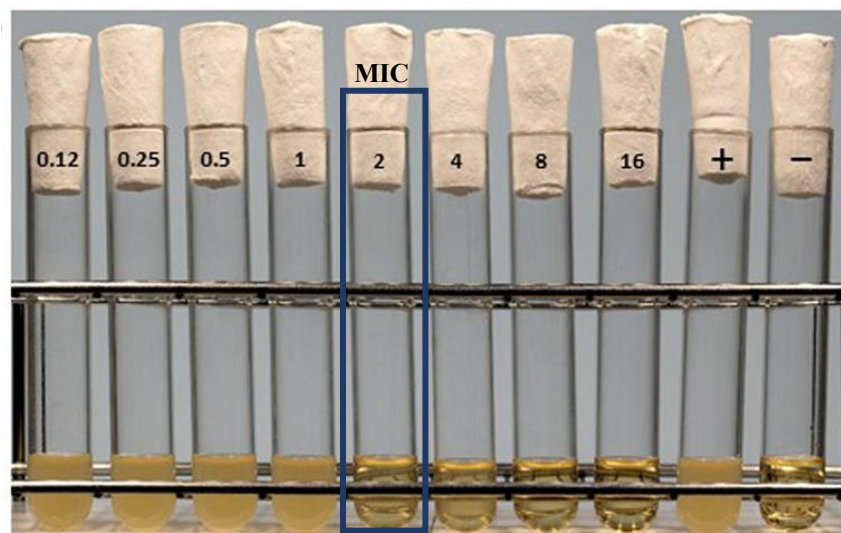
Jednou z dilučních metod je **bujónová diluční metoda**, při které je nejprve dvojkovým ředěním připravena koncentrační řada testované látky v tekutém živném médiu. Tyto roztoky mohou být připraveny do zkumavek o objemu větším než 2 ml (**makrodiluční metoda**), nebo do jamek mikrotitrační destičky (**mikrodiluční metoda**). Schéma provedení a následného vyhodnocení makrodiluční bujónové metody ukazuje obrázek 3.



Obrázek 3: Schéma provedení makrodiluční bujónové metody (upraveno dle Nehra and Chauhan, 2023)

Po přípravě koncentrační řady je každá zkumavka či jamka naočkována inokulem mikroorganismu o zvolené buněčné densitě (nejčastěji odpovídající stupni 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice). Po důkladném promíchání jsou vzorky inkubovány za podmínek dle nároků mikroorganismu. Po inkubaci může být odečtena MIC hned několika způsoby. Jednou z možností je vizuální určení minimální koncentrace testované látky s úplnou inhibicí růstu mikroorganismu (viz obrázek 4). Další možností je využití přístrojových technik (např. spektrofotometrie) nebo kolorimetrických metod. Při kolorimetrických metodách jsou využívána barevná činidla (např. tetrazoliové soli, MTT nebo XTT) (Al-Bakri and Afifi, 2007) a také indikátory růstu (např. resazurin) (Castilho *et al.*, 2015). V současné době je více preferovaná mikrodiluční metoda než metoda makrodiluční. Při mikrodiluční metodě je

výrazně nižší spotřeba reagensů, proto je tato metoda výrazně ekonomicky výhodnější (Balouiri *et al.*, 2016).



Obrázek 4: Ukázka výsledku makrodiluční bujonové metody – pozitivní kontrola (+), negativní kontrola (-), MIC (2 $\mu\text{g/ml}$) (upraveno dle Feßler *et al.*, 2023)

Další diluční metodou je **agarová diluční metoda**. Tato metoda je využívána zejména pokud testovaná látka znemožňuje svým zbarvením správné vyhodnocení diluční metody v bujónu. Agarová metoda je také vhodná pro kultivačně náročné mikroorganismy (např. pro anaeroby či helikobaktery) (Balouiri *et al.*, 2016). Při této metodě je připraveno několik ploten s agarovým médiem s přidavkem testované látky o různých koncentracích. Na takto připravené plotny je naočkován zvolený mikroorganismus a po inkubaci je odečtena MIC. V současné době jsou komerčně dodávány i zařízení k přenosu inokula na agarové plotny. Dokážou tak naočkovat na jednu plotnu 32–60 různých inokul zároveň, což výrazně zjednodušuje a urychluje testování citlivosti mnoha kmenů bakterií k určité látce.

1.1.3. Time-kill test

Time-kill test poskytuje informace o dynamice působení antimikrobiální látky na zvolený kmen. Ukazuje tedy časovou závislost antimikrobiálního efektu. Tato metoda je také využívána na stanovení synergického či antagonického účinku dvou či více antimikrobiálních látek (White *et al.*, 1996).

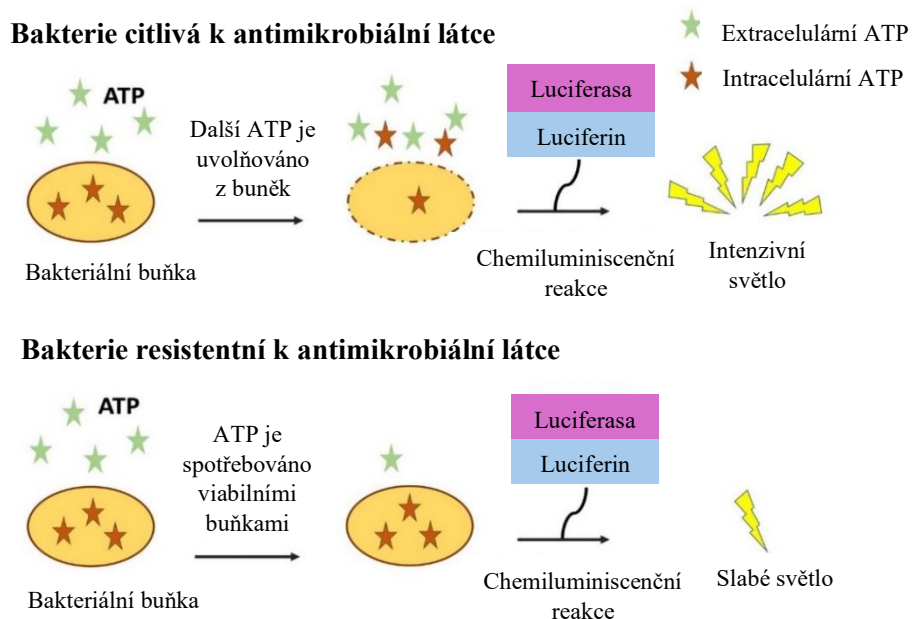
Test se provádí nejčastěji ve třech zkumavkách. Do všech zkumavek je nepipetován stejný objem bujonového živného média. Každá zkumavka také obsahuje inokulum zpravidla o buněčné densitě 5×10^5 CFU/ml. Do první a druhé zkumavky je přidána testovaná látka.

Koncentrace této látky v první zkumavce by měla odpovídat čtvrtinové hodnotě MIC. V druhé zkumavce by koncentrace látky měla odpovídat hodnotě MIC. Třetí zkumavka slouží pouze jako kontrola růstu mikroorganismu. Všechny tři zkumavky jsou poté inkubovány za vhodných podmínek po předem určené časové intervaly (např. 0, 4, 6, 8, 10, 12 a 24 hod.). Po inkubaci je vždy vypočítán poměr mrtvých buněk vzhledem ke kontrole. Počet živých buněk ve všech zkumavkách je stanoven kultivačním postupem (hodnocení CFU po kultivaci) (Balouiri *et al.*, 2016). Jako baktericidní můžeme označit látky, které způsobí usmrcení 90 % buněk po 6 hod. expozice, což je ekvivalent usmrcení 99,9 % buněk za 24 hod. (Konatě *et al.*, 2012).

1.1.4. ATP bioluminiscenční test

Principem ATP bioluminiscenčního testu je stanovení adenosintrifosfátu (ATP) ve vzorku, díky čemuž můžeme vyhodnotit počet živých mikroorganismů. Díky tomuto testu můžeme stanovit poměr živých a mrtvých buněk po působení potenciálně antimikrobiální látky na konkrétní mikroorganismus (bakterie, mykobakterie, kvasinky i mikroskopické vláknité houby).

ATP je stanoveno díky reakci D-luciferinu, který v přítomnosti této molekuly přechází pomocí luciferasy na oxyluciferin emitující světlo. Toto světlo je poté kvantifikováno luminometrem a vyjadřováno v relativních světelných jednotkách (RLU). Míra luminiscence je přímo úměrná množství viabilních buněk ve vzorku (Balouiri *et al.*, 2016). Princip stanovení citlivosti mikroorganismu k antimikrobiální látce pomocí tohoto testu je znázorněn na obrázku 5.

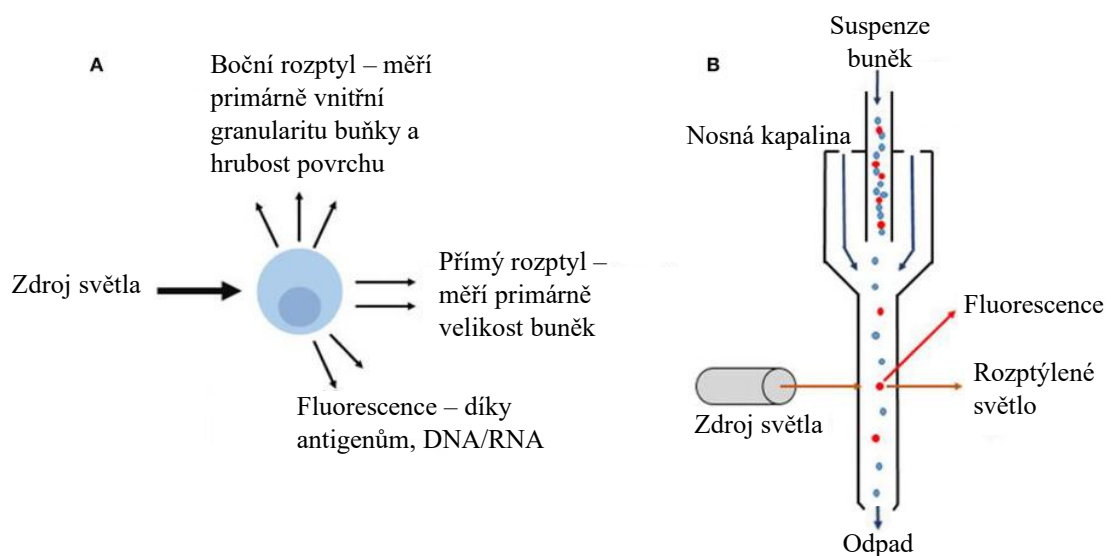


Obrázek 5: Princip stanovení citlivosti bakterie k antimikrobiální látce pomocí ATP bioluminiscenčního testu (upraveno dle Sever *et al.*, 2024)

Výhodou tohoto testu je možnost rychlého získání výsledků. V jednom z výzkumů bylo prokázáno, že pomocí této techniky je možné získat výsledek pro mykobakterie již do 3–5 dnů, na rozdíl od klasických dilučních metod, při kterých může trvat získání výsledku až 3–4 týdny (Beckers *et al.*, 1985). Další výhodou je také možnost použití této metody pro testování citlivosti k antimikrobiálním látkám *in vitro* nebo *in situ* (Vojtek *et al.*, 2014).

1.1.5. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje multi-parametrickou analýzu buněk či částic nacházejících se v suspenzi. Principem analýzy je rozptyl světla na jednotlivých buňkách procházejících přístrojem. Díky detektorům tvořeným fotodiodami nebo fotonásobičem můžeme zaznamenávat rozptyl světla v přímém směru a pod úhlem 90°. Přímý rozptyl nám poskytuje informace o velikosti buněk a velikost bočního rozptylu závisí na vnitřní granularitě a hrubosti povrchu buněk (McKinnon, 2018). Princip průtokové cytometrie zobrazuje obrázek 6. Můžeme také zaznamenávat míru fluorescence buněk po obarvení specifických buněčných komponent fluorescenčními barvivy. Jedním z používaných barviv je propidium jodid, který má schopnost interkalace do DNA buněk v případě poškození membrány buňky. Přítomnost buněk s narušenými membránami pak může značit míru účinku testované látky, resp. citlivost daného mikroorganismu k testované látce (Balouiri *et al.*, 2016).



Obrázek 6: Princip průtokové cytometrie – měření interakce světla s buňkou (A), schéma průtoku suspenze buněk přístrojem (B) (upraveno dle Vembadi *et al.*, 2019)

Průtoková cytometrie umožňuje rozlišit suspendované buňky v tekutém živném prostředí na živé, poškozené a mrtvé. Toto rozdělení nám může pomoci odhalit účinnost testované

antimikrobiální látky na konkrétní mikroorganismus. Možnost odhalení poškozených buněk, které sice nejsou mrtvé, ale často ztrácí schopnost se dál množit, je velkým přínosem zejména v potravinářské mikrobiologii. Poměr těchto buněk hraje významnou roli ve schopnosti bakterií obnovit svou populaci a není odhalitelný běžnou metodou počítání kolonií na agarové plotně (Paparella *et al.*, 2008).

Výhodou této metody je velká rychlost získání výsledků (2–6 hod.) v porovnání např. s mikrodiluční metodou (24–72 hod.). Nevýhodou je však potřeba poměrně drahého přístrojového vybavení, proto tato metoda není rozšířená v běžných klinických laboratořích (Ramani and Chaturvedi, 2000). Je však možné využití této metody k výzkumným účelům a k testování potenciálních antimikrobiálních účinků látek přírodního původu.

2. Mikrobiální biofilm

Obecně můžeme bakterie najít ve dvou základních stavech, a to jako volně plovoucí (planktonické) buňky a přisedlé buňky. Některé vlastnosti bakterií se liší v závislosti na jejich momentálním stavu. Např. přisednutí buněk působí změny v expresi genů kódujících tvorbu exopolysacharidů (EPS) (Sharma *et al.*, 2023). Přisedlé buňky tvoří základ mikrobiálního biofilmu.

Pojem biofilm označuje komplexní společenství mikroorganismů, které je tvořeno z mikrobiálních buněk obklopených extracelulární polymerní matrix tvořenou mikroorganismy. Schopnost tvořit biofilm má celá řada bakterií, nejčastěji biofilm pozorujeme u *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus* (Wu *et al.*, 2015). Biofilm se přichycuje k různým povrchům, případně tvoří agregáty v extracelulární matrix (Roy *et al.*, 2018). Takové společenství mikroorganismů (např. bakterií) je schopné přežívání a množení se jako jeden celek. Biofilm můžeme také označit za živou biomasu s určitou strukturou (Sharma *et al.*, 2023).

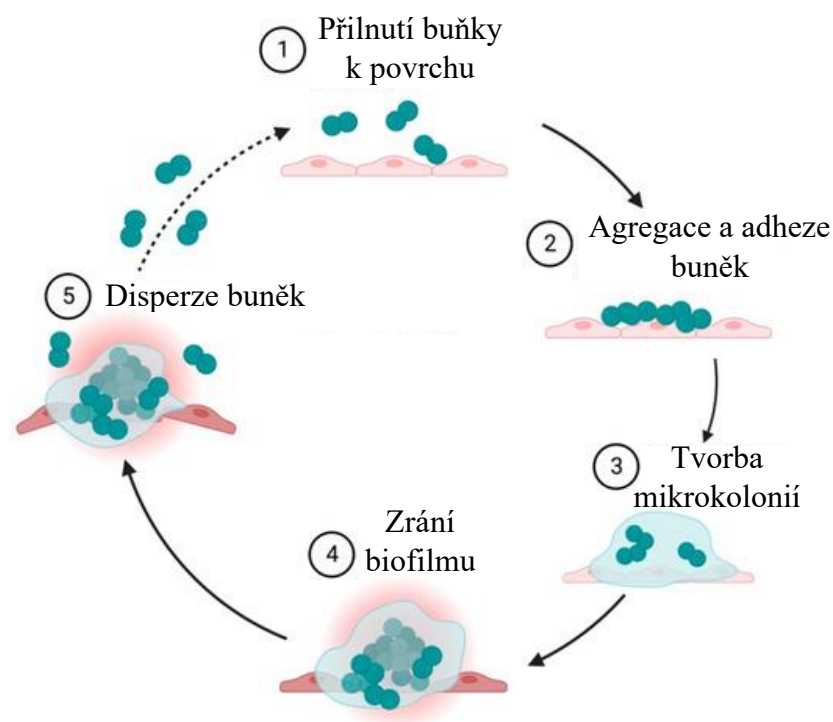
Biofilm chrání mikroorganismy před nepříznivými okolními podmínkami, a právě i před účinky antibiotik. Prokazují to také výzkumy, které stanovovaly hodnoty MIC běžně používaných antibiotik proti bakteriím tvořícím biofilm. Hodnoty MIC u těchto bakterií byly 10–1000× vyšší než u bakterií bez schopnosti tvořit biofilm (Hengzhuang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2015). Právě proto není v některých případech možné podat pacientům antibiotika v koncentraci odpovídající MIC, jelikož by tak vysoké koncentrace vykazovaly vysokou toxicitu a závažné vedlejší účinky. Léčba infekcí způsobených takovými kmeny bakterií je proto méně účinná. Podávaná antibiotika mohou pomoci regulovat vzniklou infekci a snížit tvorbu biofilmu, nikoliv však biofilm kompletně odstranit. Díky tvorbě biofilmu může rovněž celá řada infekcí přecházet do chronicity (Roy *et al.*, 2018). Další funkcí biofilmu je ochrana mikroorganismů podílejících se na této struktuře před imunitním systémem hostitele. Biofilm totiž narušuje aktivaci fagocytů a komplementu.

Biofilm je také spojován s většinou přetrvávajících nosokomiálních infekcí u imunokompromitovaných pacientů (Wu *et al.*, 2015). Více než 50 % všech nosokomiálních infekcí je spojováno se zdravotnickými pomůckami a implantáty umístěnými přímo do těla pacienta, např. kardiostimulátory, kloubní protézy, katetry, umělé srdeční chlopně

nebo kontaktní čočky (Wu *et al.*, 2015). Právě tyto materiály tvoří ideální povrch pro tvorbu biofilmu. Avšak jsou popisovány i další onemocnění v souvislosti s tvorbou biofilmů, např. chronická onemocnění dýchacích cest u pacientů s cystickou fibrózou, nebo s chronickým obstrukčním onemocněním plic, endokarditidou, chronickou otitidou, sinusitidou nebo chronickou infekcí ran u pacientů s diabetem.

2.1. Tvorba biofilmu

Tvorbu biofilmu je možné rozdělit do třech základních fází. Nejprve dochází k přilnutí bakteriálních buněk k povrchu, poté následuje tvorba mikrokolonií, a nakonec dochází k diferenciaci biofilmu ve zralou strukturu. Konkrétní postup tvorby biofilmu je zobrazen na obrázku 7.



Obrázek 7: Životní cyklus biofilmu (upraveno dle Sharma *et al.*, 2023)

Celý proces začíná přilnutím volně plovoucí buňky k povrchu. Konkrétní místo přilnutí závisí na přitažlivých či odpuzivých silách, které vznikají v důsledku přítomnosti živin, hodnoty pH a teploty v daném místě. Toto přilnutí je však ještě reverzibilní. Následuje agregace více bakteriálních buněk a jejich adheze k povrchu. Jedná se již o ireverzibilní proces vzniku mikrokolonií. Poté dochází k produkci složek extracelulární matrix, vč. exopolysacharidů (EPS). Právě sekrece polysacharidů napomáhá bakteriím tvořícím biofilm lépe přilnout a agregovat (Sharma *et al.*, 2023). Adheze biofilmu k substrátu je ovlivněna Lifshitz-van

der Waalsovými silami a také hydrostatickými, acidobazickými a elektrostatickými interakcemi. Přilnutí bakterií také napomáhá přítomnost specifických proteinů na povrchu (např. OmpA, fibronectin vázající protein, protein A, nebo SasG). Některé bakterie nejsou schopné se vázat přímo na povrch, ale dokážou se navázat na předchozí mikrokolonie. Povrch biofilmu se často tvoří na rozhraní s kapalnou látkou (např. s krví nebo vodou). Jednotlivé kolonie poté mezi sebou komunikují pomocí malých signálních molekul. Tento způsob komunikace je označován jako *quorum sensing* (QS) a je při tvorbě biofilmu nepostradatelný (Roy *et al.*, 2018).

Dále dochází k dozrávání biofilmu a k tvorbě trojrozměrných struktur složených ze složek matrix. Plně dozrálý biofilm se může odloučit od povrchu a bakterie mohou přecházet opět do planktonické formy s potenciálem tvorby biofilmu na dalších místech. Tento proces umožňuje šíření biofilmů v lidském těle (Sharma *et al.*, 2023).

2.2. Složení a stavba biofilmu

Biofilm je tvořen z bakteriálních buněk obklopených extracelulární matrix. Přibližně 10 % biofilmu zaujímá mikrobiální masa a 90 % voda (Sharma *et al.*, 2023). Matrix je komplexní polární směsí biomolekul, obsahující proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a lipidy a slouží jako ochrana bakterií před antibakteriálními látkami i reakcemi imunitního systému. Pokud bakterie začne do extracelulární matrix vylučovat exopolysacharidy (EPS), dojde ke druhé fázi vývoje biofilmu. Jedná se o nevratný proces, při kterém právě EPS zajišťuje přilnutí bakterií k povrchu v přítomnosti tlusté vrstvy biomolekul. Takto vyzrálý biofilm zaujímá trojrozměrnou strukturu připomínající věž. Tato struktura obsahuje drobné kanálky pro transport živin, odpadních produktů a vody a také drobné póry, kam se mohou navázat další mikroorganismy (Roy *et al.*, 2018).

Největší část (50–90 %) všech organických komponent biofilmu tvoří polysacharidy. Ty se v matrix nacházejí spletené do husté síťovité struktury a jejich hydroxylové skupiny spolu navzájem interagují, což zvyšuje mechanickou odolnost biofilmu. Kromě biomakromolekul může biofilm obsahovat také kladně nabitě ionty (např. Ca^{2+} a Mg^{2+}), které vytváří vazby mezi polymery a tím napomáhají k udržování jejich struktury. Díky těmto složkám může biofilm dosahovat tloušťky až 300 μm (Sharma *et al.*, 2023). Konkrétní stavba biofilmu se liší u jednotlivých mikrobiálních kmenů, a to např. z důvodu odlišného složení extracelulární matrix (Roy *et al.*, 2018).

2.3. Metody detekce tvorby biofilmu

Pro stanovení antibiofilmového účinku přírodních látek je důležité prokázat, zda mikroorganismus tvoří biofilm po účinku testované látky, případně zhodnotit množství a strukturu biofilmu před a po působení této látky. Stanovit tvorbu biofilmu lze několika různými technikami, mezi ty nejzákladnější patří Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, Christensenova zkumavková metoda a kultivace na agaru s kongo červení. Dále je možné použít např. bioluminiscenční test nebo piezoelektrické senzory (Roy *et al.*, 2018).

Pokud je potřeba sledovat tvorbu biofilmu v reálném čase, je možné využít některou z dynamických metod. Pro zkoumání komplexní struktury jsou vhodné různé zobrazovací techniky. Jelikož je náročné kultivovat některé bakterie na umělých půdách, používají se pro stanovení biofilmu také genetické a molekulárně-biologické techniky (např. metoda polymerázové řetězcové reakce nebo sekvenace) (Cleaver and Garnett, 2023). Nejčastěji využívané metody popisují následující odstavce.

2.3.1. Detekce tvorby biofilmu v mikrotitračních destičkách

Základní metodou pro zjištění produkce biofilmu zahrnuje inkubaci mikrobiálních buněk v mikrotitrační destičce a následné barvení vyšetřeného biofilmu krystalovou violetí. Na speciální mikrotitrační destičce může vznikající biofilm přilnout. Další možností je inkubace testovaných bakterií na osmikomorových sklíčkách. Po inkubaci dochází k opakovanému promývání jamek, aby došlo k odstranění volných bakterií. Biofilm je obarven krystalovou violetí a intenzita zbarvení je změřena spektrofotometricky. Díky zjištění množství navázaného barviva je tedy možné kvantifikovat množství vytvořeného biofilmu.

Jedná se o poměrně rychlou a levnou metodu, ale její nevýhodou je odlišnost výsledků od reálných *in vivo* podmínek. V jamce mikrotitrační destičky totiž nedochází k úplnému dozrání biofilmu, protože na bakteriální buňky nepůsobí vnější síly, které jsou běžné v *in vivo* prostředí. Také je při inkubaci omezen přísun živin, jelikož kultivační médium je měněno obvykle každých 12–48 hod. (Cleaver and Garnett, 2023). Při této metodě je také potřeba opakovaného promývání vytvořeného biofilmu, při kterém může dojít k porušení jeho struktury (Roy *et al.*, 2018). I přes určité nepřesnosti je však metoda kultivace v mikrotitračních destičkách doporučovanou screeningovou metodou detekce biofilmu (Hassan *et al.* 2011).

2.3.2. Detekce tvorby biofilmu pomocí Christensenovy zkumavkové metody

Christensenova zkumavková metoda je jedna ze základních kvalitativních metod pro hodnocení biofilmu. Testovaný mikroorganismus je nejdříve naočkován do zkumavky s vhodným médiem a následně je inkubován. Po inkubaci je dekantován supernatant, zkumavka je promyta fosfátovým pufrům a ponechána vyschnout. Poté je obsah zkumavky obarven krystalovou violetí a přebytečné barvivo je vymyto deionizovanou vodou. Nakonec je zkumavka nechána vyschnout v obrácené poloze. Přítomnost biofilmu je potvrzena, pokud je možné na stěně a dně zkumavky pozorovat viditelný barevný povlak (Harika *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2011). Ukázkou výsledků zkumavkové metody zobrazuje obrázek 8.



Obrázek 8: Zkumavková metoda pro detekci tvorby biofilmu – pozitivní kontrola (PC), negativní kontrola (NC), vzorek v triplikátu (1) (Kunwar *et al.*, 2021)

2.3.3. Detekce biofilmu metodou kultivace na agaru s kongo červení

Metoda využívající kultivaci na agaru s kongo červení je kvalitativní metoda pro zjištění, zda určitý mikroorganismus tvoří biofilm či nikoliv. Při této metodě je využíváno speciální médium skládající se z mozkosrdcové infúze (BHI), sacharózy a kongo červeně. Kongo červeně je nejprve samostatně naředěna na požadovanou koncentraci, poté je vzniklý roztok sterilizován v autoklávu, a nakonec je přidán k agaru, který by měl mít teplotu 55 °C. Takto připravené médium je rozlito do Petriho misek a po ztuhnutí je na něj naočkován testovaný mikroorganismus (Harika *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2011). Po inkubaci je možné pozorovat mikroorganismy tvořící biofilm jako černě nebo tmavě zbarvené kolonie s matným a drsným povrchem. Mikroorganismy bez produkce biofilmu tvoří růžové až červené kolonie (viz obrázek 9) (Harika *et al.*, 2020; Růzicka *et al.*, 2004).

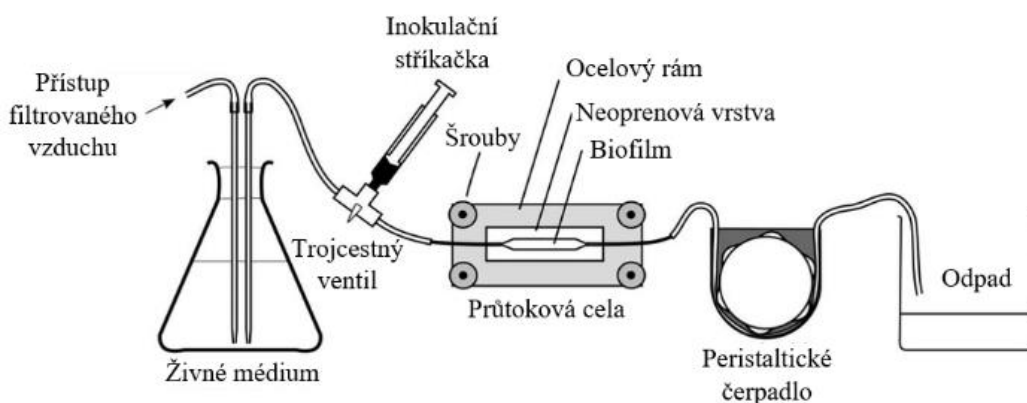


Obrázek 9: Produkce biofilmu bakterií *Staphylococcus aureus* na agaru s kongo červení – pozitivní produkce biofilmu (1), bez produkce biofilmu (2) (Karki et al., 2019)

2.3.4. Dynamické metody stanovení biofilmu

Dynamické metody stanovení biofilmu dokážou odstranit nepřesnosti způsobené nedostatkem živin a nedostatečným dozráním biofilmu. Díky dynamickým metodám je také možné sledovat růst biofilmu v reálném čase. Tyto metody jsou využívány zejména pro stanovení biofilmů bakterií žijících v dutině ústní, protože dokážou replikovat specifické prostředí způsobené konstantním působením slin (Cleaver and Garnett, 2023). Dalším využitím je sledování biofilmu bakterií osídlujících rány na kůži, kde dochází k neustálé výživě bakterií tvorbou exsudátu a je proto výhodné použít některou z dynamických metod (Duckworth *et al.*, 2018).

Jedna z dynamických metod využívá průtokové cely, díky kterým je možné pozorovat růst biofilmu v různém hydrodynamickém prostředí. Používá se sestava skládající se z nádoby s živným médiem, peristaltického čerpadla, které žene médium do průtokové cely obsahující komoru pro růst biofilmu, a z nádoby na odpad (viz obrázek 10).



Obrázek 10: Schéma sestavy pro stanovení biofilmu s pomocí průtokové cely (upraveno dle Rogers et al., 2008)

Místo živného média lze použít specifické barvivo, které lze poté použít k zobrazení struktury biofilmu s pomocí fluorescenční nebo konfokální mikroskopie. Výhodou použití průtokových cel je možnost sterilizace celé sestavy po ukončení měření. Je tak možné sestavu použít opakovaně, což výrazně snižuje finanční náklady. Pokud však není souprava správně sterilizována, může snadno dojít ke kontaminaci dalších stanovení (Cleaver and Garnett, 2023).

Další dynamická metoda využívá růst biofilmu v bioreaktorech. Jedním z používaných bioreaktorů je fermentor zajišťující konstantní tloušťku filmu. Fermentor zajišťuje přívod živin a výměnu plynů s okolním prostředím, což napodobuje podmínky pro růst biofilmů *in vivo*. Další výhodou je možnost přidání dalších živin nebo inhibitorů růstu speciálními porty (Cleaver and Garnett, 2023). Fermentor dále obsahuje otočný podstavec a škrabku, díky čemuž je v případě potřeby možné udržovat konstantní tloušťku biofilmu (Kinniment *et al.*, 1996).

2.3.5. Zobrazovací metody detekce biofilmu

Biofilm je také možné zkoumat díky zobrazovacím metodám, které se vzájemně liší v dosaženém rozlišení, ale také v cenové dostupnosti. Základní metodou je světelná mikroskopie, což je poměrně levná a nenáročná metoda. Je vhodná k potvrzení, zda je či není v analyzovaném vzorku biofilm přítomen. Pomocí světelné mikroskopie však není kvůli malému rozlišení možné zkoumat komplexní struktury biofilmů. Další využívanou metodou je fluorescenční mikroskopie s použitím speciálních fluorescenčních barviv. Díky této metodě je možné pozorovat např. živé a mrtvé buňky na povrchu biofilmu. Nevýhodou však je omezený čas analýzy, jelikož fluorescenční značení často rychle ztrácí svoji intenzitu během mikroskopického pozorování (Cleaver and Garnett, 2023).

Mezi jedny z nejpokročilejších zobrazovacích metod patří elektronová rastrovací mikroskopie (SEM) a elektronová transmisní mikroskopie (TEM). SEM je hojně využívaná metoda pro zobrazení 3D struktury biofilmu a pro zkoumání jeho interakcí s povrchem. Také byla využita k zhodnocení efektu antimikrobiálních látek a metod odstraňování biofilmu. TEM zatím není rutinně využívána kvůli potřebě vzorků ve velmi tenké vrstvě, což je momentálně pro vzorky biofilmu technicky náročné. Jsou však testovány pomocné techniky, díky kterým by TEM mohla poskytnout obraz biofilmu ve velkém rozlišení (Cleaver and Garnett, 2023).

Biofilm je dále možné zkoumat i pomocí mikroskopie atomárních sil, skenovací elektrochemické mikroskopie, konfokální mikroskopie s laserovým skenováním a dalších speciálních zobrazovacích technik (Cleaver and Garnett, 2023; Roy *et al.*, 2018).

3. Flavonoidy

Flavonoidy byly poprvé izolovány z pomerančů již v roce 1930. V té době však byly považovány za nově objevený vitamín P. Až později byla objasněna jejich reálná struktura a funkce (Kumar and Pandey, 2013).

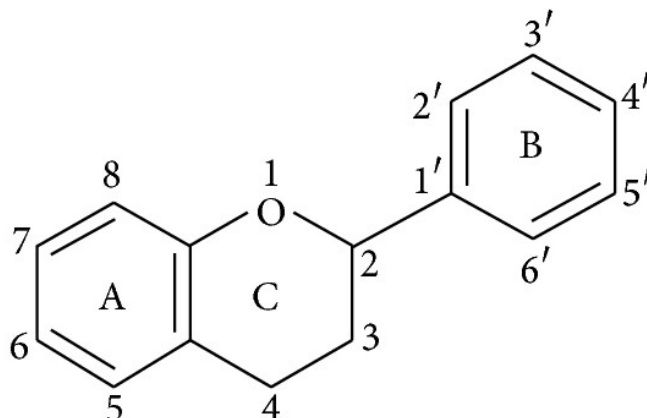
Jedná se o chemické látky, nacházející se hojně zastoupené v přírodě, hlavně jako součást nejrůznějších rostlin. Flavonoidy jsou dokonce v přírodě nejrozšířenějšími fenolickými látkami (Kumar and Pandey, 2013). Nacházíme je jak v listech, plodech, květech a semenech rostlin, tak také v jejich stvolech a kořenech. Nejvyšší obsah těchto látek mají ovocné stromy a také různá zelenina. Tyto látky nacházíme např. v cibuli, citrusových plodech či v různých bobulích. Nachází se však i v čajových lístcích, ovocných džusech či jiných nápojích (Sitarek *et al.*, 2024). Flavonoidy se v rostlinách nacházejí převážně v jádře mezofilových buněk (Kumar and Pandey, 2013). Flavonoidy zastávají v rostlinách hned několik funkcí. Slouží např. jako ochrana před UV zářením, ale také před různými patogeny. Často způsobují také výrazné zbarvení rostlin, čímž pomáhají nalákat opylovače (Sitarek *et al.*, 2024). Syntéza rostlinami je běžná i jako reakce na mikrobiální infekci.

Zájem o tyto sloučeniny vzrůstá, jelikož mají potenciální zdraví prospěšné účinky, zvláště se jedná o účinky antioxidační. Funkční hydroxylové skupiny těchto látek korigují koncentraci volných radikálů jejich vychytáváním a také chelatací iontů kovů, což je důležité pro zmírnění oxidačního stresu (Kumar and Pandey, 2013). Flavonoidy mají také schopnost indukovat lidské ochranné enzymatické systémy a mohou sloužit k ochraně před infekčními a degenerativními onemocněními, např. před vznikem karcinomu nebo před kardiovaskulárním onemocněním (Kumar and Pandey, 2013).

3.1. Chemická struktura flavonoidů

Flavonoidy patří do skupiny hydroxylovaných fenolických sloučenin. Základní strukturou těchto sloučenin je tzv. flavanové jádro – řetězec obsahující 15 atomů uhlíku, který se skládá ze dvou benzenových jader (A a B) spojených heterocyklickým pyranem (C) v případě flavonolů a flavononů, nebo jeho dihydroderivátem u flavanolů a flavanonů. Tato základní struktura (viz obrázek 11) může být modifikována a substituována, nejčastěji glykosidickou

nebo methylovou skupinou. V současné době je známo přes 3000 těchto sloučenin (Kumar and Pandey, 2013).



Obrázek 11: Flavanové jádro (Kumar and Pandey, 2013)

Tyto látky můžeme podle jejich struktury dále dělit na další skupiny dle různých kritérií. Sitarek *et al.* (2024) je dělí např. podle 2 základních kritérií. První kritérium je dle míry oxidace heterocyklu základního řetězce (C), a to do šesti skupin (flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, anthokyanidiny a isoflavony). Další dělení může být na základě rozdílné pozice připojení benzenového jádra (B) k heterocyklu (C). Dělí se tak na flavonoidy, které mají benzenové jádro připojené na C2 uhlík heterocyklu, dále pak na isoflavonoidy s vazbou na C3 uhlík, a nakonec neoflavonoidy s vazbou na C4 uhlík. Sloučeniny daných skupin se liší různou substitucí obou benzenových jader (Kumar and Pandey, 2013).

4. Prokyanidiny

Prokyanidiny jsou organické bioaktivní látky, které mají významné antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a protialergické vlastnosti. Snižují obsah lipidů v těle a také riziko vzniku neoplázií (Chen *et al.*, 2022). Výzkumy prokázaly slibné účinky prokyanidinů v prevenci a léčbě Alzheimerovy choroby (Zhao *et al.*, 2019), diabetu, revmatoidní artritidy, rakoviny, kardiovaskulárních chorob nebo např. obesity (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Mají značný potenciál i v léčbě řady dalších onemocnění. Pro jejich využívání v klinické praxi je však potřeba provést další výzkumy zaměřené např. na účinné metody extrakce prokyanidinů z přírodních matric nebo na správnou lékovou formu potenciálních léčiv s obsahem prokyanidinů (Chen *et al.*, 2022).

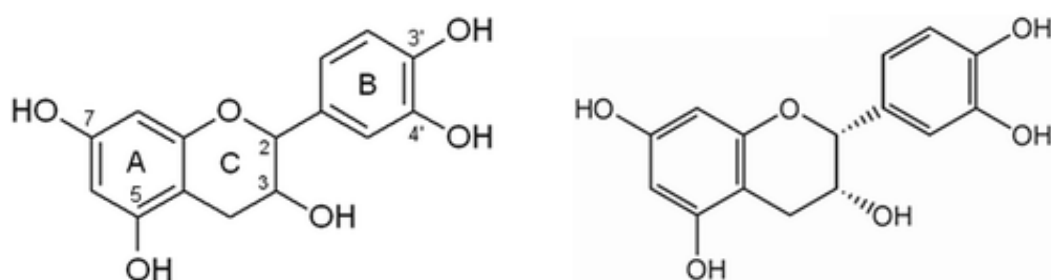
4.1. Chemická struktura prokyanidinů

Prokyanidiny patří do rozsáhlé skupiny polyfenolů (neboli fenolických látek). Tyto látky obsahují jeden či více fenolových nebo hydroxyfenolových kruhů ve své struktuře. Dále můžeme polyfenoly dělit podle několika různých faktorů (podle molekulové hmotnosti, přítomnosti hydroxylových skupin a aromatických cyklů, podle počtu uhlíkových atomů a typu vazeb). Fenolické látky dělíme na fenolové kyseliny, lignany, stilbeny a také flavonoidy, o kterých pojednávala předchozí kapitola.

Jako speciální podtyp polyfenolů jsou označovány třísloviny (taniny) (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Třísloviny jsou heterogenní skupinou látek s vysokou molekulovou hmotností (500–3000 Da). Jsou to látky ve vodě rozpustné s obsahující až 20 hydroxylových skupin (Smeriglio *et al.*, 2017). Třísloviny můžeme dělit na dvě základní podskupiny, a to na hydrolyzované a kondenzované třísloviny. **Hydrolyzované třísloviny** obsahují hydroxylovou skupinu esterifikovanou kyselinou gallovou nebo kyselinou elagovou a také molekulu glukózy. Dle názvu vyplývá, že tyto látky lze hydrolyzovat slabými kyselinami (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). **Kondenzované třísloviny** (proanthokyanidiny) se obvykle nacházejí jako oligomery katechinu (flavan-3-olu) nebo flavan-3,4-diolu. Obecně jsou tyto látky charakterizovány přítomností aromatického cyklu s hydroxylovou skupinou. Právě tato skupina umožňuje proanthokyanidinům interakce s uhlovodíky či proteiny pomocí vodíkových můstků. Díky této vlastnosti tvoří kondenzované třísloviny často velmi komplexní látky s různorodou strukturou i funkcí. Proanthokyanidiny není možné jednoduše hydrolyzovat, avšak dochází k jejich rozkladu v kyselém alkoholovém prostředí na červené pigmenty

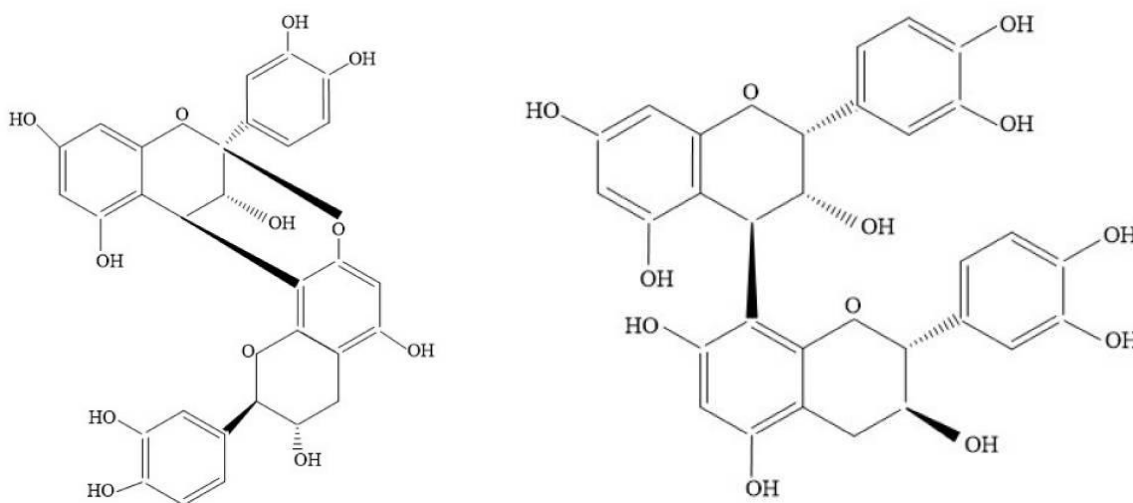
flobafeny (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Proanthokyanidiny můžeme najít v ovoci, listech a semenech různých rostlin, kde tyto látky slouží primárně jako ochrana před predátory. Tyto látky způsobují také typickou chuť některých nápojů, např. vína, džusu nebo čaje (Dixon *et al.*, 2005). Jednou skupinou látek odvozených právě od proanthokyanidinů jsou prokyanidiny.

Prokyanidiny jsou skupinou heterogenních sloučenin s různorodou chemickou strukturou. Jejich základ tvoří monomer flavan-3-olu, konkrétně (+)-katechinu nebo (-)-epikatechinu. (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Chemická struktura těchto monomerů je zobrazena na obrázku 12.



Obrázek 12: Chemická struktura katechinu (vlevo) a epikatechinu (vpravo) (upraveno dle Grases *et al.*, 2015)

Tyto sloučeniny lze dále klasifikovat podle jejich chemické struktury, míry hydroxylace a stereochemického uspořádání. Podle stupně polymerace (DP) je můžeme dělit na tři skupiny, a to monomery (DP = 1), oligomery (2 < DP < 10) a polymery (DP > 10) (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).



Obrázek 13: Chemická struktura prokyanidinu typu A s vazbou C4→C8 a C2→O→C7 (vlevo) a prokyanidinu typu B s vazbou C4→C8 (vpravo) (upraveno dle Valencia-Hernandez *et al.*, 2021)

Dimery prokyanidinů obsahují interflavonoidní vazby, nejčastěji mezi uhlíky C2 a C3, C4 a C8 nebo C4 a C6. Podle vlastností vazeb dělíme prokyanidiny na typ A a typ B (viz obrázek 13). Typ A obsahuje dvakrát vazbu mezi uhlíky (C4→C8/C6) a také etherovou vazbu (C2→O→C7 nebo C2→O→C5). Prokyanidiny typu A mohou vznikat z molekul dimerů typu B, a to oxidační reakcí. B prokyanidiny obsahují interflavanové vazby, které jsou kovalentně spojené s uhlíky C4→C8 nebo C4→C6 (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

4.2. Výskyt prokyanidinů

Prokyanidiny můžeme nacházet ve velkém množství přírodních matric. V jednotlivých rostlinách se vyskytují určité typy prokyanidinů a liší se též z hlediska koncentrace. Výskyt nejčastějších prokyanidinů shrnují následující odstavce.

Prokyanidiny A jsou v přírodě spíše méně běžné, nachází se např. ve skořici či v arašidech (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Dále je můžeme nalézt ve švestkách, avokádech, brusinkách a také v kari koření (Yang *et al.*, 2021). Výskyt některých prokyanidinů typu A byl prokázán také v listech a dřevě vavřínu vznešeného (Alejo-Armijo *et al.*, 2018) a v semenech ovoce liči čínského (Xu *et al.*, 2010).

Prokyanidiny B jsou v přírodě běžnější. Byl popsán jejich výskyt např. v čokoládě, kakau, hroznovém vínu, jablkách (Prior *et al.*, 2001), dále také borůvkách a čiroku (Yang *et al.*, 2021). V rostlinách se liší také poměr jednotlivých podskupin prokyanidinů typu B. Např. prokyanidin B1 je hojně zastoupený v kůře borovice či skořicovníku a můžeme jej také nacházet ve slupkách jablka, a to společně s prokyanidinem B2 (Lončarić *et al.*, 2020; Shimada *et al.*, 2012). Prokyanidin B2 (PB2) se nejvíce nachází v semenech, plodech, květech a listech rostlin z čeledi růžovité (*Rosaceae*), např. v hlohu, jabloni, hrušni, broskvoni a kdoulovci. Mezi další čeledi s vysokým obsahem PB2 patří čeleď bobovitých (*Fabaceae*), vřesovcovitých (*Ericaceae*), révovitých (*Vitaceae*), řešetlákovitých (*Rhamnaceae*), mýdelníkovitých (*Sapindaceae*), láhevnickovitých (*Annonaceae*) a klusiovitých (*Clusiaceae*). PB2 tedy můžeme nalézt v semenné slupce (osemení) černé sóji, v kustovnici cizí, v cicimku čínském, v listech brusnice prutovité, v semenech lotosu ořechonosného a vinné révy (Chen *et al.*, 2023). Koncentrace PB2 se v těchto rostlinách liší. Např. v plodech hlohu najdeme až 243 mg/100 g vysušené rostliny (Zhang *et al.*, 2020), ve slupce jablka 95,4±34,3 mg/100 g vysušené rostliny (Lončarić *et al.*, 2020) a ve vodném extraktu z kustovnice cizí 37,2 mg/100 g extraktu (Plucińska *et al.*, 2022).

Prokyanidiny v jednotlivých rostlinách se liší také stupněm jejich polymerace (DP). Např. v kešu ořechách a černých fazolích najdeme výhradně monomery a dimery. Ve většině rostlin však nalezneme prokyanidiny s vyšším DP (Gu *et al.*, 2004). Rozdíl ve stupni polymerace můžeme pozorovat také v případě jejich výskytu v různých částech rostliny. Např. semena hroznového vína obsahují větší množství monomerů a oligomerů oproti slupkám, ve kterých převažují polymery s vyšším DP (Yang *et al.*, 2021).

4.3. Metody extrakce prokyanidinů

Pro extrakci prokyanidinů z přírodních zdrojů lze využít různé metody jejichž optimalizace je předmětem mnoha studií. Mezi faktory důležité pro volbu extrakční metody patří např. biologická stabilita extrahovaných látek, selektivita extrakce, vliv na životní prostředí, ale i ekonomická náročnost. U jednotlivých metod je poté potřeba zvolit správné podmínky (rozpouštědlo, teplota, pH rozpouštědla, poměr rozpouštědla k množství vzorku, atd.) (Abubakar and Haque, 2020, Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících efektivitu extrakce je výběr vhodného rozpouštědla. Využívaná rozpouštědla můžeme rozdělit na polární (např. voda a alkoholy), středně polární (např. aceton a dichlormethan) a nepolární (např. n-hexan, ether nebo chloroform) (Abubakar and Haque, 2020). Zvolení nesprávné metody může ovlivnit strukturu extrahované látky, např. změnit rozložení hydroxylových skupin, interflavanových vazeb, případně ovlivnit schopnost látek reagovat s dalšími sloučeninami (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

Mezi klasické metody extrakce fenolických látek patří např. macerace, perkolace, digesce a Soxhletova extrakce. Předmětem výzkumů jsou však i alternativní metody extrakce, které by měly zajistit vyšší výtěžky, efektivitu a také snížení spotřeby rozpouštědel. Mezi alternativní metody extrakce prokyanidinů patří ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE), mikrovlnná extrakce (MAE), superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce za zvýšeného tlaku (PLE) a extrakce subkritickou vodou (SWE) (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

4.3.1. Jednoduché extrakční techniky

Základní technikou, využívanou k extrakci prokyanidinů, je macerace. Před začátkem macerace je nutné přírodní materiál (např. listy nebo kůru) namlít na hrubý prášek. Tento prášek je následně přelit zvoleným rozpouštědlem, nádoba je uzavřena a ponechána alespoň tři dny. Během tohoto času je obsah nádoby pravidelně promícháván. Poté je do rozpouštědla extrahovaná látka oddělena od zbytků přírodního materiálu, a to filtrací nebo dekantací.

Na konec je získána požadovaná látka odpařením rozpouštědla pomocí vodní lázně či laboratorní trouby. Tato metoda je vhodná pro extrakci termolabilních látek. Nevýhodou je však dlouhá doba extrakce (Abubakar and Haque, 2020).

Digesce je extrakční metoda, která probíhá za přiměřeně zvýšené teploty. Zvolené rozpouštědlo je nalito do nádoby, do které je následně přidán nadrcený vzorek. Poté je tato směs zahřívána na teplotu 50 °C. Zvýšení teploty způsobí snížení viskozity extrakčního rozpouštědla a napomůže tak extrakci požadované látky. Digesce je nejvhodnější pro látky, které jsou dobře rozpustné v použitém rozpouštědle (Abubakar and Haque, 2020).

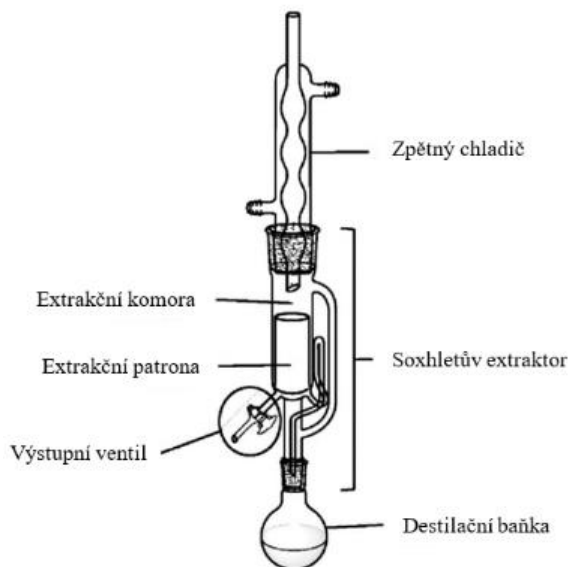
Perkolace je extrakční metoda využívající louhování pevné látky cirkulujícím rozpouštědlem pomocí zařízení nazývaného perkolátor. Jedná se skleněnou nádobu kuželovitého tvaru s otvory na horním i spodním konci. Rostlinný materiál je nejprve usušen a namlet na velmi jemný prášek. Získaný prášek je smíchán se zvoleným rozpouštědlem a tato směs je ponechána 4 hod. Poté je směs přemístěna do perkolátoru, který má uzavřenou spodní výust'. V perkolátoru je směs ponechána alespoň 24 hod. Poté je do perkolátoru naléváno rozpouštědlo vrchním otvorem tak, aby jím byl materiál stále plně saturován a je otevřena spodní část perkolátoru. Kapalná složka směsi má tak možnost pomalu odkapávat díky gravitační síle. Po ukončení perkolace je extrakt oddělen od pevných rostlinných zbytků filtrací s následnou dekantací (Abubakar and Haque, 2020).

4.3.2. Soxhletova extrakce

Jedná se o kontinuální extrakci za horka, při které je využíván Soxhletův extraktor. Toto skleněné zařízení se skládá z baňky s kulatým dnem (destilační baňka), extrakční komory, přepadové trubice a zpětného chladiče neboli kondensoru (viz obrázek 14).

Rostlinný vzorek je nejprve usušen a rozemlet na jemný prášek. Poté je umístěn do extrakční patrony vytvořené z čisté tkaniny nebo z tvrzeného filtračního papíru. Zvolené rozpouštědlo je poté nalito do spodní baňky a zahřáto na vysokou teplotu. Rozpouštědlo se začne odpařovat a proudí vzhůru. Rozpouštědlo kondenzuje při průchodu kondenzorem a ztéká přes extrakční komoru, kde dochází k extrakci požadované látky. Pokud hladina rozpouštědla v komoře dosáhne úrovně přepadu, rozpouštědlo společně s extrahovaným materiálem proudí zpět do baňky. Celý proces probíhá kontinuálně až do chvíle, kdy je extrahována veškerá látka ze vzorku.

Tato metoda je vhodná zejména pro látky, které jsou částečně rozpustné v daném rozpouštědle, nebo též pro látky obsahující nerozpustné nečistoty. Výhodou je, že lze tímto způsobem extrahovat poměrně velké množství látky s využitím malého objemu rozpouštědla. Metodu však nelze použít pro termolabilní látky (Abubakar and Haque, 2020).



Obrázek 14: Nákres Soxhletova extraktoru (upraveno dle Muhamad et al., 2017)

4.3.3. Ultrazvukem asistovaná extrakce

Extrakce s využitím ultrazvuku (UAE) je jednou z rychle rozvíjejících se technologií, a to hlavně díky omezenému dopadu na životní prostředí, krátkému trvání extrakce a s tím spojené značné výtěžnosti dané látky.

Extrakce probíhá pomocí mechanických vibrací, při kterých dochází k průchodu vln kapalným prostředím, a to za vzniku bublin. Tyto bubliny následně rychle praskají díky účinku fenoménu tzv. akustické kavitace. Důsledkem tohoto procesu je zvýšení tlaku a teploty a vznik tzv. ultrazvukových mikrotrysek, které napomáhají následné extrakci.

Jednou z modifikací této metody je technika vysokointenzivního ultrazvuku, při které je využíváno vlnění o vysoké intenzitě a nízké frekvenci. Jedná se o metodu relativně levnou, jednoduchou, příznivou k životnímu prostředí a také rychlou (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Rychlost extrakce dokládá i výzkum, ve kterém byly extrahovány prokyanidiny typu A i B z anony horské za méně než pět minut (Arruda *et al.*, 2019).

UAE může být kombinována také s dalšími technikami s cílem zvýšit výtěžek prokyanidinů nebo zlepšit jejich využitelnost pro farmaceutické účely. Některé modifikace mají za cíl

kontrolovat velikost molekul extrahovaných látek (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Jednou z modifikací je kombinace s kavitací za sníženého tlaku, která při testování prokázala vyšší výtěžnost i bioaktivitu extrahovaných prokyanidinů (Wang *et al.*, 2018a).

4.3.4. Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce (MAE) je primárně využívána pro získávání polyfenolů (např. kondenzovaných tříslovin a flavonoidů). Bylo však zkoumáno využití této metody i pro extrakci prokyanidinů. MAE využívá nejčastěji rozpouštědla o vysoké polaritě (např. vodu nebo methanol). Mechanismus extrakce je založen na přenosu tepla do rozpouštědla způsobujícího narušení buněčné stěny a nitrobuňčných organel. Vzniklé póry usnadňují rychlý přenos látek z buněk a umožňují tak poměrně rychlou a efektivní extrakci.

Výhodou MAE je poměrně nízká spotřeba rozpouštědla i výchozího rostlinného materiálu a možnost získání výsledného extraktu o vysoké kvalitě za přiměřený čas. Avšak výsledný výtěžek vždy záleží na koncentraci extrahované látky v matrici, chemické struktuře rozpouštědla a také na stavbě konkrétní buněčné stěny. Extrakční proces a podmínky (např. teplota, tlak, pH, koncentrace rozpouštědla) jsou proto vždy specifické pro určité rostlinné materiály. I tato metoda může být modifikována za účelem získání vyšší výtěžnosti. Jednou z modifikací je např. technika extrakce využívající mikrovlnně přehřátou vodu (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

4.3.5. Superkritická fluidní extrakce

Metoda superkritické fluidní extrakce (SFE) má potenciál k aplikaci ve farmaceutické výrobě, analýze potravin a také ve výrobě polymerů. Je také vhodná k separaci a čištění látek z rostlinných matric (např. flavonoidů a prokyanidinů) (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

Pokud se extrahovaná látka v substrátu (např. v listech, kůře nebo dřevě stromů) nachází uvnitř buněk či specifických organel, je možné ještě před extrakcí narušit tyto struktury nejčastěji mletím a sušením. Následný postup provedení SFE můžeme rozdělit do dvou základních kroků – extrakce rozpustných látek z pevného substrátu pomocí superkritického rozpouštědla a následné separace těchto látek z rozpouštědla. Nejprve tedy dojde k absorpci superkritického rozpouštědla substrátem, což způsobí dilataci membrán buněčných struktur. Poté se extrahované látky mohou rozpustit v rozpouštědle a jsou difuzí přemístěny na povrch substrátu. Nakonec jsou rozpuštěné látky rozpouštědlem přemístěny mimo extraktor (Pereira and Meireles, 2009).

Velkou výhodou SFE je, že po extrakci nezůstávají ve finálním produktu žádné toxické zbytky. Díky této vlastnosti lze touto metodou extrahovat cenné bioaktivní látky, případně také odstraňovat nežádoucí příměsi (např. polutanty, toxiny nebo pesticidy). Další výhodou je vysoká selektivita této metody, a to hlavně díky možnosti nastavení konkrétních hodnot působící teploty a tlaku. Je tak možné získat bioaktivní látky bez toho, aniž by byly poškozeny vysokou extrakční teplotou (Pereira and Meireles, 2009).

Při této metodě je možné využít i CO₂ jako specifického rozpouštědla. Tato metoda se poté nazývá jako extrakce superkritickým CO₂ (SC-CO₂). Oxid uhličitý je vhodným rozpouštědlem pro látky, které lze snadno rozkládat zvýšením teploty, jelikož jejich kritická teplota i tlak jsou nízké. Jedná se o rozpouštědlo relativně levné, netoxické, neexpozivní, s nízkou viskozitou, polaritou a reaktivitou. Je to tedy metoda bezpečná i pro využití v potravinářství. SC-CO₂ se primárně využívá pro extrakci nepolárních nebo slabě polárních látek (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Možnou modifikací této metody při extrakci polyfenolů je použití CO₂ smíchaného s ethanolem nebo vodou, což způsobí vyšší výtěžek extrahovaných látek. Nejvyšší účinnost pro proanthokyanidiny prokázala ve výzkumech postupná extrakce. Nejprve byla využita směs CO₂ s vodou a poté CO₂ s ethanolem (Porto *et al.*, 2014).

4.3.6. Extrakce za zvýšeného tlaku

Extrakce za zvýšeného tlaku (PLE), někdy také nazývána zrychlená extrakce rozpouštědlem, je jednou z metod získávání cenných látek z materiálů přírodního původu. Mezi výhody oproti klasickým extrakčním metodám patří nízká zátěž na životní prostředí, malá časová náročnost a nízká spotřeba rozpouštědla (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Při porovnání s klasickými metodami (Soxhletova extrakce, macerace) prokázala PLE vyšší výtěžek fenolických látek a také jejich vyšší antioxidační aktivitu. Zároveň bylo dokázáno, že extrakční čas stejného množství látky byl výrazně kratší než u klasických metod, což vypovídá o tom, že i přes vyšší pořizovací cenu se jedná o metodu ekonomicky výhodnější (Machado *et al.*, 2015).

Při PLE je aplikován tlak nejčastěji od 4 do 20 MPa za účelem udržení rozpouštědla v kapalném stavu i při teplotách vyšších, než je standardní teplota varu. Celý proces probíhá v uzavřeném inertním systému při vysokých teplotách, které usnadňují rozpouštění rostlinného materiálu v rozpouštědlu. Průběh rozpouštění také ovlivňuje viskozita a povrchové napětí rozpouštědla. Nejčastěji využívaným rozpouštědlem je voda, jelikož je levná, nehořlavá a netoxická. Pro polární látky a látky citlivé k vysokým teplotám je využívána voda a ethanol (Valencia-

Hernandez *et al.*, 2021). Ve výzkumech bylo jako rozpouštědlo využívána i okyselená voda, ta vykazovala zvýšení výtěžku celkových polyfenolů a antioxidační aktivity, ale při vyšších teplotách negativně ovlivňovala výtěžek proanthokaynidinů. Pravděpodobně docházelo k rozpadu nevazebných interakcí (Van der Waalsovy interakce, vodíkové vazby) a k hydrolýze na nerozpustné fenolické látky (Machado *et al.*, 2015).

4.3.6.1. Extrakce subkritickou vodou

Extrakce subkritickou vodou (SWE) je jedna z modifikací extrakce za zvýšeného tlaku. Při SWE je v extrakčním systému jako rozpouštědlo využívána pouze voda, a to za vysoké teploty i tlaku. V této metodě jsou vodou nahrazena organická rozpouštědla, která mají negativní vliv na životní prostředí i lidské zdraví. Výhodou také je, že tato metoda nevyžaduje separaci látek po extrakci a že je možné ji automatizovat (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

SWE vykazuje vysokou selektivitu za krátký extrakční čas. Provozní náklady jsou vyšší, než u klasických metod, zvláště kvůli poměrně vysoké spotřebě energie. Avšak SWE může být výhodnější pro extrakci celkových flavonoidů oproti některým klasickým metodám (UAE či MAE), a to kvůli možnosti získání velmi čistého produktu (Todd and Baroutian, 2017; Valencia-Hernandez *et al.*, 2021).

Subkritická voda využívána při SWE může mít různé vlastnosti v závislosti na reakčních podmínkách (především na teplotě). Lze tak nastavením správné teploty a tlaku ovlivnit dielektrickou konstantu, polaritu vody, solvatační kapacitu, viskozitu, povrchové napětí a difuzivitu vody a umožnit tak lepší rozpustnost extrahované látky, či zvýšit selektivitu extrakce (Valencia-Hernandez *et al.*, 2021). Při extrakci flavonoidů při zvýšené teplotě může dojít ke strukturní změnám extrahovaných látek a také ke změnám v antioxidační aktivitě. Vyšší teplota extrakce také zvyhodňuje získání polymerních prokyanidinů (hlavně trimerů a tetramerů) (García-Marino *et al.*, 2006).

4.4. Mechanismy účinku prokyanidinů

4.4.1. Antioxidační účinek prokyanidinů

Antioxidační účinek působí obecně proti vzniku oxidačního stresu, což je narušení rovnováhy mezi produkcí a eliminací reaktivních forem kyslíku (ROS), a to nejčastěji ve formě volných kyslíkových radikálů. Nadbytečné množství volných radikálů je pro buňky toxické a může způsobovat poškození všech buněčných komponent (Snijders *et al.*, 2021).

Hlavními mechanismy antioxidačního účinku prokyanidinů je vychytávání volných radikálů (např. O_2^- a NO^\cdot), inhibice aktivity enzymů podporujících zánětlivé reakce (např. lipooxygenasy) (Jiménez-Aspee *et al.*, 2017) a také inhibice enzymů ovlivňujících peroxidaci lipidů (Chen *et al.*, 2022). Antioxidační účinky prokyanidinů byly potvrzeny také mnoha výzkumy. Např. prokyanidiny nacházející se v semenech hroznového vína vykazovaly 20–50× vyšší antioxidační účinky než v případě vitamínů C a E (Uchida *et al.*, 1988).

4.4.2. Protizánětlivý efekt prokyanidinů

Záněť je obranná reakce organismu na přítomnost infekce nebo poškození tkání. Tato reakce může mít spoustu příčin, např. působení chemických látek, přítomnost infekčních agens nebo poranění. Prokyanidiny působí proti zánětu regulací činnosti vápníkových kanálků v buňkách a mitochondriálního membránového potenciálu. Dále také regulují hned několik signálních drah (např. dráhu mitogenem aktivované proteinkinasy, transkripčního faktoru Nrf2 nebo nukleárního faktoru κB (NF- κB)) (Chen *et al.*, 2022). Mají díky tomu schopnost snižovat produkci zánětlivých cytokinů a inhibovat produkci enzymů zánětlivé reakce (Yang *et al.*, 2014). Např. prokyanidiny A2 inhibují uvolňování interleukinu-6, tumor nekrotizujícího faktoru- α , prostaglandinu E2 a oxidu dusnatého právě pomocí regulace NF- κB signální cesty. Kombinace všech těchto účinnů vede ke snižování zánětlivých reakcí v organismu (Wang *et al.*, 2020a).

4.4.3. Antineoplastická aktivita prokyanidinů

Antineoplastická aktivita pomáhá chránit organismus před abnormální a nekontrolovanou proliferací některých buněk, a tedy před vznikem tumorů. Několik výzkumů prokázalo antineoplastické vlastnosti prokyanidinů a na základě toho byl zkoumán jejich možný pozitivní účinek při prevenci a léčbě rakoviny plic, kolorektálního karcinomu a rakoviny prsu (Chen *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2016).

Antineoplastická aktivita je ovlivněna různými mechanismy. Nejčastěji jde o inhibici látek produkovaných proliferujícími buňkami a sloužících k urychlení dalšího dělení (Chen *et al.*, 2022). Např. některé prokyanidiny mají schopnost degradovat aktivovaný transkripční faktor Nrf2, který je jednou z látek podporujících proliferaci rakovinných buněk a způsobujících odolnost karcinomu k chemoterapeutické léčbě. Množství Nrf2 a podobně působících látek tedy výrazně koreluje s délkou přežití pacientů. Degradace tohoto transkripčního faktoru

probíhá aktivováním cysteinových proteáz v jádře buněk pomocí fosforylovaného receptoru určeného pro růstový faktor podobný inzulínu (Ohnuma *et al.*, 2017).

5. Biologické účinky prokyanidinů

5.1. Antimikrobiální účinky prokyanidinů

Antimikrobiálním účinkům prokyanidinů se věnovalo a stále věnuje značné množství výzkumných týmů. Ve většině studií jsou však testovány rostlinné extrakty obsahující velké množství různých prokyanidinů i dalších fenolických látek a nezaobírají se přesnou charakterizací jejich struktury a mechanismu účinku. Proto zatím existuje málo informací spojujících jednotlivé prokyanidiny s konkrétním antimikrobiálním účinkem. Je tedy poměrně obtížné porovnávat výsledky jednotlivých výzkumů, jelikož i drobná změna ve struktuře či použití rozdílné metody stanovení má velký vliv na zjištěný antimikrobiální účinek.

Výzkumy však prokázaly, že přítomnost prokyanidinů v testovaných rostlinných extraktech koreluje s antimikrobiálním účinkem proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím v *in vitro* prostředí. Data získaná z více výzkumů také ukazují, že hodnota MIC prokyanidinů se pro obě skupiny bakterií nachází v podobném rozsahu. Nejnižší hodnoty MIC (<100 µg/ml) proti Gram-pozitivním bakteriím byly popsány v případě purifikovaných či semipurifikovaných sloučenin (dimery a trimery) izolovaných z různých rostlinných zdrojů. Vyšší MIC (>600 µg/ml) byla naopak pozorována spíše u hrubých extraktů. Nejnižší MIC (<100 µg/ml) byla u Gram-negativních bakterií stanovena pro monomery (+)-katechinu a také (-)-epikatechinu, ale i u směsi monomerů a oligomerních prokyanidinů. Výjimkou byl hrubý extrakt ze slupek arašídů, který rovněž prokázal velmi nízké hodnoty MIC (Levy *et al.*, 2017). Vyšší hodnoty MIC (625–5000 µg/ml) byly stanoveny pro hrubé extrakty, heterogenní směsi fenolických látek a také pro extrakty dimerů a trimerů prokyanidinů. Naměřené hodnoty MIC pro různé extrakty se však mohou mírně lišit v závislosti na odolnosti použitého bakteriálního kmene (Mattos *et al.*, 2024). Rozdílné antimikrobiální účinky může mít extrakt také pro bakterie lišící se jejich vztahem ke kyslíku. Např. při testování antimikrobiálního účinku extraktu ze semen hroznového vína bylo prokázáno, že v tomto extraktu nacházející se prokyanidiny inhibovaly růst anaerobních bakterií (běžný výskyt např. ve střevním mikrobiomu. Naopak některé fakultativně anaerobní bakterie (např. bakterie mléčného kvašení) byly k tomuto extraktu rezistentní. Důvodem je, že obligátně anaerobní bakterie využívají anaerobní metabolické procesu závislé na železu, což je činí citlivějšími k účinku prokyanidinů (Ares *et al.*, 2023).

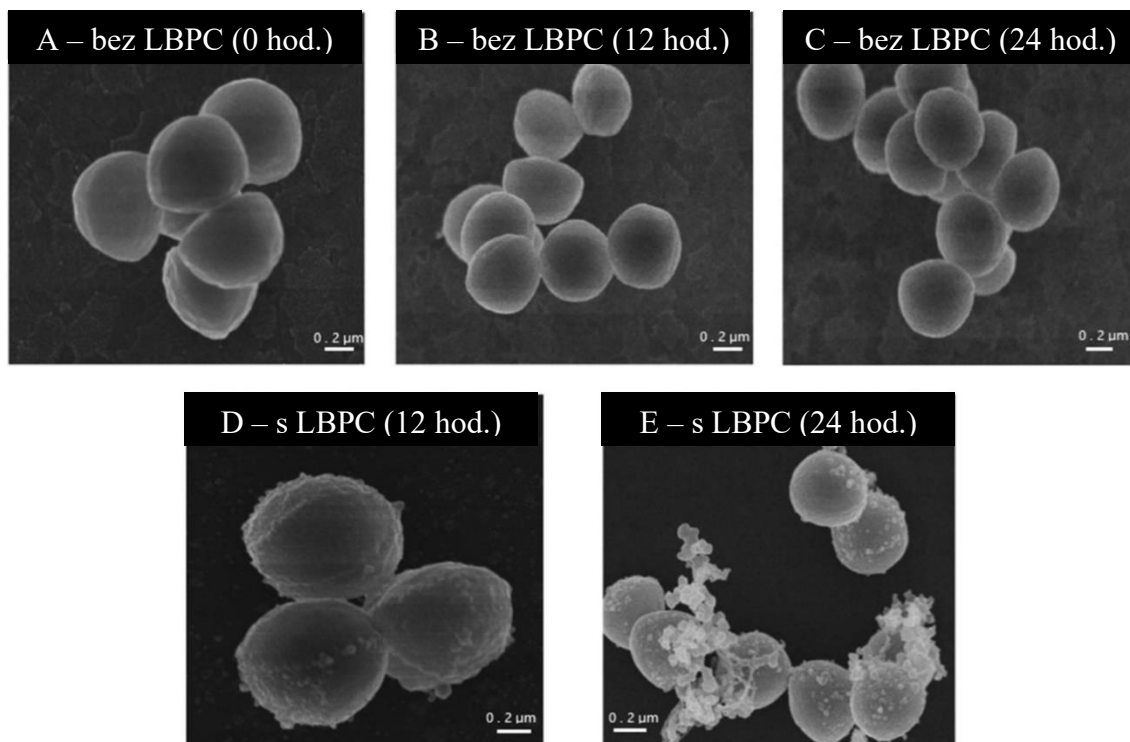
V několika výzkumech byly navrženy potenciální mechanismy antimikrobiálního účinku prokyanidinů. Jedním z nich je narušení integrity buněčné membrány či bakteriální stěny (Chen *et al.*, 2022) a s tím související změna prostupnosti membrány a také změna morfologie buňky. Dále bylo prokázáno, že fenolické látky dokážou vytvářet vodíkové vazby s některými intracelulárními enzymy bakterií a tím narušovat funkci enzymů nezbytných pro přežití bakterie. Mohou také zasahovat do schopnosti proteosyntézy mikroorganismů, tím narušit fyziologické funkce a vést k buněčné smrti. Prokyanidiny způsobují také změny pH uvnitř buněk (Mattos *et al.*, 2024) a poškození substrátů potřebných k růstu a rozmnožování bakterií (Chen *et al.*, 2022).

5.1.1. Antimikrobiální účinky způsobené narušením buněčné membrány

Jedním z antimikrobiálních účinků prokyanidinů je narušení integrity buněčné membrány mikroorganismů a ovlivnění její propustnosti. Jedním z předpokládaných účinků narušení membrány prokyanidinů je jejich schopnost přímé interakce s lipidovou dvojvrstvou, což způsobuje snížení fluidity a zapříčiňuje její kontrakci. Nevyhnutelným důsledkem je vznik pórů v membráně, vylévání cytoplasmy, a to včetně draselných iontů. Zvýšení extracelulární koncentrace K^+ vede k osmotické nerovnováze, k nevratnému poškození, a nakonec i k buněčné smrti (Mattos *et al.*, 2024).

Narušení membrány bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bylo pozorováno např. po působení extraktu prokyanidinů z kůry modřínu dahurského (*Larix gmelinii*). Po narušení membrány a buněčné stěny bakterie došlo k vylití proteinů a iontů do extracelulárního prostoru. Také byl z buňky uvolněn enzym alkalická fosfatasa, což přispělo ke zvýšené koncentraci vápenatých iontů uvnitř buňky. Velká koncentrace těchto iontů vedla ke zvýšenému vzniku volných radikálů a tím pádem i k poškození buněčného metabolismu (Li *et al.*, 2017).

Na obrázku 15 je možné pozorovat účinky prokyanidinů z kůry modřínu (LBPC) na membránu této bakterie v porovnání s kontrolním vzorkem bez přidání LBPC (A–C). LBPC způsobily po 12 hod. výrazné rozrušení membrány a bylo možné pozorovat nepravidelné povrchové struktury (D). Po 24 hod. působení byly buňky *S. aureus* obklopeny exsudátem, pravděpodobně se jednalo o cytoplasmu vylitou z buněk (E) (Li *et al.*, 2017). Podobný mechanismus účinku jako u LBPC byl pozorován i u oligomerních prokyanidinů extrahovaných ze semen lotosu indického (*Nelumbo nucifera*) testovaných proti enterotoxigennímu kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Wang *et al.*, 2018a).



Obrázek 15: Obraz buněk *Staphylococcus aureus* pořízený elektronovým mikroskopem bez/s prokyanidinů z kůry modřínu (LBPC) (upraveno dle Li et al., 2017)

Narušení buněčné membrány *Staphylococcus aureus* prokyanidiny bylo pozorováno také při působení extraktu z ovoce tomelu japonského (*Diospyros kaki*), obchodně nazývaného jako kaki. Toto ovoce však obsahuje převážně polymerní prokyanidiny s vysokým DP, což se v předešlých výzkumech ukázalo jako méně využitelné v potravinářství. Bylo proto nutné provést depolymerizaci za účelem získání oligomerních prokyanidinů. Takto připravený extrakt prokázal schopnost narušit buněčnou membránu *S. aureus* díky interakci s hydrofobní částí membrány a s tím souvisejícím snížením její fluidity. Bylo prokázáno, že tyto oligomerní prokyanidiny mají schopnost prostoupit do vnitřní vrstvy buněčné membrány a vytvořit s ní velké množství vodíkových můstků, což vede k narušení uspořádání hydrofobních částí lipidů membrány (Wang *et al.*, 2020b).

Další výzkumy uvádějí, že se na antibakteriálních účincích prokyanidinů podílí také jejich chelatační účinek na ionty kovů, který je podobný jako u kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA). Prokyanidiny jsou schopné vázat Ca^{2+} a Mg^{2+} na membráně, což může vést k její destabilizaci, uvolnění lipopolysacharidů a rovněž ke zvýšení propustnosti membrán (Lacombe *et al.*, 2010).

5.1.2. Další mechanismy antimikrobiálních účinků

Dalším možným mechanismem účinku prokyanidinů je narušení energetického metabolismu bakterií. Při působení extraktu z kůry modřínu na *S. aureus* byla pozorována snížená aktivita několika enzymů, např. sukcinátdehydrogenasy, malátdehydrogenasy, a také ATPasy. Tyto enzymy jsou nezbytné pro metabolismus buňky, a proto jejich snížená aktivita způsobila snížení rychlosti buněčného metabolismu vedoucího k útlumu dalšího růstu buněk. Prokyanidiny mohou mít vliv také na genovou expresi a díky tomu ovlivňovat množství a strukturu vznikajících proteinů. Také mohou v bakteriální buňce vznikat komplexy prokyanidinů s genomovou DNA, což rovněž vede ke smrti buňky (Mattos *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2017).

Některé výzkumy však také prokazují, že výše popsané mechanismy účinku prokyanidinů se u některých sloučenin vzájemně kombinují. Např. při působení prokyanidinů extrahovaných z hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida*) na *Staphylococcus aureus* došlo k nevratnému poškození buněčné stěny, vylití iontů a také ovlivnění buněčného metabolismu zvýšením produkce ROS. Na to navázalo nejdříve mírné zvýšení, ale po delší době snížení aktivity enzymů superoxidodismutasy a katalasy. V neposlední řadě také došlo ke snížení exprese genů účastnících se syntézy buněčné stěny (Zhang *et al.*, 2020). Kombinace více antimikrobiálních účinků byla prokázána také u extraktu z ovoce tomelu japonského (*Diospyros kaki*). Tento extrakt způsobil nejen výše zmíněné narušení buněčné membrány *Staphylococcus aureus*, ale také zapříčinil snížení aktivity důležitých enzymů energetického metabolismu této bakterie, což vedlo k celkovému zpomalení metabolismu a inhibici růstu (Wang *et al.*, 2020b).

5.1.3. Synergický efekt prokyanidinů a dalších látek

V některých studiích byl pozorován synergický účinek při současném působení různých typů prokyanidinů. Např. prokyanidin typu A a prokyanidin B2 (oba izolované ze dřeva vavřínu vznešeného, *Laurus nobilis*) prokázaly synergický efekt proti *Listeria monocytogenes*. Synergický efekt výrazně zvýšil antimikrobiální účinek těchto látek oproti jejich samostatnému použití (Alejo-Armijo *et al.*, 2017).

Několik studií také dokumentovalo možnost synergického působení prokyanidinů a některých antibiotik, antimykotik a dalších antimikrobiálních látek, a to díky jejich schopnosti narušit vnitřní mechanismy rezistence. Některé prokyanidiny zvyšovaly účinek betalaktamových antibiotik proti bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Escherichia coli*), které jsou schopné tvořit širokospektré betalaktamasy a metalobetalaktamasy (Mattos *et al.*, 2024).

Dimery prokyanidinů B3 a B4 izolované z ovoce cicimku čínského (*Ziziphus jujuba*) také zvyšovaly účinek penicilinu a oxacilinu proti 4 kmenům (OM481, OM505, OM584, a OM623) methicilin-resistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Hatano *et al.*, 2005). Prokyanidiny typu B izolované z vláknité vrstvy ořechu kokosovníku ořechoplodného (*Cocos nucifera*) prokázaly synergický efekt s methicilinem proti MRSA kmenu BMB9393 izolovaného z klinického vzorku (Silva *et al.*, 2013). Extrakty z klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*) prokázaly schopnost narušit specifické mechanismy některých bakterií způsobujících rezistenci k antibiotikům. Konkrétně zabraňovaly změnám struktury membrány vedoucím k obtížnějšímu prostupování antibiotik do buňky. Dále bylo popsáno znemožnění činnosti efluxních pump, kterými by mohly bakterie aktivně vylučovat antibiotikum z buňky. Tato schopnost byla testována na Gram-negativních bakteriích *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis*, a to v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Jako modelové organismy pro *in vivo* testování byly použity octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) a zavíječ voskový (*Galleria mellonella*). Byla pozorována výrazně nižší hodnota MIC směsi sulfamethoxazolu s extraktem z klikvy velkoplodé o koncentraci 50 µg/ml oproti hodnotě MIC samotného sulfamethoxazolu (Maisuria *et al.*, 2019). Prokyanidiny typu A izolované ze skořicovníku pravého (*Cinnamomum zeylanicum*) prokázaly synergické účinky s nitrofurantoinem proti směsi několika uropatogenních kmenů *E. coli* izolovaných z klinických vzorků. Jednalo se o kmeny rezistentní k několika antibiotikům. Mechanismem účinku extraktu byla popsána down regulace adhezínů této bakterie, které jsou důležité v průběhu celé patogeneze (Vasudevan *et al.*, 2020).

Některé prokyanidiny mají také schopnost zvyšovat účinek antimykotik. Např. oligomerní prokyanidiny typu B mají synergický účinek s flukonazolem proti kvasinkám rodu *Candida* (*C.*). Flukonazol byl po přidání extraktu z rostliny *Commiphora leptophloeos* obsahujícího prokyanidiny typu B až 8× účinnější proti *C. albicans* a až 16× účinnější proti *C. tropicalis* než samotné antimykotikum (Dantas-Medeiros *et al.*, 2021). Synergický efekt s dvěma antimykotiky, s bifonazolem a ketokonazolem, prokázal také extrakt izolovaný z dubu cesmínovitého (*Quercus ilex*) obsahující prokyanidin B3 (Karioti *et al.*, 2011).

5.2. Antibiofilmové účinky prokyanidinů

Antibiofilmové účinky prokyanidinů jsou obecně méně prozkoumané než jejich účinky na planktonní buňky. Avšak v současnosti přibývá počet výzkumů zabývajících se i dopady

na tvorbu mikrobiálního biofilmu, jelikož právě schopnost tvořit biofilm je velkým problémem zejména v potravinářství a veterinární i humánní medicíně.

Mezi nejpravděpodobnější mechanismy antibiofilmového účinku prokyanidinů patří narušení mezibuněčné komunikace nazývané *quorum sensing* (QS), snížení pohyblivosti mikroorganismů, zabránění jejich adheze nebo změna složení EPS. Řada výzkumů však pouze prokazuje antibiofilmové účinky prokyanidinů a nepopisuje jejich přesný mechanismus účinku, proto je pro pochopení potřeba provést další výzkumy (Mattos *et al.*, 2024).

Nejvíce prozkoumanou skupinou látek s antibiofilmovými účinky jsou prokyanidiny typu A s nízkým stupněm polymerace. Výzkumy prokázaly antibiofilmové účinky u oligomerů prokyanidinů typu A o DP 3–7 proti *Streptococcus mutans*, *Streptococcus epidermidis* a MRSA (Mattos *et al.*, 2024). Dále také extrakty z brusnice brusinky (*Vaccinium vitis-idaea*) (obsahující dimery a polymery prokyanidinů typu A, dimery typu B a další blíže neurčené prokyanidiny) prokázaly antibiofilmové účinky proti *Streptococcus mutans* (Riihinen *et al.*, 2014). U prokyanidinů nacházejících se v brusinkách byl popsán silný účinek proti parodontálním patogenům, ale také např. při prevenci opakovaných infekcích močového traktu. Látky z tohoto extraktu zabraňují primárně adhezi bakterií a snižují tak i tvorbu biofilmu (Chen *et al.*, 2022; Micali *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2020).

Významné antibiofilmové účinky proti *Salmonella enterica* sérovaru Typhimurium ATCC 14028 prokázal také extrakt z révy vinné (*Vitis vinifera*), který obsahoval prokyanidiny v celkové koncentraci 469,27 mg/g. V přítomnosti extraktu došlo k inhibici tvorby biofilmu o 33 %. Rozdílný výsledek byl však při působení tohoto extraktu proti *Escherichia coli* ATCC 25922. U tohoto kmene došlo k inhibici tvorby biofilmu pouze o 5 %. Tento rozdíl v účinnosti extraktu byl vysvětlen tím, že *Salmonella* Typhimurium produkuje protein LuxS, který je spojován s řízením QS a jehož expresi prokyanidiny významně inhibují. *E. coli* však tento protein netvoří, proto v tomto případě nebyl extrakt téměř vůbec účinný (Nicolosi *et al.*, 2023).

5.2.1. Antibiofilmové účinky způsobené narušením QS

Bylo prokázáno, že efekt prokyanidinů na QS biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) souvisí úzce s jejich schopností narušit expresi systémových genů *lasI* a *rhII*, které regulují syntézu homoserinových laktonů (HSL). HSL ovlivňují řadu genů indukujících expresi bakteriálních faktorů virulence v závislosti na rostoucí hustotě buněk v biofilmu. Jedná se

o důležité autoinduktory QS. Narušením těchto systémů je tedy výrazně snížena schopnost bakteriální komunikace (Mattos *et al.*, 2024). Např. extrakt z klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*), který je bohatým zdrojem prokyanidinů typu A, prokázal potlačení genů regulujících transkripci u *P. aeruginosa* (konkrétně *lasR* a *rhlR*). Došlo díky potlačení genů kódujících HSL-syntasy také ke snížení produkce HSL. Tento mechanismus však nijak nepoškodil viabilitu bakteriálních buněk. Z toho vyplývá, že prokyanidiny obsažené v tomto extraktu nevykazovaly baktericidní účinky, ale pouze specificky narušovaly schopnost vytvářet biofilm. Látky takto specificky působící zapříčiňují nižší selekční tlak, než běžná baktericidní antibiotika a je tedy nižší riziko vzniku rezistence vůči takovým látkám (Maisuria *et al.*, 2016).

Prokyanidiny z klikvy velkoplodé způsobily inhibici QS i u několika kmenů *Vibrio harveyi*. V přítomnosti extraktu došlo ke kompetici prokyanidinů s autoinduktory o místa na specifických receptorech a došlo tak k reverzibilnímu narušení fungování QS (Feldman *et al.*, 2009). Narušení fungování QS se však projevilo nejen u extraktů z klikvy, ale i u extraktu např. z listů vrcholáku pravého (*Terminalia catappa*). Tento extrakt bohatý na oligomerní prokyanidiny typu B způsobil narušení funkce QS, které se projevilo specifickou inhibicí produkce violaceinu u *Chromobacterium violaceum*. Stejný extrakt také inhiboval dozrávání biofilmů *Pseudomonas aeruginosa*. Jedná se o podklad toho, že můžeme pozorovat různé mechanismy účinku prokyanidinů u různých bakterií (Taganna *et al.*, 2011).

5.2.2. Antibiofilmové účinky způsobené narušením schopnosti adheze

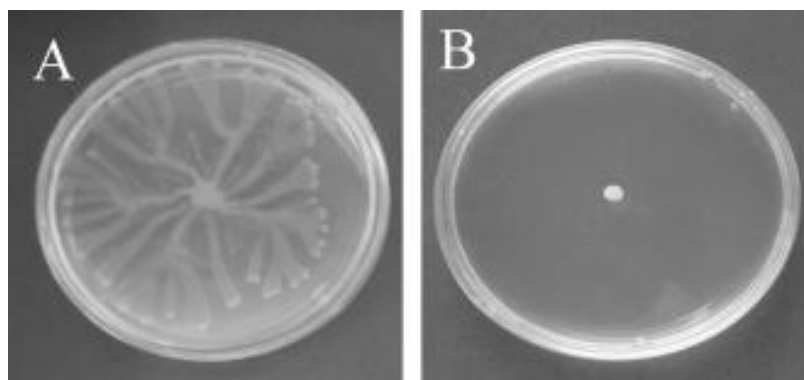
Některé prokyanidiny mají schopnost snižovat míru adheze mikrobiálních buněk k povrchům v lidském těle a díky tomu mohou výrazně snižovat schopnost tvořit biofilm. Tento mechanismus inhibice tvorby biofilmu způsobený extrakty z klikvy byl pozorován u uropatogenních kmenů *Escherichia coli*. Došlo tak ke snížení hydrofobních vlastností povrchu bakteriálních buněk, což vedlo ke snížené schopnosti adheze k povrchům (Mattos *et al.*, 2024).

Snížení adhezní schopnosti bylo pozorováno také při působení prokyanidinů z listů voskovníku červeného (*Myrica rubra*) proti *Staphylococcus epidermidis*. V přítomnosti prokyanidinů o koncentraci 160 µg/ml došlo k úbytku tvorby biofilmu *S. epidermidis* o 83,72 %. Pravděpodobným mechanismem snížení adhezní schopnosti byl vznik křížových vazeb mezi prokyanidiny a buněčným povrchem, což vedlo k narušení buněčné stěny bakterií, zvýšení permeability a tím i ke snížení adhezních sil (Zou *et al.*, 2019).

V dalším výzkumu byl prokázán antibiofilmový účinek extraktu z brusnice obsahujícího oligomerní a polymerní prokyanidiny typu A o DP 2–12 proti *Streptococcus mutans*. Mechanismem antibiofilmového účinku byla modulace aktivity mikrobiální glukosyltransferasy. Tento enzym pomáhá syntetizovat glukany biofilmové matrix, které vytváří specifická vazebná místa pro mikroorganismy kolonizující zubní povrch a jsou tak důležitým prekurzorem pro vznik dentálního biofilmu. Testovaný extrakt prokázal nejen antibiofilmové účinky *in vitro*, ale snížil také výskyt zubních kazů *in vivo* (Koo *et al.*, 2010).

5.2.3. Antibiofilmové účinky způsobené narušením schopnosti pohybu

Dalším mechanismem antibiofilmového účinku prokyanidinů je narušení schopnosti pohybu mikroorganismů. Důkazem je výzkum působení vodného extraktu z klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*) na *Vibrio cholerae*, při kterém došlo k inhibici vzniku biofilmu ve fázi vzniku a zrání. Inhibice byla způsobena sníženou produkcí a sekrecí biofilmové matrix díky regulaci intracelulární koncentrace cyklického diguanylátu (di-GMP). Cyklický di-GMP je důležitá signální molekula podílející se na regulaci motility buněk, přepínání mezi volnou napřisedlou formou a na formování biofilmu (Pederson *et al.*, 2018). Stejný extrakt vedl také ke snížení pohyblivosti u *Pseudomonas aeruginosa*. Mechanismem tohoto účinku byla interakce prokyanidinů s některými složkami bakteriálních bičíků. Extrakt však inhiboval pouze jeden z typů pohybu u *P. aeruginosa*, a to tzv. swarming (koordinovaný pohyb celé populace) (O'May and Tufenkji, 2011). Průkaz ustání tohoto pohybu v přítomnosti tohoto extraktu zobrazuje obrázek 16.



Obrázek 16: Průkaz pohybu *Pseudomonas aeruginosa* bez (A)/s (B) přítomností prokyanidinů z klikvy velkoplodé o koncentraci 100 µg/ml (O'May and Tufenkji, 2011)

5.3. Prováděné klinické studie a patentová ochrana

Díky slibným výsledkům testování antimikrobiálních a antibiofilmových vlastností prokyanidinů v *in vitro* prostředí se tomuto tématu věnuje také několik klinických studií. Cílem těchto studií je poskytnutí klinických dat podporujících možné použití extraktů obsahujících prokyanidiny při léčbě některých infekcí, např. při léčbě zánětů močových cest (Mattos *et al.*, 2024) nebo zánětu dásní (Díaz Sánchez *et al.*, 2017). Většina současných studií využívá jako primární zdroj prokyanidinů brusinky a od nich odvozené produkty (Babar *et al.*, 2021). Současné klinické studie se však velmi liší ve velikosti i demografii skupiny účastníků, v koncentraci prokyanidinů v testovaném extraktu i v experimentálním designu. Většina studií také neprovádí podrobný chemický rozbor použitého extraktu a neuvádí konkrétní koncentrace účinných látek. Výsledky jednotlivých studií jsou proto velmi rozdílné. Ve většině studií zatím nebyl potvrzen významný pozitivní vliv prokyanidinů při léčbě infekcí. Je proto potřeba provádět další studie zaměřující se mimo jiné na chemickou strukturu použitých prokyanidinů, souvislost struktury s aktivitou a konkrétní mechanismy jejich účinku. Velkým přínosem by bylo i zvýšení počtu studií zaměřujících se na vlastnosti prokyanidinů pocházejících z jiných přírodních zdrojů než z brusinek (Mattos *et al.*, 2024).

Sloučeniny obsahující prokyanidiny se staly také předmětem několika přihlášek k udělení patentů. Celkově byla v letech 2001–2023 zaznamenáno 121 patentových podání týkajících se antimikrobiálních a antibiofilmových vlastností prokyanidinů. Většina těchto dokumentů se týkala prokyanidinů extrahovaných z různých přírodních zdrojů a jejich využití v oblasti zdravotnictví. Jednalo se např. o látky pro léčbu zánětů močových cest, léčbu ran nebo inovativní antimikrobiální textilie pro prevenci infekcí. Další skupina patentů se týkala využití prokyanidinů ve stomatologii jako prevence vzniku zubního kazu, a to právě pro jejich antibiofilmové vlastnosti. Dále byly navrženy speciální filtry s obsahem prokyanidinů k filtraci vzduchu v klimatizačních systémech aut. Většina přihlášek k udělení takových patentů je však ještě stále přezkoumávána.

Také v oblasti potravinářství bylo publikováno několik přihlášek k udělení patentů týkajících se prokyanidinů. Cílem těchto patentů bylo vylepšení obalových materiálů a zvýšení trvanlivosti potravin. Příkladem je přidávání prokyanidinů do těstovin z vysohorského ječmene. U výsledného produktu byla prokázána vyšší trvanlivost a celková kvalita výrobku, proto byl proces na začátku roku 2024 patentován. Dalším zkoumaným využitím prokyanidinů v potravinářství je zabránění kontaminace při produkci potravin z přírodních zdrojů,

např. při produkci medu. Většina zmiňovaných patentových nároků je však zatím ve fázi přezkoumávání a hodnocení příslušnými orgány (Mattos *et al.*, 2024).

ZÁVĚR

U prokyanidinů byla prokázána antimikrobiální aktivita jak proti Gram-pozitivním tak i proti Gram-negativním mikroorganismům. Nejčastějším zdrojem těchto prokyanidinů je extrakt z kůry modřínu dahurského (*Larix gmelinii*). Nejpravděpodobnějšími mechanismy antimikrobiálního účinku je narušení integrity buněčné membrány nebo zasažení energetického metabolismu mikrobiálních buněk snížením aktivity důležitých enzymů. Také antibiofilmové účinky prokyanidinů potvrdilo několik výzkumů. Nejvíce prozkoumaným zdrojem prokyanidinů s těmito účinky je klikva velkoplodá (*Vaccinium macrocarpon*). Mezi hlavní mechanismy účinku patří narušení mezibuněčné komunikace nazývané *quorum sensing*, zabránění pohybu mikrobiálních buněk nebo zabránění jejich adheze.

Prokyanidiny také prokázaly synergický efekt s jinými antimikrobiálními látkami. Dokážou tak podporovat účinnost běžných antibiotik, antimykotik a také jiných prokyanidinů. Proto je použití prokyanidinů v kombinaci s běžnými léčivými přípravky jedním z možných využití v léčbě infekcí způsobených rezistentními mikrobiálními kmeny.

Publikované výzkumy však ne vždy podávaly úplné informace o mechanismech účinku prokyanidinů a o jejich přesné struktuře. Je proto nutné provádět další testování zaměřené na konkrétní mechanismy účinku a na podrobnou analýzu struktury prokyanidinů v používaných přírodních extraktech. Také je třeba nastavit vhodné standardizované podmínky, aby se jednotlivé výsledky tolik nelišily v závislosti např. na odolnosti použitého kmene. Prokyanidiny mají velký potenciál pro využití v potravinářství, ale i ve veterinární a humánní medicíně. Je však potřeba provádět další výzkumy *in vitro* i *in vivo*, aby bylo možné stanovit optimální dávku, terapeutický účinek, ale i odhalit případné nežádoucí vedlejší účinky.

POUŽITÁ LITERATURA

Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10.

https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19

Al-Bakri, A. G., & Afifi, F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 19–25.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.013>

Alejo-Armijo A., Glibota N., Frías M. P., Altarejos J., Gálvez A., Ortega-Morente E., & Salido, S. (2017). Antimicrobial and antibiofilm activities of procyanidins extracted from laurel wood against a selection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(3), 679–686.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.13321>

Alejo-Armijo, A., Glibota, N., Frías, M. P., Altarejos, J., Gálvez, A., Salido, S., & Ortega-Morente, E. (2018). Synthesis and evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of A-type procyanidin analogues against resistant bacteria in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(9), 2151–2158.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00535>

Ares, P., Gaur, G., Willing, B., Weber, F. & Schieber, A. (2023). Antibacterial and enzyme inhibitory activities of flavan-3-ol monomers and procyanidin-rich grape seed fractions. *Journal of Functional Foods*. 107, 105643.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105643>

Arruda, H. S., Silva, E. K., Pereira, G. A., Angolini, C. F. F., Eberlin, M. N., Meireles, M. A. A., & Pastore, G. M. (2019). Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 50, 82–95.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.002>

Babar, A., Moore, L., Leblanc, V., Dudonné, S., Desjardins, Y., Lemieux, S., Bochar, V., Guyonnet, D., & Dodin, S. (2021). High dose versus low dose standardized cranberry proanthocyanidin extract for the prevention of recurrent urinary tract infection in healthy women: a double-blind randomized controlled trial. *BMC Urology*, 21(1), 44.

<https://doi.org/10.1186/s12894-021-00811-w>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Beckers, B., Lang, H. R., Schimke, D., & Lammers, A. (1985). Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *European Journal of Clinical Microbiology*, 4(6), 556–561.

<https://doi.org/10.1007/BF02013394>

Castilho, A. L., Caleffi-Ferracioli, K. R., Canezin, P. H., Dias Siqueira, V. L., de Lima Scodro, R. B., & Cardoso, R. F. (2015). Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. *Journal of Microbiological Methods*, *111*, 119–121.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.007>

Cleaver, L., & Garnett, J. A. (2023). How to study biofilms: technological advancements in clinical biofilm research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1335389.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1335389>

Dantas-Medeiros, R., Zanatta, A. C., de Souza, L. B. F. C., Fernandes, J. M., Amorim-Carmo, B., Torres-Rêgo, M., Fernandes-Pedrosa, M. F., Vilegas, W., Araújo, T. A. S., Michel, S., Grougnet, R., Chaves, G. M., & Zucolotto, S. M. (2021). Antifungal and antibiofilm activities of B-type oligomeric procyanidins from *Commiphora leptophloeos* used alone or in combination with fluconazole against *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 613155.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.613155>

Díaz Sánchez, R. M., Castillo-Dalí, G., Fernández-Olavarría, A., Mosquera-Pérez, R., Delgado-Muñoz, J. M., Gutiérrez-Pérez, J. L., & Torres-Lagares, D. (2017). A prospective, double-blind, randomized, controlled clinical trial in the gingivitis prevention with an oligomeric proanthocyanidin nutritional supplement. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 7460780.

<https://doi.org/10.1155/2017/7460780>

Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, *165*(1), 9–28.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x>

Duckworth, P. F., Rowlands, R. S., Barbour, M. E., & Maddocks, S. E. (2018). A novel flow-system to establish experimental biofilms for modelling chronic wound infection and testing the efficacy of wound dressings. *Microbiological Research*, *215*, 141–147.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.009>

Feldman, M., Weiss, E. I., Ofek, I., & Steinberg, D. (2009). Interference of cranberry constituents in cell-cell signaling system of *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, *59*(4), 469–474.

<https://doi.org/10.1007/s00284-009-9462-3>

Feßler, A., Wang, Y., Burbick, C., Campos, D., Fajt, V., Lawhon, S., Li, X., Lubbers, B., Maddock, K., Miller, R., Papich, M., Simjee, S., Sweeney, M., Watts, J., Wu, C., Shen, J., & Schwarz, S. (2023). Antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine: performance, interpretation of results, best practices and pitfalls. *One Health Advances*, *1*(26), 1–16

<https://doi.org/10.1186/s44280-023-00024-w>

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J., Ibáñez, E., & Concepción, G. M. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, *563*, 44–50.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.054>

Garibo, D., Borbón-Núñez, H. A., de León, J. N. D., García Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magaña, Y., Tiznado, H., Ovalle-Marroquin, M., Soto-Ramos, A. G., Blanco, A., Rodríguez, J. A., Romo, O. A., Chávez-Almazán, L. A., & Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, *10*(1), 12805.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69606-7>

Grases, F., Prieto, R. M., Fernández-Cabot, R. A., Costa-Bauzá, A., Sánchez, A. M., & Prodanov, M. (2015). Effect of consuming a grape seed supplement with abundant phenolic compounds on the oxidative status of healthy human volunteers. *Nutrition Journal*, *14*(94)

<https://doi.org/10.1186/s12937-015-0083-3>

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. L. (2004). Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *Journal of Nutrition*, *134*(3), 613–617.

<https://doi.org/10.1093/jn/134.3.613>

Harika, K., Shenoy, V. P., Narasimhaswamy, N., & Chawla, K. (2020). Detection of biofilm production and its impact on antibiotic resistance profile of bacterial isolates from chronic wound infections. *Journal of Global Infectious Diseases*, *12*(3), 129–134.

https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_150_19

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *15*(4), 305–311.

[https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70197-0](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70197-0)

Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T. O., Shiota, S., Tsuchiya, T., & Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, *66*(17), 2047–2055.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.013>

Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, *38*(1), 61–65.

<https://doi.org/10.1042/bj0380061>

Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., Song, Z., & Høiby, N. (2011). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(9), 4469–4474.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00126-11>

Horváth, G., Jám bor, N., Somogyi-Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., & Kocsis, B. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, *25*, 178–182.

<https://doi.org/10.1002/ffj.1993>

- Chen, H., Wang, W., Yu, S., Wang, H., Tian, Z., & Zhu, S.** (2022). Procyanidins and their therapeutic potential against oral diseases. *Molecules*, 27(9), 2932.
<https://doi.org/10.3390/molecules27092932>
- Chen, J., Zhong, K., Jing, Y., Liu, S., Qin, S., Peng, F., Li, D., & Peng, C.** (2023). Procyanidin B2: a promising multi-functional food-derived pigment for human diseases. *Food Chemistry*, 420, 136101.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136101>
- Igarashi M.** (2019). New natural products to meet the antibiotic crisis: a personal journey. *Journal of Antibiotics*, 72(12), 890–898.
<https://doi.org/10.1038/s41429-019-0224-6>
- Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Soriano, M. D. P. C., Ugalde-Arbizu, M., Alberto, M. R., Zampini, I. C., Isla, M. I., Simirigiotis, M. J., & Schmeda-Hirschmann, G.** (2017). The native fruit *Geoffroea decorticans* from arid northern Chile: phenolic composition, antioxidant activities and *in vitro* inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Molecules*, 22(9), 1565.
<https://doi.org/10.3390/molecules22091565>
- Karioti, A., Sokovic, M., Ciric, A., Koukoulitsa, C., Bilia, A. R., & Skaltsa, H.** (2011). Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6412–6422.
<https://doi.org/10.1021/jf2011535>
- Karki, S., Sah, A., Lamichhane, J., Maharjan, A., Sharma, L., Rajbhandari, R., Parajuli, S., Acharya, S., & Khanal, S.** (2019). Biofilm formation and detection of *icaD* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Open Microbiology Journal*, 13(1), 230–235.
<https://doi.org/10.2174/1874285801913010230>
- Kinniment, S. L., Wimpenny, J. W. T., Adams, D., & Marsh, P. D.** (1996). Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology*, 142 (3), 631–638.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-631>
- Konaté, K., Mavoungou, J. F., Lepengué, A. N., Aworet-Samseny, R. R., Hilou, A., Souza, A., Dicko, M. H., & M'batchi, B.** (2012). Antibacterial activity against β -lactamase producing methicillin and ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional inhibitory concentration index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11, 18.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-18>
- Koo, H., Duarte, S., Murata, R. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Watson, G. E., Singh, A. P., & Vorsa, N.** (2010). Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. *Caries Research*, 44(2), 116–126.
<https://doi.org/10.1159/000296306>

- Kumar, S., & Pandey, A. K.** (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, 2013, 162750.
<https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kunwar, A., Shrestha, P., Shrestha, S., Thapa, S., Shrestha, S., & Amatya, N. M.** (2021). Detection of biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns Open*, 5, 125–129.
<https://doi.org/10.1016/j.burnso.2021.04.001>
- Lacombe, A., Wu, V. C., Tyler, S., & Edwards, K.** (2010). Antimicrobial action of the american cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1–2), 102–107.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.035>
- Levy, J., Boyer, R. R., Neilson, A. P., O'Keefe, S. F., Chu, H. S. S., Williams, R. C., Dorenkott, M. R., & Goodrich, K. M.** (2017). Evaluation of peanut skin and grape seed extracts to inhibit growth of foodborne pathogens. *Food Science & Nutrition*, 5(6), 1130–1138.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.503>
- Li, X., He, C., Song, L., Li, T., Cui, S., Zhang, L., & Jia, Y.** (2017). Antimicrobial activity and mechanism of larch bark procyanidins against *Staphylococcus aureus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(12), 1058–1066.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmx112>
- Lončarić, A., Matanović, K., Ferrer, P., Kovač, T., Šarkanj, B., Skendrović Babojelić, M., & Lores, M.** (2020). Peel of traditional apple varieties as a great source of bioactive compounds: extraction by micro-matrix solid-phase dispersion. *Foods*, 9(1), 80.
<https://doi.org/10.3390/foods9010080>
- Machado, A., Pasquel, J., Barbero, G., & Martínez, J.** (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Maisuria, V. B., Los Santos, Y. L., Tufenkji, N., & Déziel, E.** (2016). Cranberry-derived proanthocyanidins impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6, 30169.
<https://doi.org/10.1038/srep30169>
- Maisuria, V. B., Okshevsky, M., Déziel, E., & Tufenkji, N.** (2019). Proanthocyanidin interferes with intrinsic antibiotic resistance mechanisms of Gram-negative bacteria. *Advanced Science*, 6(15), 1802333.
<https://doi.org/10.1002/advs.201802333>
- Mattos, M. M. G., Filho, S. A., Martins, G. R., Venturi, L. S., Canetti, V. B., Ferreira, F. A., Foguel, D., & Silva, A. S. D.** (2024). Antimicrobial and antibiofilm properties of procyanidins: potential for clinical and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 20, 1–24.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2404509>

- McKinnon, K. M.** (2018). Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11.
<https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Micali, S., Isgro, G., Bianchi, G., Miceli, N., Calapai, G., & Navarra, M.** (2014). Cranberry and recurrent cystitis: more than marketing? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1063–1075.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.625574>
- Muhamad, I., Hassan, N., Mamat, S., Nawi, N., Rashid, W., & Tan, N.** (2017). Extraction technologies and solvents of phytochemicals from plant materials: physicochemical characterization and identification of ingredients and bioactive compounds from plant extract using various instrumentations. *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*, 2017, 523–560.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00014-4>
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E.** (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.
<https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
- Nehra, P., & Chauhan, R. P.** (2023). Antimicrobial activity of nanocellulose composite hydrogel isolated from an agricultural waste. *Archives of Microbiology*, 205(4), 1–10
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03454-7>
- Nicolosi, R. M., Bonincontro, G., Imperia, E., Badiali, C., De Vita, D., Sciubba, F., Dugo, L., Guarino, M. P. L., Altomare, A., Simonetti, G., & Pasqua, G.** (2023). Protective effect of procyanidin-rich grape seed extract against Gram-negative virulence factors. *Antibiotics*, 12(11), 1615.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12111615>
- Ohnuma, T., Sakamoto, K., Shinoda, A., Takagi, C., Ohno, S., Nishiyama, T., Ogura, K., & Hiratsuka, A.** (2017). Procyanidins from cinnamomi cortex promote proteasome-independent degradation of nuclear Nrf2 through phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor in A549 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 635, 66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.007>
- O'May, C., & Tufenkji, N.** (2011). The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3061–3067.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02677-10>
- Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Lòpez, C., Serio, A., Marsilio, F., & Suzzi, G.** (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19, 1174–1182.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>
- Pederson, D. B., Dong, Y., Blue, L. B., Smith, S. V., & Cao, M.** (2018). Water-soluble cranberry extract inhibits *Vibrio cholerae* biofilm formation possibly through modulating the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylate level. *PLoS One*, 13(11), e0207056.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207056>

Pereira, C., & Meireles, M. A. (2009). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 340–372.

<https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>

Plucińska, A., Marczak, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Baryga, A. (2022). Predictive evaluation of microbiological stability of soft drinks with *Lycium barbarum* L. stored at temperature shifts. *Molecules*, 27(17), 5508.

<https://doi.org/10.3390/molecules27175508>

Porto, C., Decorti, D., & Natolino, A. (2014). Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: a comparison and a proposal. *Journal of Supercritical Fluids*, 87, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.12.019>

Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1270–1276.

<https://doi.org/10.1021/jf001211q>

Ramani, R., & Chaturvedi, V. (2000). Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2752–2758.

<https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2752-2758.2000>

Riihinen, K. R., Ou, Z. M., Gödecke, T., Lankin, D. C., Pauli, G. F., & Wu, C. D. (2014). The antibiofilm activity of lingonberry flavonoids against oral pathogens is a case connected to residual complexity. *Fitoterapia*, 97, 78–86.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.012>

Rogers, S. S., van der Walle, C., & Waigh, T. A. (2008). Microrheology of bacterial biofilms *in vitro*: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Langmuir*, 24(23), 13549–13555.

<https://doi.org/10.1021/la802442d>

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>

Růžicka, F., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R., Horvát, R., Heroldová, M., & Woznicová, V. (2004). Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiologica*, 49(5), 596–600.

<https://doi.org/10.1007/BF02931540>

Sader, H. S., & Pignatari, A. C. (1994). E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing. *Sao Paulo Medical Journal*, 112(4), 635–638.

<https://doi.org/10.1590/s1516-31801994000400003>

Sanchez Armengol, E., Harmanci, M., & Laffleur, F. (2021). Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. *Microbiological Research*, 252, 126867.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126867>

Sánchez, M. C., Ribeiro-Vidal, H., Bartolomé, B., Figuero, E., Moreno-Arribas, M. V., Sanz, M., & Herrera, D. (2020). New evidences of antibacterial effects of cranberry against periodontal pathogens. *Foods*, 9(2), 246.

<https://doi.org/10.3390/foods9020246>

Sever, E. A., Aybakan, E., Bešli, Y., Karatuna, O., & Kocagoz, T. (2024). A novel rapid bioluminescence-based antimicrobial susceptibility testing method based on adenosine triphosphate consumption. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1357680.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1357680>

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>

Shimada, T., Tokuhara, D., Tsubata, M., Kamiya, T., Kamiya-Sameshima, M., Nagamine, R., Takagaki, K., Sai, Y., Miyamoto, K., & Aburada, M. (2012). Flavangenol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models. *European Journal of Pharmacology*, 677(1–3), 147–153.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.034>

Sien, L., Lihan, S. & Toh, S. C. (2022). Prevalence of chloramphenicol-resistant gene in *Escherichia coli* from water sources in aquaculture farms and rivers of Kuching, Northwestern Borneo. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(4), 202–213.

<https://doi.org/10.47853/FAS.2022.e19>

Silva, R. R., Oliveira e Silva, D., Fontes, H. R., Alviano, C. S., Fernandes, P. D., & Alviano, D. S. (2013). Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 107.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-107>

Sitarek, P., Merez-Sadowska, A., Sikora, J., Dudzic, M., Wiertek-Płoszaj, N., Picot, L., Śliwiński, T., & Kowalczyk, T. (2024). Flavonoids and their derivatives as DNA topoisomerase inhibitors with anti-cancer activity in various cell models: exploring a novel mode of action. *Pharmacological Research*, 209, 107457.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107457>

Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2017). Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1244–1262.

<https://doi.org/10.1111/bph.13630>

Snijders, K. E., Fehér, A., Táncos, Z., Bock, I., Téglási, A., van den Berk, L., Niemeijer, M., Bouwman, P., Le Dévédec, S. E., Moné, M. J., Van Rossom, R., Kumar, M., Wilmes, A., Jennings, P., Verfaillie, C. M., Kobolák, J., Ter Braak, B., Dinnyés, A., & van de Water, B. (2021). Fluorescent tagging of endogenous heme oxygenase-1 in human induced pluripotent stem cells for high content imaging of oxidative stress in various differentiated lineages. *Archives of Toxicology*, *95*(10), 3285–3302.

<https://doi.org/10.1007/s00204-021-03127-8>

Taganna, J. C., Quanico, J. P., Perono, R. M., Amor, E. C., & Rivera, W. L. (2011). Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, *134*(3), 865–871.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.028>

Todd, R., & Baroutian, S. (2017). A techno-economic comparison of subcritical water, supercritical CO₂ and organic solvent extraction of bioactives from grape marc. *Journal of Cleaner Production*, *158*, 349–358.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.043>

Uchida, S., Ohta, H., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I., Niwa, M., & Ozaki, M. (1988). Scavenging effect of condensed tannins on active oxygen free radicals. *Japanese Journal of Pharmacology*, *46*, 88.

[https://doi.org/10.1016/S0021-5198\(19\)57109-8](https://doi.org/10.1016/S0021-5198(19)57109-8)

Valencia-Hernandez, L. J., Wong-Paz, J. E., Ascacio-Valdés, J. A., Chávez-González, M. L., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2021). Procyanidins: from agro-industrial waste to food as bioactive molecules. *Foods*, *10*(12), 3152.

<https://doi.org/10.3390/foods10123152>

Vasudevan, S., Thamil Selvan, G., Bhaskaran, S., Hari, N., & Solomon, A. P. (2020). Reciprocal cooperation of type A procyanidin and nitrofurantoin against multi-drug resistant (MDR) UPEC: a pH-dependent study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 421.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00421>

Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell cytometry: review and perspective on biotechnological advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*, 147.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>

Vojtek, L., Dobes, P., Büyükgüzel, E., Atosuo, J., & HyrsI, P. (2014). Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology*, *111*(3), 335–340.

<https://doi.org/10.14411/eje.2014.045>

Wang, J., Zhang, W., Tang, C., Xiao, J., Xie, B., & Sun, Z. (2018a). Synergistic effect of B-type oligomeric procyanidins from lotus seedpod in combination with water-soluble poria cocos polysaccharides against *E. coli* and mechanism. *Journal of Functional Foods*, *48*, 134–143.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.015>

- Wang, Q. Q., Gao, H., Yuan, R., Han, S., Li, X. X., Tang, M., Dong, B., Li, J. X., Zhao, L. C., Feng, J., & Yang, S.** (2020a). Procyanidin A2, a polyphenolic compound, exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *PLoS One*, *15*(8), e0237017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237017>
- Wang, R., Zhang, Y., Jia, Y., Zhang, M., Yunfei, H., Li, C., & Li, K.** (2020b). Persimmon oligomeric proanthocyanidins exert antibacterial activity through damaging the cell membrane and disrupting the energy metabolism of *Staphylococcus aureus*. *ACS Food Science & Technology*, *1*(1), 35–44.
<https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00021>
- Wang, T., Guo, N., Wang, S., Kou, P., Zhao, C., & Fu, Y.** (2018b). Ultrasound-negative pressure cavitation extraction of phenolic compounds from blueberry leaves and evaluation of its DPPH radical scavenging activity. *Food and Bioproducts Processing*, *108*, 69–80.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.01.003>
- White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., & Bosso, J. A.** (1996). Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *40*(8), 1914–1918.
<https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1914>
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J.** (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, *7*(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Xu, X., Xie, H., Wang, Y., & Wei, X.** (2010). A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(22), 11667–11672.
<https://doi.org/10.1021/jf1033202>
- Yang, H., Xiao, L., Yuan, Y., Luo, X., Jiang, M., Ni, J., & Wang, N.** (2014). Procyanidin B2 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human vascular endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, *92*(4), 599–606.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.10.001>
- Yang, H., Tuo, X., Wang, L., Tundis, R., Portillo, M., Simal-Gandara, J., Yu, Y., Zou, L., Xiao, J., & Deng, J.** (2021). Bioactive procyanidins from dietary sources: the relationship between bioactivity and polymerization degree. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 114–127.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.063>
- Zhang, L. L., Zhang, L. F., & Xu, J. G.** (2020). Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). *Scientific Reports*, *10*(1), 8876.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65802-7>
- Zhao, S., Zhang, L., Yang, C., Li, Z., & Rong, S.** (2019). Procyanidins and Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *56*(8), 5556–5567.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1469-6>

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.
<https://doi.org/10.3390/nu8080515>

Zou, M., Tao, W., Ye, X., & Liu, D. (2019). Evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves against *Staphylococcus epidermidis*. *Food Science & Nutrition*, 8(1), 139–149.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1283>