

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Antimikrobiální aktivita extraktů ze světlíku lékařského  
(Euphrasia rostkoviana) in vitro**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Hana Davidová**

**Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální aktivita extraktů ze světlíku lékařského (*Euphrasia rostkoviana*) in vitro" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Pavlovi Novému, Ph.D. za trpělivost, pochopení, podporu a za zajímavé téma ke zpracování. Také bych ráda poděkovala těm, kteří ve mně věřili a věří.

# Antimikrobiální aktivita extraktů ze světlíku lékařského (*Euphrasia rostkoviana*) *in vitro*

**Souhrn:** Tato práce se zabývá antimikrobiálním působením extraktů a silice ze světlíku lékařského (*Euphrasia rostkoviana* Hayne) na mikroorganismy, které jsou označovány jako běžní původci nemocí očí. Formou rešerše je otevřeno téma tradičního léčitelství, možností využití léčivých bylin, jejich aktivních složek a samotný světlík lékařský a jeho působení. Díky jeho zjevnému spojení s léčbou očních infekcí je rozebráno téma vzniku infekce, typy očních infekcí stejně jako organismů, které za tímto vznikem stojí. V praktické části práce popisuje samotný výzkum, do kterého patří příprava extraktů (vodný, acetonový, ethanolový, hexanový, odvar) a silice, testování jejich schopností inhibovat růst vybraných patogenů (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus Faecalis*, *Escherichie coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*) a v neposlední řadě analýza složení silice. Pro určení minimální inhibiční koncentrace byla použita bujónová mikrodiluční metoda *in vitro*.

Jako nejefektivnější byla zjištěna silice, která vykazala inhibiční vlastnosti, a to při nízké koncentraci oproti ostatním extraktům (MIC 512 – 2048  $\mu\text{g/ml}$ ). Spolu s acetonovým extraktem také silice vykazala nejširší spektrum účinnosti, když inhibovala 6 ze sedmi testovaných mikroorganismů. Dosažené výsledky potvrzují antimikrobiální potenciál rostliny a také analyzují složení silice, které ukazuje konkrétní látky, které by za antimikrobiální aktivitu mohly být zodpovědné.

**Klíčová slova:** Světlík lékařský; *Euphrasia rostkoviana*; antimikrobiální aktivita; oční infekce; extrakty z léčivých bylin; silice

# Antimicrobial activity of *Euphrasia rostkoviana* extracts in vitro

## Summary:

This thesis is focused on antimicrobial activity of extracts and essential oil of Eyebright (*Euphrasia rostkoviana* Hayne) against microorganisms, whose are connected with eye disorders. The literature review opens the topic of traditional medicine, potential use of medicinal plants, their active substances and the Eyebright itself and its activity. Thanks to obvious connection to the treatment of eyes infections, the topic of beginning of an infection, types of eye infections as well as the pathogens responsible for it. Practical part describes own research, including information about methods of extraction (water, acetone, ethanol, hexane, water decoction) and essential oil, tests of their abilities of growth inhibition of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus Faecalis*, *Escherichie coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) and also the analysis of essential oil composition. Minimum inhibitory concentrations were determined by broth microdilution method *in vitro*.

The essential oil was shown as the most effective exerting inhibitory activity at lower concentrations when compared with other extracts (MIC 512 – 2048 µg/ml). Together with the acetone extract, the essential oil showed also the broadest spectrum of activity inhibiting 6 out of 7 microorganisms tested. The observed results confirm the antimicrobial potential of the plant and bring also information on the essential oil composition, showing some compound candidates that can be responsible for the antimicrobial activity.

**Keywords:** Eyebright; *Euphrasia rostkoviana*; antimicrobial activity; eye infections; extracts of herbal plants; essential oil

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	10
3	Přehled literatury.....	11
3.1	Léčivé byliny.....	11
3.1.1	Historie.....	11
3.1.2	Formy úpravy.....	14
3.1.2.1	Odvar.....	14
3.1.2.2	Nálev.....	14
3.1.2.3	Prášek.....	15
3.1.2.4	Extrakt.....	15
3.1.2.5	Lisování.....	15
3.1.2.6	Rozmělnění.....	15
3.1.3	Účinné látky.....	16
3.1.3.1	Fenolické látky.....	16
3.1.3.2	Flavonoidy.....	17
3.1.3.3	Alkaloidy.....	18
3.1.3.4	Glykosidy.....	19
3.1.3.5	Saponiny.....	19
3.1.3.6	Taniny.....	20
3.1.3.7	Terpeny.....	21
3.1.3.7.1	Silice.....	21
3.1.4	Léčebná aktivita.....	22
3.1.4.1	Antioxidační působení.....	22
3.1.4.2	Antimikrobiální aktivita.....	23
3.1.4.3	Antikarcinogenní účinky.....	24
3.1.5	Současný přístup.....	25
3.2	Světlík lékařský ( <i>Euphrasia rostkoviana</i> ).....	25
3.2.1	Tradiční použití.....	25
3.2.2	Aktuální využití.....	27
3.3	Infekce a mikroorganismy.....	28
3.4	Mikrobiální flóra.....	28
3.5	Vztahy mezi organismy.....	29
3.6	Symbiotické.....	29
3.7	Komezální.....	29

3.8	Patogenní.....	30
3.9	Obrana organismu .....	30
3.10	Infekce a infekční nemoci .....	31
3.11	Infekce očí .....	32
3.11.1.1	Konjunktivitida .....	32
3.11.1.2	Keratitida.....	32
3.11.1.3	Endoftalmitida.....	32
3.11.1.4	Uveitida .....	32
3.11.1.5	Periorbitální infekce .....	33
3.12	Patogeny vyvolávající infekce očí.....	33
3.13	Bakterie.....	33
3.13.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
3.13.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	34
3.13.3	<i>Enterococcus Faecalis</i> .....	35
3.13.4	<i>Escherichie coli</i> .....	35
3.13.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	36
3.13.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	36
3.14	Kvasinky .....	37
3.14.1	<i>Candida albicans</i> .....	37
4	Materiály a metody .....	38
4.1	Chemikálie .....	38
4.2	Rostlinný materiál a extrakce.....	38
4.2.1	Extrakce do rozpouštědel.....	38
4.2.2	Destilace silice .....	39
4.3	Bakteriální kmeny a kultivační média.....	39
4.4	Příprava inokula .....	40
4.5	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	40
4.6	Stanovení minimální baktericidní a fungicidní koncentrace.....	42
4.7	Analýza složení silice na plynovém chromatografu a hmotnostním spektrometru ...	42
5	Výsledky .....	44
5.1	Inhibiční aktivita extraktů .....	44
5.2	Baktericidní a fungicidní aktivita extraktů.....	46
5.3	Inhibiční aktivita silice .....	47
5.4	Baktericidní a fungicidní aktivita silice .....	49
5.5	Složení silice .....	49
6	Diskuze .....	51

7	Závěr .....	55
8	Seznam literatury .....	56
9	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	61



# 1 Úvod

Žijeme v době, kdy se ztrácí spojení mezi přírodou a člověkem. Toto se neodráží pouze v ničení světa kolem nás, ale trpíme tím i mi samotní, i když si to mnohdy neuvědomuje. Održení od přirozeného řádu, nenacházíme pomoc v situacích, kdy by pomohlo prosté zastavení se a rozhlédnutí. Mnohdy je řešení přímo před námi a bylo tu celou dobu.

Světlík lékařský (*E.rostkoviana*) je rostlina, která má léčebné účinky a pomáhá při nemocech očí. Věděli to naši předci dávno předtím, než byla objevena konvenční léčiva či syntetické přípravky. Dokonce bylinu pojmenovali tak, aby bylo všem i v budoucnu jasné, k jakému účelu je vhodná. Přesto zůstala dlouhou dobu téměř nepovšimnuta. Tuto práci a především výzkum, kterým se zabývala bychom mohli brát jako krok směrem, který by nám do budoucna mohl být prospěšný.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle práce:

1. Určit jestli a při jaké koncentraci mají různé extrakty ze světlíku lékařského *Euphrasia rostkoviana* antimikrobiální případně baktericidní resp. fungicidní účinek proti vybraným mikroorganismům.
2. Analýza složení vydestilované silice.

Vědecká hypotéza:

Světlík lékařský *Euphrasia rostkoviana* je v herbáři uváděn jako bylina, která se v domácím léčitelství používá k léčbě zánětů očí. Výtažky ze světlíku lékařského *E.rostkoviana* můžeme v dnešní době nalézt jako složky volně prodejných farmaceutik doporučovaných při různých očních obtížích. Předpokládáme tedy, že světlík lékařský *E.rostkoviana* má antimikrobiální účinky.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Léčivé byliny

#### 3.1.1 Historie

Jakkoliv dějinné důkazy nasvědčují tomu, že léčivé rostliny byly používány už starodávnými civilizacemi, vystopovat historii přírodní medicíny není jednoduché. Primitivní člověk si všímal a oceňoval velkou rozmanitost rostlin, které mu byly dostupné (Singh, 2006). A jelikož se jimi živil, všímal si i jejich vlastností včetně schopnosti vyléčit nemoci nebo možnosti uškodit. Těchto znalostí díky novým zkušenostem přibývalo a aby nezanikly, shromažďovali je jedinci, ze kterých se stávali léčitelé. V této době si lidé představovali, že vše v přírodě tedy slunce, rostlina i kámen, má svoji duši, a ve schopnosti rostliny přemoci nemoc viděli tajemnou sílu či kouzelnou moc. Léčitelé se stavěli do role prostředníků mezi touto silou a člověkem. Jejich moc se upevňovala, pokud po čarování či požití byliny nemoc ustoupila (Korbelář a Endris, 1985).

První záznam o použití léčivých bylin v rámci systému zdravotní péče pochází z Číny (2800 př. n. l.). Zdá se, že mnoho rostlin používaných k léčbě bylo objeveno díky pozorování divokých zvířat a také metodou pokus a omyl. Velký čínský císař Shen Hung (3000 př. n. l.) zapsal ve své práci *Pen Ts ao.ching* (Divine Husbandman's materia medica) 365 léčivých rostlin. Dílo je považováno za nejranější dochovaný čínský lékopis. Dále kupříkladu Shen Nong zdokumentoval použití Ma Huang (chvojník) v léčbě respiračních obtíží jako bronchitida a astma. Seznam užívaných léčivých rostlin napsal také Hammurabi, král Babylonie (1800 př. n. l.). Zdokumentoval použití máty peprné v léčbě obtíží zažívacího ústrojí (Singh, 2006). Záznamy z Mezopotámie datované okolo roku 2600 př. n. l. dokládají použití přibližně 1000 substancí pocházejících z rostlin. Patří mezi ně oleje druhu *cedrus* (cedr) a *Cupressus sempervirens* (cypřiš), *Glycyrrhiza glabra* (lékořice), druhu *Commiphora* (myrta) a *Papaver somniferum* (maková šťáva). Jejich využití k rozličné léčbě, od kašle a nastydnutí po parazitální infekce a záněty, přetrvalo do dnešní doby. Také počátky egyptského lékařství se datují okolo roku 2900 př. n. l. "Ebers Papyrus" z roku 1500 př. n. l., patří mezi nejznámější a popisuje přes 700 drog převážně rostlinného původu (Cechinel-Filho, 2012). Indie byla první zemí, která vyvážela koření a drogy. Už kolem roku 2000 př.

n.l. cestovaly karavany z Indie a Číny přes Babylónskou říši k Černému moři do Sýrie, Palestiny a Egypta (Korbelář a Endris, 1985).

Základy středomořského a evropského lékařství byly položeny fyziky a filozofy během období antického Řecka a Římského císařství. Nejvýznamnějšími a nejvlivnějšími klasickými autory byli Hippokrates z Kosu (460-377 př. n. l.), Galénus (129-200 nebo 216 n.l.) a Pedanios Dioskorides (1.stol. n. l.), který úspěšně kombinoval lékařské a botanické znalosti (Leonti et Verpoorte, 2017).

Hippokrates (460-377 př. n. l.) byl slavným lékařem už ve svých 20 letech. Byl velkou autoritou, jejíž vliv lze pozorovat od 5.stol. př. n. l. dál do hlubokého středověku. Odpovědi na problémy ve fungování lidského těla se snažil získat pitvami zvířat. Také se pokoušel oprostit léčitelství od kněžského mysticismu. Dokazoval, že léčí sama příroda, a ne lékař (Korbelář a Endris, 1985). Dioscoridova *De Materia Medica* společně s Galenovou první abecední sbírkou základních drog (*De simplicium medicamentorum facultatibus libri XI*) jsou považovány za nejvlivnější herbáře, které byly kdy napsány. Díky opakovanému opisu a rozšiřování jejich náplně tvarovaly oba texty středomořské a evropské použití léčivých rostlin až do 18.stol. Dioscorides popsal lékařské využití 600 léčivých rostlin, okolo 900 bylinných, 35 zvířecích a 90 minerálních drog. O století později Galén popisuje okolo 850 jednoduchých drog velkou měrou se překrývajících s těmi, které zmiňuje Dioscorides, ty ale udávaly významně méně léčebného využití. (Leonti et Verpoorte, 2017)

Díky náboženství nastalo ve středověku zatemnění. Církev zakazovala léčit některé nemoci, za jejichž vznikem viděla hřích či nadpřirozené působení. Nemělo se bojovat ani proti moru a choleře, k uzdravení mělo dojít rukou Boží. K tomu měly vést procesí, modlitby a odkazy církvi. Navíc lékaře si mohli dovolit jen bohatí. Sociálně slabí byli odkázáni na lidové léčitelství a dochází mezi nimi k velké úmrtnosti, zvláště po středověkých válkách (Korbelář a Endris, 1985). Významnou osobností, která chtěla změnit dogmatický přístup a oprostit vědu od náboženství, byl švýcarský lékař Paracelus (1493-1541). Budoval základy moderní lékařské vědy a také lékařské chemie. Zaměřoval se též na pokusy a pozorování vlivu chemických látek na člověka, prosazoval kauzální terapii před léčbou symptomatickou a patřil mezi průkopníky i ve farmakoterapii. Období syntetické přípravy anorganických léčiv bylo započato právě jeho experimenty (Jahodář, 2010). Je známý i uvedením základních principů toxikologie a obhajováním vysokých hygienických standardů při operacích. Přesto nebyl zcela imunní proti používání symbolismu a esoterickému smýšlení (Leonti et Verpoorte, 2017). Nakonec bylo jeho učení odsouzeno a označeno jako zavrženíhodné.

Zemřel bez přátel a v bídě roku 1541 (Korbelář a Endris, 1985). V Paracelsových experimentech pokračoval v 2.pol.16.stol. Němec Oswald Croll, který začal anorganická léčiva připravovat účelově. Uběhla ještě dvě století, než se anorganická léčiva stala součástí běžné praxe v lékařství (Jahodář, 2010).

Další osobností působící v oblasti botaniky a lékařství byl Pietro Andrea Mattioli (1501-1578), který v letech 1555-1570 působil v Praze (Jahodář, 2010). Mattioliho herbář *Materia Medica* (1544) shrnoval práci Discorida a přidal popis dalších 600 léčivých druhů. Kniha měla díky množství přes 30 000 kusů značný vliv a byla přeložena do češtiny, němčiny, francouzštiny a arabštiny. Původní verze byla vydaná v italštině (Leonti et Verpoorte, 2017). Pod názvem *Herbář, jinak bylinář* (1562) vytvořil českou verzi přírodovědec Tadeáš Hájek z Hájku (1526-1600), který rozšířil texty o domácích rostlinách a zkrátil ty, které byly o rostlinách exotických (Jahodář, 2010). Staré herbáře mají i svoji historickou cenu. Zachycují myšlenky a domněnky vědců a zaznamenávají poznatky z lidového léčitelství. Zajímavostí je, že lidé, kteří žili v různých zemích, ale za podobných podmínek, používali téměř totožné prostředky k dosažení léčebného efektu (Korbelář a Endris, 1985).

Směr, kterým se západní medicína vyvíjela posledních 400 let, byl veden vírou v získání esenciálních látek z extraktů tradičně užívaných bylin. První úspěchy v izolování některých hlavních alkaloidů a důkazy o jejich prospěšnosti v lékařství byly zaznamenány před přibližně 200 lety (Leonti et Verpoorte, 2017). Německý lékárník Sertürner izoloval z opia alkaloid morfin v roce 1803. Francouzi Pelletier a Caventoun izolovali z rostliny Cinchona alkaloid chinin v roce 1819. Němec Rungen izoloval z kávy kofein v roce 1821. (Jahodář, 2010) Toto ještě posílilo zaměření výzkumu na hledání čistých látek a jejich syntézu, případně tvorbu jejich analogů. Přístup západní medicíny na konci minulého století by šel popsat jako "jeden cíl-jedna látka", to vedlo k považování jakýchkoli směsí rostlinných extraktů za nevědecké (Leonti et Verpoorte, 2017). Dnes je možné vidět změnu přístupu k přírodní léčbě. V západních zemích jsou například ajurvéda a tradiční čínská medicína populárními metodami léčby. Ukazuje se, že se zvyšuje počet pacientů konzultujících svůj stav s lékaři praktikujícími alternativní léčebné přístupy. Faktory, které mohou být této změně nápomocné, jsou cena v porovnání s efektivitou a relativní bezpečnost bylinného léčitelství (Singh, 2006).

### **3.1.2 Formy úpravy**

Specifikace zpracování rostlin se zakládají na požadavcích na bylinný materiál a konečný bylinný produkt. Hotový bylinný produkt se skládá z přípravy jedné či více bylin. Pro případ, že je použita více než jedna bylina, lze použít termín “míchaný bylinný produkt” (mix). Hotové bylinné produkty a mixy mohou vedle aktivních složek obsahovat také substance formované souběžně s aktivní složkou léčiva. Za bylinné nejsou považovány hotové produkty a mixy, do kterých byla přidána aktivní, chemicky definovaná složka, a to včetně syntetických sloučenin a/nebo složek izolovaných z bylinných materiálů (WHO, 2007).

Úprava rostliny je základem pro hotové bylinné produkty a může se skládat z rozmělnění nebo rozdrčení na prášek, výrobu extraktů, tinktur či olejů. Tyto jsou připraveny extrakcí, purifikací, koncentrací, frakcionací a dalšími fyzikálními a biologickými procesy (WHO, 2004).

#### **3.1.2.1 Odvar**

Odvar se připravuje vařením hrubě rozmělněné rostlinné drogy ve vodě. Pokud je rozmělnění příliš jemné, objeví se sedlina. Pro jeho skladování by měly být použity sterilní lahve. Před jejich plněním se odvar namísto filtrace scedí. Pokud odvar změní barvu nebo se na jeho povrchu objeví malé bílé hrudky, měl by být vyhozen. Z vnějšku se odvar používá na omývání ran a vnitřně pak k léčbě různých zdravotních obtíží (Singh, 2006).

#### **3.1.2.2 Nálev**

Nálev lze přirovnat k šálku čaje. Droga se přelije vařící nebo studenou destilovanou vodou a je ponechána v přikryté nádobě po dobu 15 minut a poté je scezena. Někdy je pro přípravu silného nálevu za použití vařící vody doba louhování v nádobě prodloužena na hodiny. Horký nálev je silnější než studený, protože se v něm efektivněji extrahují aktivní složky. Každá droga má určený čas, za který předá obsažené látky vodě. Pro přípravu studeného nálevu se droga nahrubo rozmělní a je ponechána 24h v uzavřené nádobě naplněné vodou. Prášková droga vodu vstřebá a vytvoří hmotu, která je následně slisována, až se získá tekutina, která se smíchá se zbylou vodou z nádob a poté je odměřena v měrných baňkách. Pokud nebyl použit konzervační prostředek, měl by se nálev spotřebovat během 12h. Někdy je nálev vyroben za pomoci slabého alkoholu, který pak funguje jako

konzervant. Voda použitá při výrobě nálevu by měla být destilovaná. Tvrdá voda není schopna extrahovat všechny přednosti bylin, a proto by neměla být používána (Singh, 2006).

### **3.1.2.3 Prášek**

Prášek je směs suché látky upravené na jemný prach a pečlivě smíchané dohromady. Pro přípravu prášku je nutné drogu proprat vodou a důkladně usušit. Úprava sušené drogy na prášek je provedena paličkou v hmoždíři. Prášek může být samostatnou substancí, nebo častěji směsí prášků různých látek. Různé ingredience by se měly rozmělnovat odděleně a teprve po odvážení se smíchat na téměř hladkou úpravu. Míchání se provádí malou paličkou v hmoždíři nebo špachtlí na destičce. Hydroskopické drogy by měly být skladovány v přesně těsnící lahvi, zazátkované obalením do voskového nebo parafinového papíru a pokud možno překryté tenkou fólií. Barva prášku zůstane jednotná, pokud se s lahví opakovaně třese a její obsah se přesypá, a tím jsou důkladně promíchány jeho složky. Různé práškové konzistence vznikají při průchodu přes síto s nastavitelnou změnou mřížky (Singh, 2006).

### **3.1.2.4 Extrakt**

Extrakty jsou připravovány oddělením rozpustné látky z rostlinné tkáně za použití vhodného rozpouštědla, jako je alkohol, éter a voda. Zkoncentrování výsledné tekutiny je docíleno odpařením tak, aby tekutý extrakt dosáhl koncentrace blízké suchosti a pevného extraktu. Podle použití rozpouštědla jsou extrakty klasifikovány jako alkoholové, éterové a vodné. Pevný a vodný extrakt je tříděn na základě metody přípravy. Alkoholový, éterový a vodný extrakt je kategorizován podle typu použitého rozpouštědla. Standardizovaný extrakt je přípravek, který obsahuje jistý neměnný poměr aktivní složky (Singh, 2006).

### **3.1.2.5 Lisování**

Je to proces získávání oleje nebo šťávy lisováním léčivých nebo aromatických rostlin (Singh, 2006).

### **3.1.2.6 Rozmělnění**

Je proces rozdrčení různých částí léčivé rostliny paličkou v hmoždíři nebo mixérem (Singh, 2006).

### 3.1.3 Účinné látky

Léčivá rostlina je jakákoliv rostlina, která v jednom nebo ve více svých orgánech obsahuje substance, jež mohou být použity pro terapeutické účely nebo jsou prekursory pro chemofarmaceutické semisyntézy. Části takovéto rostliny včetně listů, stonků, oddenků, květů, zrn, semen, kořenů a kůry jsou používány při léčbě nebo kontrole stavu nemoci, a tudíž obsahují chemické složky, které jsou léčebně aktivní. Tyto rostlinné ne-nutriční chemické látky nebo bioaktivní složky jsou často uváděny jako fytochemikálie nebo fytochemikálie (Doughari, 2012). Slovo fytochemikálie vychází z řeckého výrazu fyto neboli rostlina. Jejich studium zahrnuje porozumění chemického složení rostlin používaných v medicíně. Fytochemikálie produkované v rostlinách jsou sekundárními látkami zodpovědnými za metabolické aktivity a k obranám účelům (Singh, 2006). Sekundární produkty mohou být definovány jako přírodní produkty obvykle rostlinného původu, které nepůsobí přímo na primární biochemické aktivity, jež podporují růst, vývoj a reprodukci organismu, ve kterém se nacházejí (Wijesekera, 1991).

Fytochemikálie vznikají specifickými biochemickými procesy, které se dějí uvnitř rostlinných buněk. Rozsah jejich působení je od lékařsky užitečných po smrtelné jedy. Řada fytochemikálií izolovaných z rostlinného materiálu je dnes používáno ve farmaceutickém průmyslu (Singh, 2006). Potenciál přírodních produktů je sotva prozkoumáný. I přes intenzivní výzkum pozemské flóry je odhadováno, že pouze 6% z přibližně 300 000 druhů vyšších rostlin bylo systematicky farmakologicky prozkoumáno a pouze 15% fytochemicky (Cechinel-Filho, 2012). Rostlinné sekundární metabolity jsou ohromně variabilní skupinou fytochemikálií díky jejich množství, strukturální různorodosti a rozšíření (Tiwari et al., 2013).

#### 3.1.3.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou velkou a komplexní skupinou chemických složek obsažených v rostlinách. Jsou rostlinnými sekundárními metabolity a mají důležitou roli jako látky ochranné (Saxena et al., 2013). Zahrnují různorodou skupinu molekul, jako jsou flavonoidy (flavony, anthokyany), stilbeny, tanniny, lignany a ligniny. Téměř 10 000 fenolů se nalézají v rostlinách. Některé jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, jiné jsou rozpustné ve vodě a další jsou velké nerozpustné polymery (de la Rosa et al., 2010).

Fenolické látky jsou chemickou skupinou obsahující hydroxylovou skupinou (-OH), kde je (-OH) navázán přímo na aromatický uhlíkový atom. Fenol ( $C_6H_5OH$ ) je považován za nejjednodušší v této skupině přírodních produktů (Saxena et al., 2013). Chemická rozličnost



fenolických látek odpovídá jejich různorodé roli v rostlině. Některé mají funkci mechanické podpory, zatímco další chrání rostlinu proti škodlivému ultrafialovému slunečnímu záření a excesivní ztrátě vody. Některé přitahují opylovače a šířitele semen, kdežto jiné slouží jako signály, které navodí obranné reakce proti biotickému či abiotickému stresu. Další z těchto látek mohou potlačit růst konkurenčních rostlin v okolí (de la Rosa et al., 2010). Jejich nejdůležitější funkcí může být ochrana rostliny proti býložravým predátorům a patogenům. Jako takové jsou aplikované při kontrole lidských infekcí způsobených patogeny (Doughari, 2012).

Fenoly lidem prokazují rozličné prospěšné vlastnosti a jejich antioxidační působení je důležité v určení jejich role jako ochranných činitelů proti procesům při nemocech, způsobených volnými radikály. Flavonoidy jsou největší skupinou rostlinných fenolů a také nejvíc studovanou (Saxena et al., 2013).

### **3.1.3.2 Flavonoidy**

Flavonoidy představují širokou oblast látek, které hrají důležitou roli v ochraně biologických systému proti škodlivému efektu oxidativních procesů v makromolekulách, jako jsou sacharidy, proteiny, lipidy a DNA (Saxena et al., 2013). Jsou důležitou skupinou polyfenolů hojně zastoupenou mezi rostlinami (Doughari, 2012). Základní strukturu flavonoidu tvoří dva aromatické kruhy, jeden z fenylalaninu a druhý z kondenzace tří malonových kyselin, spojené třemi uhlíky. Mezi hlavní čtyři skupiny flavonoidů patří anthokyany, flavony, flavonoly a isoflavony. Většinou se liší stupněm oxidace na třech uhlíkových vazbách (de la Rosa et al., 2010). Některé z nich jsou pigmenty vyšších rostlin (Doughari, 2012).

Anthokyany jsou barevné flavonoidy, které upoutávají zvířata, když je květina připravená k opylení nebo ovoce připravené k snědení (de la Rosa et al., 2010). Některé flavonoidy nacházející se v částech rostlin jsou člověkem normálně konzumovány (Saxena et al., 2013). Ukazuje se, že hrály důležitou roli v úspěchu lékařského ošetření v dávných dobách, a jejich použití přetrvalo dodnes (Saxena et al., 2013).

Flavonoidy získaly za poslední dobu pozornost díky jejich značné biologické a farmakologické aktivitě. U flavonoidů byly hlášeny projevy rozmanitých biologických vlastností zahrnující antimikrobiální, cytotoxickou, protizánětlivou stejně jako protirakovinovou aktivitu. Ale nejlépe popsanou předností téměř každé skupiny flavonoidů je jejich schopnost chovat se jako silné antioxidanty. Ty mohou chránit lidské tělo proti volným

radikálům (Saxena et al., 2013), a tím i proti kardiovaskulárním chorobám a rakovině (de la Rosa et al., 2010). Schopnost flavonoidů chovat se jako antioxidanty záleží na jejich molekulární struktuře (Saxena et al., 2013).

Nicméně k flavonoidům patří i jedovatý isoflavon rotenon. Zamezuje transportu elektronů v mitochondriích, a tím zamezuje dýchání u zvířat. Vyskytuje se v listech tropických luštěnin. Jiné luštěniny obsahují isoflavon, který napodobuje účinek estrogenu. Genistein je příklad isoflavonu se silnou estrogenní aktivitou (de la Rosa et al., 2010).

### 3.1.3.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou přirozeně syntetizovány velkým množstvím organismů, včetně zvířat, rostlin, bakterií a hub (Saxena et al., 2013). Jsou tvořeny jako sekundární metabolity z aminokyselin a obvykle jsou nositeli hořké chuti provázené toxicitou, která pomáhá zapudit hmyz a býložravce (de la Rosa et al., 2010). Alkaloidy jsou přírodní produkty obsahující heterocyklické atomy dusíku (Saxena et al., 2013). Mají zásaditý charakter a v reakcích jsou zásadité. Mění červenou barvu lakmusového papírku na modrou (Singh, 2006). Úroveň zásaditosti se značně liší v závislosti na struktuře molekuly a přítomnosti a umístění funkčních skupin (Doughari, 2012).

Většina alkaloidů obsahuje pyridin, quinoline a isoquinoline nebo základ tropanu. Postranní řetězce v alkaloidech jsou odvozeny z terpenů a acetátů (Singh, 2006). Reagují s kyselinami za tvorby krystalických solí bez vzniku vody (Doughari, 2012). Jsou snadno rozpustné v alkoholu a těžko rozpustné ve vodě. Soli alkaloidů jsou obvykle rozpustné ve vodě. V přírodě jsou alkaloidy součástí mnoha rostlin. Ve větší míře se vyskytují v semenech a kořenech, často v kombinaci s rostlinnými kyselinami (Singh, 2006).

Některé z prvních přírodních produktů izolovaných z léčivých rostlin byly alkaloidy. Tyto alkaloidy jsou používány jako lokální anestetika a stimulanty jako kokain (Saxena et al., 2013).

Výzkumy ukazují, že konzumace některých alkaloidů přináší zdravotní výhody. Například theobromin má silné diuretické, stimulační účinky a rozšiřuje cévy (de la Rosa et al., 2010). Další důležité alkaloidy rostlinného původu zahrnují doplňkové stimulanty kofein, nikotin, kodein, atropin, morfin, ergotamin a efedrin (Doughari, 2012). Alkaloidy jsou podstatným zdrojem farmaceutických drog. Je známo, že v zelených rostlinách existuje více než 12 000 alkaloidů a pouze pár z nich bylo využito k léčebným účelům (Singh, 2006).

### 3.1.3.4 Glykosidy

Glykosidy jsou obecně definovány jako produkty kondenzace cukrů, včetně polysacharidů, s množstvím odlišných variant organických hydroxylových látek, a to takovým způsobem, že hemiacetalní jednotka uhlovodíku musí být nezbytně součástí kondenzace (Doughari, 2012). Nalézají se v buněčné šťávě (Singh, 2006), jsou bezbarvé, krystalické podstaty, obsahují uhlík, vodík a kyslík. Některé jsou specifické obsahem dusíku a síry (Doughari, 2012). V reakcích jsou neutrální. Různí se svojí rozpustností ve vodě. Některé jsou rozpustné v éteru a alkoholu. Jsou opticky aktivní a levotočivé (Singh, 2006).

Chemicky se skládají ze sacharidu (glukózy) a ne-sacharidové části (aglykonu nebo geninu-necukerná složka heteroglykosidů). Aglykony jsou reprezentovány alkoholem, glycerolem a fenolem. Glykosid může být rychle hydrolyzován do sloučenin s enzymy a minerálními kyselinami (Doughari, 2012). Známým příkladem glykosidu je amygdalin v mandlích (Singh, 2006). Byl používán k léčbě rakoviny a také k útlumu kašle v rozličných preparátech (Doughari, 2012).

Glykosidy jsou skupinou drog obvykle podávanou pro povzbuzení apetitu a pomoc při zažívání. Jsou výhradně hořké podstaty a lze je běžně najít v rostlinách rodiny *Genitaceae*. Působení hořčinů na chuťové nervy má za následek zvýšení sekrece slin a žaludečních šťáv. Některé hořčiny jsou také užívány jako astringentní (svírající). Nadměrný příjem kyanogenních glykosidů může být fatální. Některé potraviny obsahující kyanogenní glykosidy mohou způsobit otravu (Doughari, 2012).

### 3.1.3.5 Saponiny

Saponiny jsou skupinou sekundárních metabolitů široce zastoupených v rostlinné říši (Saxena et al., 2013). Výraz saponin je odvozený od *Saponaria vaccaria*, rostliny, která je saponinů plná a dříve bývala používána jako mýdlo (Singh, 2006). Saponinům je vlastní "mýdlové" chování, ve vodě produkují pěnu (Doughari, 2012). Patří do skupiny glykosidů (Singh, 2006). Dělí se do dvou hlavních skupin, kterými jsou steroidní saponiny a triterpen saponiny (Doughari, 2012).

Saponiny jsou považovány za látky s vysokou molekulární hmotností, kde je molekula cukru ve spojení s triterpenem nebo steroidním aglykonem. Jsou rozpustné ve vodě a nerozpustné v éteru (Singh, 2006). Hydrolýzou z nich vznikají aglykony a saponiny. Saponiny jsou extrémně jedovaté, protože způsobují hemolýzu (rozpad červených krvinek), a jsou známy jako příčina otravy dobytka (Doughari, 2012).

U mnohých z nich se ví o jejich antimikrobiálním působení, schopnosti potlačit plíseň, a vlastnosti ochránit rostlinu před útoky hmyzu. Saponiny mohou být považovány za součást obranného systému rostliny, a jako takové patří mezi fytoanticipiny a fytoprotektanta, velké skupiny protektivních molekul rostlin (Saxena et al., 2013). Saponiny jsou důležité také terapeuticky, jelikož vykazují hypolipidemickou (snižování lipidů v krvi) a protirakovinovou aktivitu. Také jsou nezbytné pro činnost srdečních glykosidů. Dva hlavní typy steroidních saponinů jsou diosgenin a hekogenin. Steroidní saponiny jsou využívány v komerční produkci pohlavních hormonů ke klinickému užití. Například progesteron je derivovaný z diosgeninu (Doughari, 2012).

### **3.1.3.6 Taniny**

Taniny jsou široce rozšířeny v rostlinné říši (Singh, 2006). Jsou to fenolické látky o vysoké molekulární hmotnosti (Doughari, 2012). Zranění nebo infekce rostlinné tkáně může stimulovat syntézu a akumulaci těchto fenolických molekul na hodnotu, která může učinit rostlinu toxickou pro býložravce (de la Rosa et al., 2010). Taniny jsou různorodou skupinou fenolických látek se schopností tvořit vratné a nevratné komplexy s proteiny, polysacharidy, alkaloidy, nukleovými kyselinami, minerály atd. (Saxena et al., 2013). Taniny jsou rozpustné ve vodě a alkoholu a lze je nalézt v kořenech, kůře, stonku a vnějších vrstvách rostlinného pletiva (Singh, 2006).

Jsou dvě kategorie taninů: kondenzované a hydrolyzovatelné taniny. Polymerizace molekul flavonoidů vytváří kondenzované taniny, které jsou běžné v dřevnatých rostlinách. Hydrolyzovatelné taniny jsou také polymery, ale jsou více různorodou směsí fenolických kyselin a jednoduchých cukrů. Ačkoliv jsou široce rozšířeny, jejich nejvyšší koncentrace je v duběnkách a kůře dubů (de la Rosa et al., 2010). Taniny jsou v reakcích kyselých, to je znakem přítomnosti fenolické nebo karboxylové skupiny (Singh, 2006). Přítomnost fenolické skupiny je také důvodem použití taninů jako desinfekce (Doughari, 2012). Bylo zaznamenáno více zdravotních užitků z příjmu taninů a stanoveny některé epidemiologické souvislosti se snižující se frekvencí chronických chorob (Saxena et al., 2013). Léčivé rostliny bohaté na taniny jsou používány jako hojiví činitelé u množství nemocí. V Ajurvédě jsou směsi založené na těchto rostlinách užívány pro léčbu nemocí, jako je rinorea (silná rýma), leukorea (výtok z rodidel) a průjem (Doughari, 2012).

Taniny mají charakteristickou funkci ve vyčínění kůže (Singh, 2006). Při vyčínění jsou kolagenové proteiny navázány s fenolickou skupinou pro zvýšení odolnosti kůže vůči vodě, mikrobům a teplu (de la Rosa et al., 2010).

### 3.1.3.7 Terpeny

Termín terpeny pochází ze slova turpentine - terpentýn (lat. *balsamum terebinthinae*). Terpentýn, také zvaný "borovicová pryskyřice", je viskózní příjemně vonící balzám vytékající ze záseků nebo zářezu do kůry čerstvého dřeva různých druhů borovice (*Pinaceae*) (Tiwari et al., 2013). Tyto typy přírodních lipidů jsou široce rozšířeny a můžeme je najít v každé živé entitě (Saxena et al., 2013). Jsou to hořlavé nenasycené uhlovodíky existující v tekuté formě, která se běžně nachází v silicích a pryskyřici (Doughari, 2012).

Terpeny, také známé jako terpenoidy, jsou velkou skupinou přírodních produktů obsahující přibližně 36 000 terpenových struktur, ale jen velmi málo z nich bylo prozkoumáno z funkční perspektivy (Tiwari et al., 2013). Jsou odvozeny od 5C isoprenových jednotek (Saxena a kol., 2013). Obsahují uhlovodíky rostlinného původu v základní formě  $(C_5H_8)_n$  a jsou klasifikovány jako mono-, di-, tri-, tetra-, poly- a seskviterpeny v závislosti na počtu atomů uhlíku (Doughari, 2012).

Mnoho terpenoidů je komerčně zajímavých kvůli jejich využití jako dochucovadel a aromat v potravinách a kosmetice (mentol), nebo proto, že jsou důležité pro kvalitu zemědělských produktů, jako je chuť ovoce a vůně květin (linalol) (Saxena et al., 2013).

#### 3.1.3.7.1 Silice

Silice jsou tekuté směsi těkavých látek získaných z aromatických rostlin (Amorati et al., 2013). Jejich hlavními složkami jsou jednodušší mono- a sekviterpenoidy (Raaman, 2006). Ústní svědectví a tradiční použití rostlin jako léků poskytuje základ pro označení, které silice a rostlinné extrakty mohou být užitečné pro konkrétní zdravotní stav. Historicky bylo mnoho rostlinných olejů a extraktů, jako tea tree, myrta a hřebíček, používáno jako lokální dezinfekce nebo byly zaznamenány jejich antimikrobiální vlastnosti. Je důležité vědecky zkoumat tyto rostliny, které jsou používány v tradičním lékařství, jako potenciální zdroje nových antimikrobiálních látek (Hammer et al., 1999).

Chemie vysvětlující antioxidantivní aktivitu silic je diskutována spolu s analýzou potenciálu v ochraně potravin. Přidání silice do jedlých produktů, buď přímo smícháním nebo přidáním do aktivních obalů a jedlých povlaků, může tudíž představovat platnou alternativu k

prevenci autooxidace a prodloužení skladovací doby (Amorati et al., 2013). Použití silic jako přírodních antioxidantů je v poli rostoucího zájmu, protože některé syntetické antioxidanty, jako jsou BHA (butylhydroxyanisol – E320) a BHT (butylhydroxytoluen – E321) jsou nyní podezřelé z potenciální škodlivosti na lidské zdraví (Amorati et al., 2013).

Mnoho silic a rostlinných extraktů prokázalo antibakteriální a antimykotickou aktivitu. Nicméně pokud se rostlinné extrakty a silice budou používat pro konzervaci potravin a lékařské účely, bude třeba se zaměřit na problematiku bezpečnosti a toxicity (Hammer et al., 1999).

### **3.1.4 Léčebná aktivita**

Podle definice WHO (2000) se léčebná aktivita odvolává na úspěšnou prevenci, diagnózu a léčbu fyzických a mentálních nemocí, zlepšení symptomů nemoci, stejně jako prospěšnou změnu nebo regulaci fyzického a mentálního stavu těla.

Mechanismus působení fytochemikálií je rozličný. Můžou inhibovat mikroorganismy, zasahovat do některých metabolických procesů nebo můžou upravovat genovou expresi a dráhy signální transdukce. Fytochemikálie mohou být také použity jako chemoterapeutika nebo chemo-preventivní látky, které se odkazují na využití činitelů při potlačení, odvrácení nebo zpomalení vzniku nádoru. Rostlinné extrakty a silice mohou projevit rozdílné techniky působení proti bakteriálním kmenům. Níže jsou uvedeny některé specifické účinky (Doughari, 2012).

#### **3.1.4.1 Antioxidační působení**

Antioxidanty chrání buňky proti škodlivým efektům reaktivních forem kyslíku, jinak také nazývaných volné radikály, jako jsou singletový kyslík, superoxid, peroxylové radikály, hydroxylové radikály a peroxyinitrit (Doughari, 2012). Ty jsou produkovány buňkami živých organismů jako výsledek patofyziologických a biochemických procesů v reakci na faktory, jako jsou radiace, chemikálie, toxiny a látky znečišťující životní prostředí. Prooxidanty hledají stabilitu díky elektronovému párování s biologickými makromolekulami, jako jsou proteiny, lipidy a DNA. Toto vede k oxidativnímu stresu ve fyziologickém systému. Tyto účinky navíc vedou k peroxidaci lipidů stejně jako k poškození proteinů nebo DNA nebo obojího v buňkách lidského těla. Kromě toho poškození buněk následně vede k stárnutí a různým chronickým onemocněním, jakými jsou diabetes, rakovina, atheroskleróza, stejně jako kardiovaskulární, zánětlivé a jiné degenerativní nemoci u lidí (Al-Abd et al., 2015).

Volné radikály vytvořené v těle mohou být odstraněny přirozenou antioxidační obranou těla, které se účastní katalázy nebo glutathion. Lidské tělo ale produkuje nedostačující množství antioxidantů, které jsou esenciální pro prevenci oxidačního stresu. Proto tento nedostatek musí být kompenzován použitím přirozených vnějších antioxidantů (Doughari, 2012). Schopnost některých fytochemikálií potlačit nebo pozdržet oxidaci jiných molekul díky potlačení spuštění nebo šíření oxidační řetězové reakce je dělá platnými alternativami v komplementární medicíně. Tyto přirozeně se vyskytující antioxidační chemikálie jsou hlášeny jako složky fenolických (flavonoidy, fenolické kyseliny, tokoferoly) a dusíkatých látek (alkaloidy, deriváty chlorofylu, aminy a aminokyseliny), stejně jako karotenoidů a kyseliny citrónové (Al-Abd et al, 2015).

Antioxidanty jsou často přidávány do potravin jako prevence oxidační řetězové reakce způsobené radikály. Z důvodů opatrnosti týkající se použití syntetických látek se potravinářský průmysl zaměřil na nalezení přírodních antioxidantů, kterými by je nahradili. Navíc se u spotřebitelů objevuje vzrůstající trend preferovat přírodní antioxidanty. Tyto poznatky poskytují potřebnou motivaci pro objevování jejich přirozených zdrojů (Doughari, 2012).

#### **3.1.4.2 Antimikrobiální aktivita**

Fytosložky používané rostlinami k jejich ochraně proti patogennímu hmyzu, bakteriím, plísním a prvokům našly svoje uplatnění i při léčbě lidí (Doughari, 2012). Nejdůležitější z těchto bioaktivních látek jsou alkaloidy, flavonoidy, taniny, fenolické látky, steroidy, pryskyřice, mastné kyseliny a gumy. Tyto jsou zodpovědné za vytváření určitého fyziologického účinku na tělo (Dahiya et Purkayastha, 2012). Některé fytochemikálie jako fenolické látky jednají esenciálně tím, že pomáhají v redukci specifické přilnavosti organismů na buňky vyplňující močový měchýř, což nakonec snižuje incidenci infekcí močového traktu (Doughari, 2012).

Problém resistance na antibiotika (ATB) požaduje, aby bylo realizováno obnovené úsilí o prověření různých léčivých rostlin pro jejich potenciální antimikrobiální vlastnosti. Infekční nemoci způsobené resistantními mikroorganismy jsou spojovány s dlouhotrvající hospitalizací, zvýšením nákladů a větším rizikem morbidit a mortality. Rezistence je obzvláště závažný problém pro lidi se zhoršeným imunitním systémem, jako jsou lidé s AIDS, onkologičtí pacienti a příjemci transplantovaných orgánů (Dahiya et Purkayastha, 2012). Rostliny také mohou projevat bakteriostatické a baktericidní působení na mikroby



(Doughari, 2012). Další hnací faktor, který podnítl vědce k hledání nových antimikrobiálních látek z rozličných zdrojů, léčivé rostliny nevyjímaje, je rychlý spád vymírání rostlinných druhů (Dahiya et Purkayastha , 2012).

Za zmínku stojí, že výsledky antimikrobiální aktivity stejné části rostliny se většinou liší vědec od vědce. Toto se děje pravděpodobně proto, že koncentrace rostlinných složek stejného orgánu rostliny se mohou odlišovat od jedné geografické polohy po jinou v závislosti na věku rostliny, rozdílech v topografických faktorech, koncentraci živin v půdě, metodě extrakce, stejně jako metodě použité k antimikrobiálnímu zkoumání (Doughari, 2012).

### **3.1.4.3 Antikarcinogenní účinky**

Rakovina je komplikovaný chorobný stav postihující obyvatele vyspělých i rozvojových zemí a je hlavním problémem veřejného zdravotnictví (Cechinel-Filho, 2012). Vývoj rakoviny je dlouhotrvající, vícestupňový proces zahrnující vzrůstající řadu molekulárních dějů. Začíná poškozením DNA v jediné dělící se buňce. Buňky, které za sebou mají první krok iniciace a pokračují v násobném dělení, jsou stále více náchylné k dalším mutacím vedoucím k stále více abnormálnímu fenotypu. Ten postupně získá schopnost putovat do dalších tkání a založit druhotný nádor (Tiwari et al., 2013).

Bylo zjištěno, že rostlinné látky působí ve všech třech krocích fenoménu karcinogeneze. Těmi jsou iniciace, promoce a progresse. Kromě toho bylo zjištěno, že jednájí jako blokovací činitelé (t.j. zamezením karcinogenům v dosažení cílového místa, stejně jako tlumením metabolické aktivace) i jako potlačující činitelé, (t.j. zamezením maligní transformace zasažených buněk v obou fázích promoce nebo progresse). Třebaže se za tímto účelem používá pouze relativně malé množství chemopreventivních látek jako drog předepisovaných, je oblast syntetických a v přírodně se vyskytujících látek s chemopreventivním potenciálem, reprezentovaná rozličnými typy struktur a mechanismy účinku, rozsáhlá (Cechinel-Filho, 2012).

Zejména polyfenoly jsou rozmanitými fytochemikáliemi, které mají potenciál v inhibici karcinogeneze. Fenolické kyseliny obvykle signifikantně minimalizují utváření specifických rakovinu podněcujících nitroaminů z potravinových nitritů a nitrátů. Indol-3-karbinol, nejpodstatnější a nejdůležitější indol přítomný v brokolici, specificky inhibuje lidský papiloma virus (HPV), který může způsobit rakovinu dělohy. Fytosteroly blokují rozvoj nádorů ve střevě, prsou a prostatických žlázách (Doughari, 2012).



### 3.1.5 Současný přístup

Podle WHO (1999) se během posledních desetiletí stal systém tradičního léčitelství tématem celosvětového významu. Současné odhady naznačují, že v mnohých rozvojových zemích velká část populace spoléhá na tradiční léčitele a léčivé rostliny při potřebě primární péče. Ačkoliv moderní medicína může být v těchto zemích dostupná, rostlinné léčitelství si často udržuje popularitu z historických a kulturních důvodů. Současně se mnoho lidí v rozvojových zemích obrací na alternativní nebo doplňkovou terapii, včetně léčivých rostlin. Nemnoho rostlinných druhů, které skýtají léčivé rostliny, bylo vědecky zhodnocených jako možné pro lékařské užití.

Data o účincích a bezpečnosti jsou dostupná u ještě méně rostlin, jejich extraktů, aktivních složek a přípravků, které je obsahují. Navíc ve většině zemí je trh s přírodními léčivy jen slabě regulován a rostlinné produkty nemají často ani registraci nebo nejsou kontrolovány. Zajištění bezpečnosti, kvality a účinků léčivých rostlin a rostlinných produktů se nyní stává klíčovým tématem v rozvojových zemích i industrializovaném světě. Oba, běžný uživatel i profesionál ve zdravotní péči, potřebují aktuální a spolehlivé informace o bezpečnosti a účincích léčivých rostlin (WHO, 1999).

## 3.2 Světlík lékařský (*Euphrasia rostkoviana*)

Světlík lékařský (*Euphrasia rostkoviana*), jinak také očanka nebo ambrožka (Hudak, 2014), patří do čeledi krtničkovitých (*Scrophulariaceae*) (Janča a Zentrich, 1996). Jeho obvyklým stanovištěm jsou vlhčí louky, od nížin až po louky horské (Čihař a kol., 2002). Je to poloparazit na travinách, který může svojí potřebu vody a živin pokrýt pomocí hostitelských kořenů (Lippert a Podlech, 2002). Rostlina dosahuje výšky až 30 cm a kvete v červenci a srpnu (Korbelář a Endris, 1985) (Obrázek 1).

### 3.2.1 Tradiční použití

Pro léčebné účely se sbírá kvetoucí nat', která obsahuje různé látky, mezi něž patří flavonoidy (apigeningalaktosid, luteolingalaktosid aj.), iridoidní monoterpeny (veronikosid, aukubin, katalpol, eufrosid, eurostosid aj.), deriváty kyseliny kávové (eukovosid), lignany (dehydrokoniferyl-glukosid) a trísloviny (Jahodář, 2010). Korbelář a Endris (1985) radí nat'

usušit ve svazečcích zavěšených ve stínu tak, aby si květy zachovaly barvu a listy zůstaly zelené. Teplota při sušení by neměla přesáhnout 35°.

Jako vhodnou formu přípravy pro vnitřní užití doporučují Janča a Zentrich (1996) krátkodobě (2 min) vařený odvar, případně tinkturu nebo podávání drogy v prášku. Hudak (2014) a Hermann (2007) popisují přípravu nálevu za použití vařící vody. K zevnímu užití lze kromě nálevu a odvaru využít i možnost obkladu naplněného spařenou natí rostliny (Dugasová, 2002).



**Obrázek 1:** *Euphrasia rostkoviana* Hayne  
(Zdroj: <http://carozahrady.sk/liecivebylinky/ociankarostkovova.html>)

V různých herbářích a knihách věnovaných bylinné léčbě popisují autoři různé příznivé účinky světlíku lékařského (*Euphrasia rostkoviana*) na lidský organismus. Hermann (2007) uvádí, že bylinu lze použít jako pomocný prostředek při problémech se zažívacím ústrojím, jako je například nechutenství, nebo při zvýšené tvorbě žaludečních kyselin. Jahodář (2010) zmiňuje použití světlíku lékařského (*Euphrasia rostkoviana*) také při alergiích, alergické rýmě, zánětech horních cest dýchacích, kašli, při bolestech uší, bolestech hlavy aj. Janča a Zentrich (1996) uvádějí jako jeho další schopnost snížení krevního tlaku.

Všichni zmínění autoři se shodují na tom, že světlík lékařský (*Euphrasia rostkoviana*) má blahodárné účinky na rozličné oční obtíže, ať už se jedná o zánět spojivek (Jahodář, 2010), zánět očních víček (Hermann, 2007), slzení očí a oční únavě (Korbelář a Endris,

1985), při tvorbě ječného zrna (Dugasová, 2002) či při šedém zákalu, v kombinaci s listem lesního maliníku (Janča a Zentrich, 1996).

### 3.2.2 Aktuální využití

Na trhu jsou běžně dostupné produkty, u kterých výrobci uvádí jako jejich součást světlík lékařský, převážně ve formě extraktů z *Euphrasia officinalis*, příbuzné *Euphrasia rostkoviana* (Obrázek 2). Jedná se například o oční kapky OCUflash a OCUflash blue, obojí od Unimed Praha. V příbalovém letáku se můžeme dočíst, že extrakt je z *Euphrasia officinalis* a působí protizánětlivě, dezinfekčně a adstringentně. V očních kapkách HYLO<sup>®</sup>-FRESH je kromě tinktury z *Euphrasia officinalis* také hyaluronát sodný. Výrobce Ursapharm uvádí, že kapky by měly zmírňovat podráždění očí a syndrom tzv. suchého oka.



**Obrázek 2:** Oční kapky s extrakty z *Euphrasia officinalis*

Dalším typem produktů jsou oční gely, které se nanášejí na kůži v okolí očí a na oční víčka (Obrázek 3). Optogel je od firmy Topvet. Výrobce zmiňuje vysoký obsah světlíku lékařského (*Euphrasia Officinalis*), ale ne jeho konkrétní množství nebo formu. Gel by měl pomoci při únavě a pocitu pálení očí. Česká společnost Nobilis Tilia vyrábí oční gel Euphrasia s extraktem z *Euphrasia Officinalis*. Jako jeho účinky jsou uváděny zchlazující a zklidňující efekt na pleť okolo očí. Oční gel od firmy Armedica také obsahuje extrakt z *Euphrasia officinalis*. Mezi jeho účinky by mělo patřit snižování nebezpečí otoků a pálení očí. Firma Paves vyrábí zklidňující gel s obsahem světlíku lékařského, neuvádí konkrétní druh/kmen použité byliny. Gel by měl podle přiložených informací zklidňovat oči citlivé na světlo, omezit slzení a zmírnit otoky. Také by měl pomoci při začínajících zánětech oka a jeho okolí.



**Obrázek 3:** Oční gely s extrakty z *Euphrasia officinalis*

### 3.3 Infekce a mikroorganismy

### 3.4 Mikrobiální flóra

Za normálních okolností je lidský plod (fetus) sterilní (Hamplová a kol., 2015). Neprodleně po narození je kolonizován nesčítelnými mikroorganismy (Bennett et al., 2015). Již při průchodu novorozence porodními cestami začíná jeho mikrobiální kolonizace díky vystavení mikrobiální flóře vagíny. Dítě si během krátkého času utvoří vlastní normální mikrobiální flóru (NMF). Tou označujeme společenství mikrobů, kteří osidlují vnější a vnitřní povrchy zdravých lidí a zvířat. Změny NMF se odvíjí od životního stylu jedince, jeho věku a prostředí, které ho obklopuje (Hamplová a kol., 2015). Výsledkem kolonizace je organizované společenství, které funguje jako živoucí celek, ve kterém mikrobiální symbionti početně převyšují lidské buňky desetkrát.

Koevoluce, koadaptace a kodependence jsou charakteristiky našich vztahů s naší přirozenou mikroflórou. Lidská mikroflóra usnadňuje získávání živin a energie z potravy, podporuje postnatální diferenciaci slizničních struktur a jejich funkcí a stimuluje oběpřirozenou a adaptivní imunitu (Bennett et al., 2015).

### **3.5 Vztahy mezi organismy**

Vztahy mezi mikroorganismy a hostitelem lze rozdělit na symbiotické, komenzální a patogenní (Marcela a kol., 2006).

### **3.6 Symbiotické**

Vzájemné soužití dvou rozdílných organismů, ze kterého má alespoň jeden ze zúčastněných organismů prospěch, se nazývá vztah symbiotický. Jejich podíl na evoluci živých systémů je významný. Na základě symbiotických vztahů byly do organismů vneseny některé nové obranné mechanismy, metabolické dráhy a v určitých případech došlo k vytvoření nových tkání nebo byla umožněna změna jejich funkce a rozsahu (Marcela a kol., 2006).

### **3.7 Komenzální**

Sdílení totožného prostoru dvěma různými organismy, kdy není zjevné poškození nebo prospěch druhého zúčastněného, se nazývá vztah komenzální (Marcela a kol., 2006).

Organismům se říká komenzálové a jsou součástí NMF těla zdravého hostitele. Můžeme je nalézt jak na kůži, tak na sliznicích horních dýchacích cest, střev a také pochvy (Greenwood a kol., 1999).

Existence komenzálů v dané lokalitě je závislá na fyziologických faktorech, vlhkosti, teplotě a inhibičních a nutričních faktorech (Hamplová a kol., 2015). Za normálních okolností komenzálové neproniknou do krve nebo tkání, většinou jsou tedy neškodní. Ale za určitých okolností, kdy svojí roli může hrát například snížená obranyschopnost jedince, mohou do organismu proniknout a způsobit onemocnění. Proto se označují jako podmíněně patogenní (Greenwood a kol., 1999). Nemoci, které vyvolává NMF, se nazývají oportunní infekce (Hamplová a kol., 2015).

### 3.8 Patogenní

Na rozdíl od komenzálního vztahu u patogenního vztahu je zjevný prospěch jednoho organismu na úkor druhého. Výsledkem tohoto vztahu je poškození nebo smrt jednoho ze zúčastněných (Hamplová a kol., 2015). Patogen je obvykle definován jako jakýkoliv mikroorganismus, který má schopnost způsobit nemoc. Ne všechny patogeny mají stejnou pravděpodobnost způsobit klinicky zjevné choroby (Bennett et al., 2015). Schopnost určitého mikroorganismu vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele se nazývá patogenita (Bednář a kol., 1996). Virulence poskytuje kvantitativní měření patogenity nebo pravděpodobnosti způsobit nemoc. Faktory virulence se týkají vlastností, které umožňují mikroorganismu uchytit se a replikovat na nebo ve specifických hostitelských druzích a které zvyšují potenciál mikrobů způsobit zjevnou patologii. V mnoha ohledech to, co my nazýváme faktory virulence, jsou v biologickém smyslu faktory kolonizace, které dovolují replikaci v hostovi a následný přenos na nového vnímavého hosta. Rozdíly mezi komenzály, oportunisty a patogeny mohou být během času setřeny. Někteří komenzálové způsobují nemoci, třebaže většinou u imunokompromitovaných hostů, a někteří z nejméně obávaných patogenů mohou v člověku přežívat po celý život bez způsobení symptomů nemoci (Bennett et al., 2015).

### 3.9 Obrana organismu

Organismus má svoje přirozené bariéry, které ho chrání. Lze je rozdělit na mechanické, chemické a imunologické. Mechanické bariéry mají za úkol zabránit uchycení potenciálních infekčních agens a jejich proniknutí do buňky. Nepoškozená kůže slouží jako primární ochrana proti infekci. Mikroorganismy neproniknou její vnější vrstvou keratinizovaných buněk a epidermis a při odloučení keratinizovaných buněk jsou organismy odstraněny a tím je kůže zbavena kontaminace. Kontakt patogenu se sliznicemi zabraňuje hlenová vrstva, kterou jsou sliznice pokryty. Pohyb řasinek řasinkového epitelu horních cest dýchacích pomáhá vyloučit mikroorganismy, které do dýchacích cest pronikly. Také další fyziologické funkce, jako je průjem, zvracení, kýchání a kašláni fungují jako účinné mechanismy k zbavení se velkého množství bakterií. Mikroby se z těla vylučují i normálním dýcháním, pocením a vyměšováním.

V součinnosti s mechanickými bariérami jsou bariéry chemické, které zvyšují obranyschopnost organismu. Jejich účinné části jsou kyselé pH různých fyziologických sekretů a také lysozom. Enzym, který může ničit buněčné stěny bakterií. Je obsažen v slinách, slzách a sekretech sliznic.

Na úrovni buněčné a humorální chrání organismus bariéry imunologické. Tyto obranné mechanismy zkoumá imunologie (Hamplová a kol., 2015).

### **3.10 Infekce a infekční nemoci**

Infekce je proces spojený s invází mikrobů do těla (Greenwood a kol., 1999) a jejich prokázání na nebo uvnitř hostitele. Termín infekční choroba se aplikuje, pokud interakce s mikrobem působí újmu hostiteli a asociované poškození nebo pozměněná fyziologie má za následek symptomy nemoci a klinické příznaky (Bennett et al., 2015). Pokud je lidský organismus zdravý, je vůči většině infekcí rezistentní. Jen v případě, že je vystaven silně virulentnímu mikroorganismu, onemocní (Hamplová a kol., 2015). Jako infekční nebo nakažlivé se označují nemoci přenosné z člověka na člověka (Greenwood a kol., 1999).

Pokud se infekce vyskytne víc frekventovaně, než je obvyklé, jedná se o epidemii, pokud je rozložení celosvětové, jedná se o pandemii. Endemické infekce jsou v malém množství konstantně přítomny ve specifické populaci. Kromě infekcí, které končí zjevnými symptomy, je jich mnoho inaparentních nebo subklinických. Některé infekce přetrvávají v latentním stavu, po kterém může nastat reaktivace růstu mikroorganismů a návrat symptomů. Některé infekce se stanou chronickými, kdy mikroorganismus pokračuje v růstu, a to s nebo bez symptomů na hostiteli. Nositelé chronických infekcí jsou důležitými zdroji přenosu infekce na druhé (Levinson, 2014).

Za zmínku stojí infekce získané v nemocnici nebo-li nozokomiální infekce, které nebyly přítomny nebo se neinkubovaly při přijetí pacienta do nemocnice. Tyto infekce mohou být diagnostikovány u pacientů, kteří se zdáli být bez známek a symptomů infekce při přijetí, a poté u nich dojde k jejímu rozvinutí, například vylučování hnisu z ran po chirurgickém zákroku (WHO, 2001).



### **3.11 Infekce očí**

Mnoho očních infekcí rychle ohrožuje vidění, pokud nejsou včas diagnostikovány a léčeny. Pacienti při většině typů očních infekcí nemají systémové příznaky infekce a většinou se cítí kromě očí v pořádku. Výjimku tvoří pacienti s endogenní endoftalmitidou, některými typy uveitid a orbitálními infekcemi. Dokonce i pacienti s tímto typem očních infekcí mohou být afebrilní a s normálním počtem bílých krvinek (Bennett et al., 2015). Vždy se snažíme určit co nejpřesněji etiologii patologického procesu, aby mohla být zahájena kauzální léčba (Rozsival a kol. 2003). Infekce očí dělíme na konjunktivitidy, keratitidy, endoftalmitidy, uveitidy a periorbitální infekce (Bennett et al., 2015).

#### **3.11.1.1 Konjunktivitida**

Konjunktivitida je charakteristická podrážděním očí s pocitem diskomfortu, ale ne signifikantně bolestí, pokud ovšem není přidruženo postižení rohovky. Poté se jedná o keratokonjunktivitidu, která může vést k zjizvení rohovky (Bennett et al., 2015).

#### **3.11.1.2 Keratitida**

Keratitida se týká zánětu rohovky. Společně s rozprostřeným slzným filmem rohovka poskytuje 65%-75% refrakční síly oka. Keratitida tak obvykle způsobuje zhoršené vidění. Rohovka nemá cévy, ale má mnoho nervových zakončení, a tak je keratitida typicky bolestivá (Bennett et al., 2015).

#### **3.11.1.3 Endoftalmitida**

Endoftalmitida odkazuje na bakteriální nebo houbovou infekci uvnitř oka zahrnující sklivce nebo komoru nebo oboje. Infekce mohou být zaneseny exogenně, třeba po traumatu nebo chirurgickém zásahu do oka, nebo endogenně, z bakteriální a houbové flóry, která oko osidluje. Za zmínku stojí, že endoftalmitida neslouží jako zdroj bakterémie a fungémie (Bennett et al., 2015).

#### **3.11.1.4 Uveitida**

Uveitida odkazuje na zánět vnitřní části oka (duhovka, řasnaté těleso, cévnatka) nebo sítnice. Většina případů je idiopatických nebo spojených s revmatologickými stavy (Bennett et al., 2015).



### 3.11.1.5 Periorbitální infekce

Periorbitální infekce jsou ty, které postihují měkké tkáně obklopující oblouk oka (Bennett et al., 2015).

## 3.12 Patogeny vyvolávající infekce očí

Infekční záněty oka mohou být vyvolány bakteriemi, viry, parazity, houbami či chlamydiemi. *Staphylococcus aureus* se v oftalmologii nejčastěji skloňuje jako původce konjunktivitid, keratitid, dakryocystitid, pooperačních a poúrazových endoftalmitid. V současné době je většina jeho kmenů (kolem 80%) rezistentních na penicilin. *Staphylococcus epidermidis* napadá oslabené pacienty a je tak typický oportunní patogen. Je součástí běžné mikroflóry spojivkového vaku lidského oka a může vyvolat zánět rohovky. Oční lékaři se s enterokoky setkávají jako s původci bakteriálních keratitid. Zejména u nozokomiálních kmenů narůstá rezistence na antibiotika. *Pseudomonas aeruginosa* je nejčastějším gramnegativním organismem izolovaným z rohovkových vředů. U osob užívajících kontaktní čočky často způsobuje keratitidy. Adheruje velmi dobře k porušenému epitelu a rychle proniká rohovkou. S *Escherichie coli* se v oftalmologii nejčastěji setkáváme jako s původcem keratitidy u osob, které používají kontaktní čočky (Rozsival a kol. 2003). *Candida albicans* je normálním lidským komenzálem, může infikovat téměř každý orgán a téměř všechny typy prostetických materiálů. Oko patří mezi orgány, které jsou nejběžněji infikovány prostřednictvím diseminace (Bennett et al., 2015).

## 3.13 Bakterie

### 3.13.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je gram+ kok. Koky jsou uspořádány do shluků, obvykle netvoří pouzdro, jsou nepohyblivé a nesporulující (Greenwood a kol., 1999). Řadí se mezi bakteriální druhy s největší biologickou aktivitou. Tvoří řadu toxinů, komplexních látek buněčné stěny a exoenzymů (Bednář a kol., 1996), například koagulázu a katalázu (Levinson, 2014). Mnohé z látek, které produkuje, se uplatňují jako faktory virulence (Bednář a kol., 1996).

Nosiči bakterie tvoří asi 30% zdravých lidí (Greenwood a kol., 1999). Nejčastější místo výskytu je lidský nos nebo kůže. Je jednou z nejběžnějších příčin infekcí u člověka (Levinson, 2014) a je zodpovědný jak za povrchové, tak hluboké infekce (Bennett et al., 2015).

Nejčastěji infikuje místa se sníženou rezistencí, kterými jsou například poškozená kůže, sliznice a tkáňové hematomy (Greenwood a kol., 1999). Predispoziční faktory, které mohou významně napomoci k infekci, jsou úrazy, diabetes, chirurgický zákrok, zavedený katetr, umělá náhrada, porucha imunity nebo maligní onemocnění. Více ohroženou skupinou jsou také předčasně narozené děti, kojenci a staří lidé (Bednář a kol., 1996).

*S.aureus* způsobuje abscesy mnoha orgánů, endokarditidy, osteomyelitidy, zánětlivé artritidy a impetigo. Také nemocniční nákazy, jako jsou pneumonie, infekce ran po chirurgickém zákroku a sepse. Mezi nemoci způsobené vyprodukovaným exotoxinem patří gastroenteritida a syndrom toxického šoku (Levinson, 2014). Je často rezistentní na methicilin a jako původce nozokomiálních nákaz je velkým problémem pro zdravotnictví (Bennett et al., 2015).

### **3.13.2 *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* je gram+ kok, koky se uskupují do shluků (Greenwood a kol., 1999). Není schopen koagulovat plazmu, ale produkuje katalázu (Levinson, 2014). Je významnou částí normální komenzální flóry lidské kůže (Bennett et al., 2015). Dominantně se vyskytuje na obličeji, končetinách, v axilách a inguinální krajině, v interdigitálních prostorech, na perineu a na sliznici nosohltanu. Patří k typicky oportunním patogenům, napadá pacienty, kteří jsou oslabeni po těžkém úrazu, chirurgickém zákroku, jsou popáleni nebo mají poruchu imunitního systému (Bednář a kol., 1996).

Na jeho patogenitě se podílí tři základní faktory. Protože je lidská kůže jeho normálním místem výskytu, má přístup k jakémukoliv nástroji nebo zařízení vloženému do nebo procházejícím skrz kůži. Také má schopnost adherovat k biomateriálům a vytvořit biofilm. Dalším nápomocným faktorem jsou změny v populaci lidských hostitelů vyúsťující ve větší množství imunosupresivních pacientů a větší používání bioprotetických zařízení (Bennett et al., 2015). Ty samotné jsou důležitým predispozičním faktorem vzniku infekce. Cizí těleso, jedná se především o předměty z umělých hmot, jako jsou katetry, umělé chlopně a klouby, může být zdrojem infekce v organismus a může vyústit v endokarditidu, sepsi, endoflamitidu, meningitidu nebo infekci močových cest. Většinou jsou tato onemocnění

způsobená patogenem získaným v nemocničním prostředí. Mikroby, které se účastní těchto nozokomiálních nákaz, jsou zpravidla multirezistentní k ATB (Bednář a kol., 1996).

### **3.13.3 *Enterococcus Faecalis***

*Enterococcus Faecalis* je gram+ kok, který neprodukuje katalázu. Shlukuje se ve dvojicích a krátkých řetězcích. Je odolný k vysokému pH 8,5 a má schopnost růstu v hypertonicém roztoku 6,5% NaCl. Tvoří důležitou součást normální mikrobiální flóry tlustého střeva. Lze ho najít i v genitálním traktu a tenkém střevě. V horních cestách dýchacích se vyskytuje výjimečně (Bednář a kol., 1996).

Způsobuje infekce močových cest, sepse, endokarditidy, peritonitidu, hnisavé infekce v dutině břišní a infekce žlučových cest (Greenwood a kol., 1999). Populace *E.faecalis* je v menšině oproti anaerobním komenzálům GIT zdravého hostitele. Toto se mění v případě použití ATB. *E.faecalis* je přirozeně tolerantní k množství antimikrobiálních látek. To mu při použití ATB, které eradikují ostatní soutěžící mikroorganismy, dává výhodu při jeho kolonizaci střev. Dominance enterokoků v GIT hospitalizovaných pacientů po podání ATB se ukázala být předpovědí pozdější infekce krevního oběhu u imunokompromitovaných pacientů (Bennett et al., 2015).

Jakkoliv nejfrekventovanější jsou infekce žlučového a močového traktu (Levinson, 2014). U nozokomiálních infekcí močového traktu jsou enterokokové dokonce jednou z předních příčin vzniku infekce (Bennett et al., 2015). U těchto nemocničních kmenů narůstá rezistence na ATB (Bednář a kol., 1996).

### **3.13.4 *Escherichie coli***

*Escherichie coli* je gram- tyčka se schopností fermentovat laktózu (Levinson, 2014). Je nejběžnějším druhem fakultativního anaeroba nacházejícího se v lidském GIT a nejběžněji potkávaný patogen z rodiny enterobakterií (Bennett et al., 2015). Díky fekálnímu znečištění se dostává do vody, kde může žít i řadu týdnů. Používá se tak jako indikátor pro zjištění fekální kontaminace vody (Bednář a kol., 1996).

Vzhledem k hostiteli jsou kmeny *E.coli* rozmanité. Mohou se chovat jako komenzálové, ale někteří působí jako specifické patogeny díky různé kombinaci faktorů virulence, a to ve střevě i mimo něj (Greenwood a kol., 1999). Nejběžnějšími nemocemi, které vyvolávají, jsou infekce močového traktu, sepse, novorozenecká meningitida a cestovatelský průjem (Levinson, 2014). Podle mechanismů, kterými patogenní *E.coli* působí v

GIT, se dělí na enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC), enterohemoragické (EHEC) (Bednář a kol., 1996).

### 3.13.5 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* je gram- tyčka s velkou polysacharidovou kapsulí (Levinson, 2014). Nachází se v dýchacích cestách, GIT, ve vodě a v půdě (Bednář a kol., 1996). Jako primární patogen je schopná způsobit infekce močového traktu, jaterní abscesy a pneumonie u jinak zdravých lidí. Nicméně většina nemocí, které působí, vzniká u oslabených jedinců a nebo v nemocničním prostředí (Bennett et al., 2015). Často kolonizuje dýchací cesty pacientů na jednotkách intenzivní péče a u imunodeficientních osob způsobuje infekce močových cest a bronchopneumonie (Bednář a kol., 1996). Kromě toho *K.pneumoniae* působí nozokomiální infekce zahrnující infekce ran, infekce nitrocévních a jiných invazivních zařízení, infekce žlučového traktu, zánět pobřišnice a meningitidu (Bennett et al., 2015). Nozokomiální infekcí jsou postihnuty hlavně jednotky intenzivní péče a novorozenecká oddělení. Patogen může u novorozenců vyvolat hnisavou meningitidu a sepsi (Bednář a kol., 1996).

### 3.13.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je gram- aerobní bakterie (Bennett et al., 2015), která produkuje oxidázu a nefermentuje (Levinson, 2014). Osidluje různá prostředí včetně půdy, vody, rostlin, hmyzu a zvířat (Bennett et al., 2015).

Pseudomonády jsou schopné růst ve vodě obsahující pouze stopy živin. Toto pomáhá jejich perzistenci v nemocničním prostředí (Levinson, 2014). Ve zvláště kontaminovaném prostředí může i u zdravého člověka dojít ke kolonizaci, ale bez následného vzniku onemocnění. U hostitelů se sníženou schopností obrany dochází nejčastěji ke kolonizaci sliznic močového a respiračního traktu. Mezi faktory, které podporují vznik onemocnění, patří podávání kortikoidů, imunosupresiv, cytostatik a dlouhodobé podávání ATB, rozsáhlé popáleniny, diabetes, defekty fagocytózy, maligní procesy, těžké operace a dlouhodobé zavedení katetrů. Ohroženou skupinou jsou novorozenci, především ti předčasně narození, u kterých se může rozvinout sepse, meningitida nebo enterokolitida (Bednář a kol., 1996). *P.aeruginosa* je schopná infikovat kterékoliv místo na povrchu těla, stejně jako jakýkoliv orgán. Pokud vzniknou infekce mimo nemocnici, bývají povrchové, probíhají mírně a většinou jsou chronické povahy. Pseudomonádové infekce jsou častější u hospitalizovaných pacientů. Mají těžší průběh a většinou jsou lokalizované. Například infekce oka, infikované

proleženiny, popáleniny, bércové vředy a katérová močová infekce (Greenwood a kol., 1999).

*P.aeruginosa* je jedním z nejfrekventovanějších patogenů účastnících se nozokomiálních infekcí (Bennett et al., 2015). Kmeny, které tyto infekce vyvolávají, jsou většinou vysoce virulentní (Bednář a kol., 1996) a jejich rezistence proti antimikrobiálním působkům rychle stoupá (Bennett et al., 2015).

### 3.14 Kvasinky

#### 3.14.1 *Candida albicans*

*Candida albicans* je gram+ , růstově málo náročná kvasinka (Bednář a kol., 1996). Lze ji hojně nalézt v přírodě po celém světě a také je lidským komenzálem (Bennett et al., 2015) jako součást NMF kůže, mukózních membrán a gastrointestinálního traktu (Levinson, 2014). V člověku je normálně nepatogenní, dokud nejsou hostitelovy obranné mechanismy oslabeny (Bennett et al., 2015).

Organismy z rodu *candida* jsou na celém světě známy jako půdci systémových a povrchových mykóz (Bednář a kol., 1996). *C.albicans* je původcem 80-90% všech kandidóz. Povrchová kandidóza postihuje nehty, kůži a sliznice pochvy a úst. S věkem se frekvence nosičství zvyšuje. Četnější je v pochvě také během těhotenství (Greenwood a kol., 1999). Pokud při nějakém závažnějším stavu komenzálové přerostou, vzniká systémová kandidóza. Na převládnutí kandid se podílí několik faktorů, mezi něž se řadí imunosuprese po chirurgickém zákroku, jakým je srdeční operace nebo transplantace a také léčba steroidy nebo ATB. *C.albicans* může infikovat téměř každý orgán a téměř všechny typy prostetických materiálů (Bennett et al., 2015). Nejběžnějšími místy diseminace jsou mozek, játra, trávicí trakt a ledviny. Po náhradě chlopně se může rozvinout endokarditida. Ta postihuje i narkomany a pacienty, kteří podstupují imunosupresivní terapii (Greenwood a kol., 1999).

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Chemikálie

Jako rozpouštědla byly použity hexan (Merck, Praha, Česká Republika), dimethyl sulfoxid (DMSO), ethanol, aceton (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika) a Tween 80 (Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika). Kontrolní antibiotika ciprofloxacin a tioconazol byla zakoupena od Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Rostlinný materiál použitý pro výrobu extraktů a destilaci silice pochází z komerčního zdroje (F-DENTAL, Hodonín, Česká Republika). Pro identifikaci složek silice byly zakoupeny autentické standardy borneol, kafr, karvakrol, karvon, kariofýlen, cymen, estragol, eukalyptol, limonen, linalool, menthol, menthone,  $\beta$ -myrcen,  $\gamma$ -terpin, a thymol vše od Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika).

### 4.2 Rostlinný materiál a extrakce

Byl použit sušený světlík lékařský (*Euphrasia rostkoviana*) (F-DENTAL, Hodonín, Česká Republika). Z materiálu byla destilací získána silice, dále pak vodný, acetonový, hexanový a ethanolový výluh a také vodný odvar.

#### 4.2.1 Extrakce do rozpouštědel

Extrakty byly získány za pomoci různých rozpouštědel, destilované vody, hexanu, ethanolu a acetonu. Do Erlenmayerových baněk bylo pro jednotlivé extrakce naváženo stejné množství byliny, 10g sušeného světlíku lékařského (*E.rostkoviana*) a přidáno 150ml konkrétního rozpouštědla do každé. Baňky byly poté zakryty alobalem a na 24h umístěny na třepačku.

Pro přípravu extraktu z odvaru bylo do laboratorní kádinky naváženo 10g sušeného světlíku lékařského (*E.rostkoviana*) a přidáno 300 ml destilované vody. Směs byla zahřáta a přivedena k varu, který byl udržován po dobu 5minut. Po uplynutí zadaného času byla kádinka sundána ze zdroje tepla a nechána pozvolna vychlázet následujících 10minut. Poté byl obsah slit přes sítko.

Připravené roztoky byly přefiltrovány přes filtrační papír pomocí vývěvy, aby byly odstraněny zbytky byliny. Přefiltrovaný roztok byl v předem zvážených varných baňkách umístěn na odparku a pomocí zahřáté vodní lázně a podtlaku se rozpouštědla nechala odpařit. Baňka byla opět zvážena pro následné vypočítání množství vytěženého extraktu. Ulpělý extrakt byl ze stěn získán pomocí DMSO a pro úplné rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň. Množství použitého DMSO bylo zaznamenáno pro následný výpočet koncentrace extraktu.

#### **4.2.2 Destilace silice**

Sušený světlík lékařský (*E.rostkoviana*) byl navážen v množství 100g a přidán do varné baňky o objemu 2l spolu s 1l vody. Vzniklá směs byla destilována po dobu 3hodin hydro destilační metodou v Clevengerově aparátu. Po třech hodinách byla baňka sejmuta a vyměněna za novou se stejnou navázkou sušeného materiálu a stejným množstvím destilované vody. Tato výměna proběhla opakovaně a v konečném součtu byla výtěžnost silice ze sušeného světlíku lékařského (*E.rostkoviana*) 0,02%. Získaná žluto-hnědá silice byla rozdělena do eppendorf „safe-lock“ zkumavek a uskladněna při cca 4°C.

#### **4.3 Bakteriální kmeny a kultivační média**

Pro přípravu kultivačního média byl použit bujón Mueller-Hinton broth (MHB) pro bakterie a Sabouraud dextrose broth (SDB) pro kvasinku, obojí ze (Sigma-Aldrich, Praha, CZ). Obě média byla připravena podle návodu, ale za použití pufované destilované vody pomocí Tris-buffered saline (Sigma-Aldrich, Praha, CZ). Pro zkoumání baktericidních respektive fungicidních účinků byl připraven agar Mueller-Hinton agar (MHA) a Sabouraud dextrose agar (SDA), obojí z Oxoid (Basingstoke, UK). Pro testování byly vybrány standardní druhy gram+ bakterií *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212 a gram- bakterií *Escherichie coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a jedna kvasinka *Candida albicans* ATCC 10231, všechny získané z Oxoid (Basingstoke, UK).

#### 4.4 Příprava inokula

Pro kultivaci byla využita média MHB a SDB. Obě média byla připravena podle návodu, ale za použití pufrované destilované vody pomocí Tris-buffered saline. Uvařená média byla rozpipetována do menších laboratorních nádob, následně zklákována a uschována do chladicího zařízení. Pro další práci byl použit flowbox kvůli zabránění možné kontaminaci. Do 10ml zkumavek bylo odpipetováno 5ml média, pro bakterie MHB a pro kvasinku SDB. K médiu byly přidány 0,2ml ze zásobního média s již namnoženými bakteriemi *E.Faecalis* ATCC 29212, *S.aureus* ATCC 29213, *S.epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 700603, *P.aeruginosa* ATCC 27853 kvasinkou *C.albicans* ATCC 10231. Obsah ve zkumavkách byl důkladně promíchán na třepačce. Tyto byly poté uloženy do mikrobiologického inkubátoru nastaveného na teplotu  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  po dobu 24h, aby došlo k pomnožení.

Pro přípravu samotného inokula byla použita 10 ml zkumavka, naplněná 5ml čistého média, pro bakterie MHB a pro kvasinku SDB. Zkumavka byla protřepána na třepačce a poté byla změřena denzita denzitometrem k měření optické denzity podle McFarlandovy (McF) stupnice. Postupným přidáváním média z prve zaočkovaných zkumavek byla denzita upravena na 0,5 (McF), a tím bylo dosaženo požadované koncentrace mikroorganismů pro zaočkování destiček. Veškerá úkony byly prováděny ve flowboxu.

#### 4.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

K určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita in vitro bujónová mikrodiluční metoda podle metodiky Institutu klinických a laboratorních standardů (CLSI, 2009), která byla pozměněna s ohledem na doporučení navržených pro efektivní dávku antiinfekčního působení přírodních produktů (Cos, P. et al., 2006) za použití 96-jamkové mikrotitrační destičky. Bylo připravené dvojnásobné ředění (ředící řada) MHB pro bakterie a SDB pro kvasinku. Referenční antibiotika ciprofloxacin pro bakterie a tioconazol pro kvasinku měla počáteční koncentraci shodně  $8\ \mu\text{g/mL}$ , silice 2048  $\mu\text{g/mL}$  a extrakty spolu s odvarem 4096  $\mu\text{g/mL}$ . K docílení požadované koncentrace extraktů bylo na rozředění použito médium MHB pro bakterie a SDB pro kvasinku. Silice byla rozpuštěna v DMSO s přídavkem Tween 80. Ciprofloxacin byl rozpuštěn ve vodě a tioconazol ve ethanolu. Řada s DMSO byla



vytvořena pro vyloučení inhibice růstu bakterií použitými rozpouštědly. Pozitivní kontrola růstu byla přidána do posledního sloupce, zatímco první sloupec destičky byl využit pro kontrolu čistoty použitého bujónu, a jako jediný nebyl zaočkovaný (viz. obrázek 4).

	Ředící řada a koncentrace $\mu\text{g/mL}$												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Vodný extrakt	čistota	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	kontrola	A
Acetonový extrakt	čistota	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	kontrola	B
Hexanový extrakt	čistota	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	kontrola	C
Ethanolový extrakt	čistota	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	kontrola	D
Extrakt z odvaru	čistota	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	kontrola	E
ATB	čistota	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	kontrola	F
DMSO	čistota	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.063	0.031	0.016	0.008	kontrola	G
Silice	čistota	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	kontrola	H

**Obrázek 4:** Model ředící řady v mikrotitrační destičce

K určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita in vitro bujónová mikrodiluční metoda podle metodiky Institutu klinických a laboratorních standardů (CLSI, 2009), která byla pozměněna s ohledem na doporučení navržených pro efektivní dávku antiinfekčního působení přírodních produktů (Cos, P. et al., 2006) za použití 96-jamkové mikrotitrační destičky. Bylo připravené dvojnásobné ředění (ředící řada) MHB pro bakterie a SDB pro kvasinku. Referenční antibiotika ciprofloxacin pro bakterie a tioconazol pro kvasinku měla počáteční koncentraci shodně  $8 \mu\text{g/mL}$ , silice  $2048 \mu\text{g/mL}$  a extrakty spolu s odvarem  $4096 \mu\text{g/mL}$ . K docílení požadované koncentrace extraktů bylo na rozředění použito médium MHB pro bakterie a SDB pro kvasinku. Silice byla rozpuštěna v DMSO s přídavkem Tween 80. Ciprofloxacin byl rozpuštěn ve vodě a tioconazol ve ethanolu. Řada s DMSO byla vytvořena pro vyloučení inhibice růstu bakterií použitými rozpouštědly. Pozitivní kontrola růstu byla přidána do posledního sloupce, zatímco první sloupec destičky byl využit pro kontrolu čistoty použitého bujónu, a jako jediný nebyl zaočkovaný (viz. obrázek 4). Mikrodestičky byly zaočkované přes noc připraveným inokulem, počáteční koncentrace byla  $5 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$  pro bakterie a  $2 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$  pro kvasinku v každé jamce, kromě prvního sloupce. Na zaočkování byl použit kovový ježek, který byl před a během použití opálen plamenem kahanu. Zaočkované destičky byly vloženy do mikrobiologického inkubátoru nastaveného na  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ \text{C}$  a byly vyjmuty a zkoumány po 24h a ještě jednou po 48h v případě *C. albicans*. Mikrobiální růst byl měřen spektrofotometricky přístrojem Multiscan Ascent Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) při 405 nm.

Minimální inhibiční koncentrace byla vyjádřena jako nejnižší koncentrace schopná inhibovat  $\geq 80\%$  bakteriálního růstu ve srovnání s pozitivní růstovou kontrolou. Experimenty byly prováděny ve třech opakováních ve třech nezávislých testech.

#### **4.6 Stanovení minimální baktericidní a fungicidní koncentrace**

Pro zjištění minimální baktericidní koncentrace, a také fungicidní koncentrace v případě kvasinky, byly předem připraveny Petriho misky s agarem MHA pro bakterie a SDA pro kvasinku, a to za sterilních podmínek ve flowboxu. Po změření nárůstu a vyhodnocení MIC v mikrotitračních destičkách bylo z každé jamky, ve které nebyl zaznamenán růst mikroorganismů, a to po 24h inkubace u bakterií a 48h inkubace u kvasinky, pipetou odebráno 20  $\mu\text{L}$  suspenze, která byla přenesena na Petriho misky. Ty byly vloženy do mikrobiologického inkubátoru nastaveného na teplotu  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Po 24h u bakterií a po 48h u kvasinky byly misky vyndány a vizuálně zkontrolovány, jestli došlo k nárůstu kolonií. Jako baktericidní respektive fungicidní byly vyhodnoceny ty, kde došlo k úbytku organismů o 99,9% v porovnání s inokulem (EUCAST, 2000). Každé měření bylo provedeno třikrát ve třech nezávislých testech.

#### **4.7 Analýza složení silice na plynovém chromatografu a hmotnostním spektrometru**

Zkoumání chemického složení získané silice bylo provedeno prostřednictvím plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Analýza byla provedena za použití plynového chromatografu Agilent 7890A u GC, spojeného s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C, vybaveným kolonou HP-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  film) od Agilent (Santa Clara, CA, USA). Jako rozpouštědlo byl použitý hexan a byl proveden nástřik vzorku o objemu 1  $\mu\text{L}$  ve splitovém poměru 20:1 do inletu vyhřátého na  $250^\circ\text{C}$ . Počáteční teplota pece byla nastavena na  $60^\circ\text{C}$  po dobu 3 min, dále stoupala na teplotu  $230^\circ\text{C}$  rychlostí  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  a poté setrvala konstantní po dobu 10 min. Jako nosný plyn bylo použito hélium o průtokové rychlosti 1 ml/min. Analýza MS byla provedena ve "full-scan" módu a ionizační energie byla nastavena na 70eV. Samotná identifikace jednotlivých složek byla založena na srovnání jejich hmotnostních spekter a retenčních indexů s knihovnou spekter (National

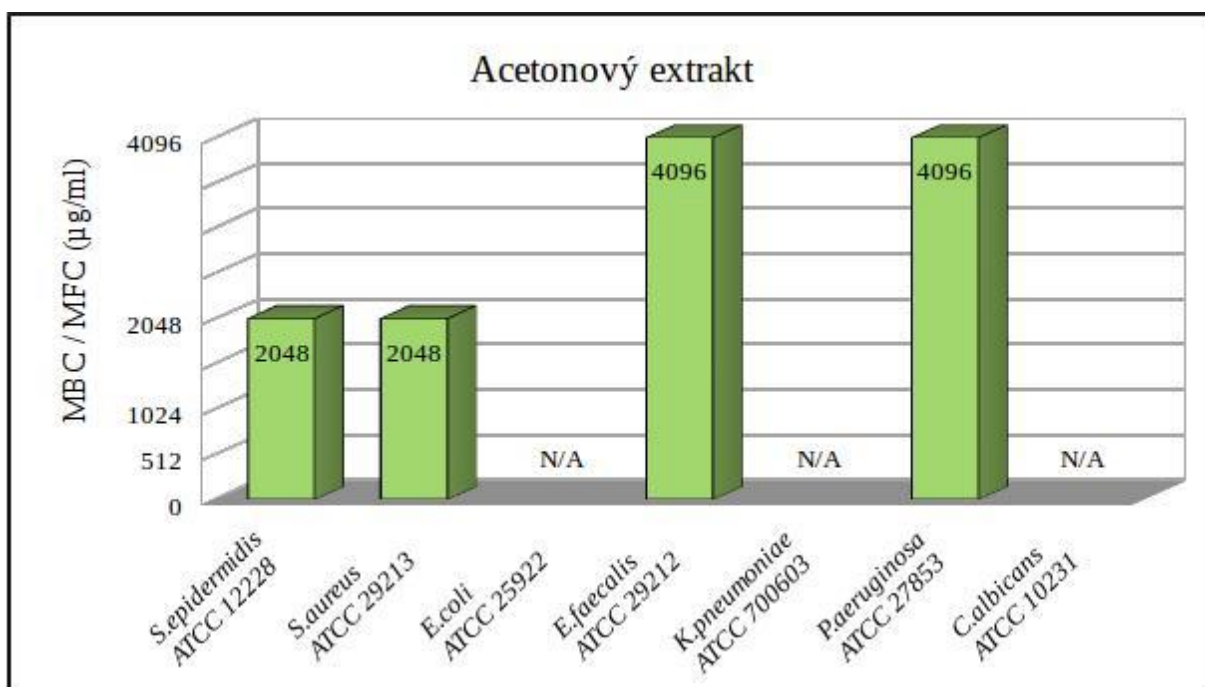
Institute of Standards and Technology Library, NIST, USA) a literaturou (Adams, 2007), stejně jako prostřednictvím koeluze autentických standardů, kterými byly borneol, kafr, karvakrol, karvon, kariofýlen, cymen, estragol, eukalyptol, limonen, linalool, menthol, menthone,  $\beta$ -myrcen,  $\gamma$ -terpin, a thymol.

## 5 Výsledky

Výsledky extraktů a silice z *E. rostkoviana* ukázaly antimikrobiální aktivitu u všech pěti extraktů i silice vždy nejméně proti třem ze sedmi testovaných mikroorganismů. Nejsilnější aktivitu vykazovala silice a acetonový extrakt, která byla schopna inhibovat shodně šest ze sedmi testovaných mikroorganismů. Hodnoty účinných koncentrací jsou sumarizovány v Tabulce 1 a v Tabulce 2. Výsledky analýzy chemického složení silice jsou pak shrnuty v Tabulce 3.

### 5.1 Inhibiční aktivita extraktů

Výsledky pokusu jsou uvedeny níže v Tabulce 1. Jako extrakt s nejširším spektrem účinku se ukázal být acetonový extrakt, u kterého byla naměřena MIC u všech testovaných mikroorganismů, kromě *K. pneumoniae*, kde nezapůsobila ani nejvyšší testovaná koncentrace 4096  $\mu\text{g/ml}$  (Graf 1).



**Graf 1: Minimální baktericidní a fungicidní koncentrace acetonového extraktu**

MBC - minimální baktericidní koncentrace, MFC - minimální fungicidní koncentrace, N/A – neaktivní, ATCC - americké sbírkové kmeny

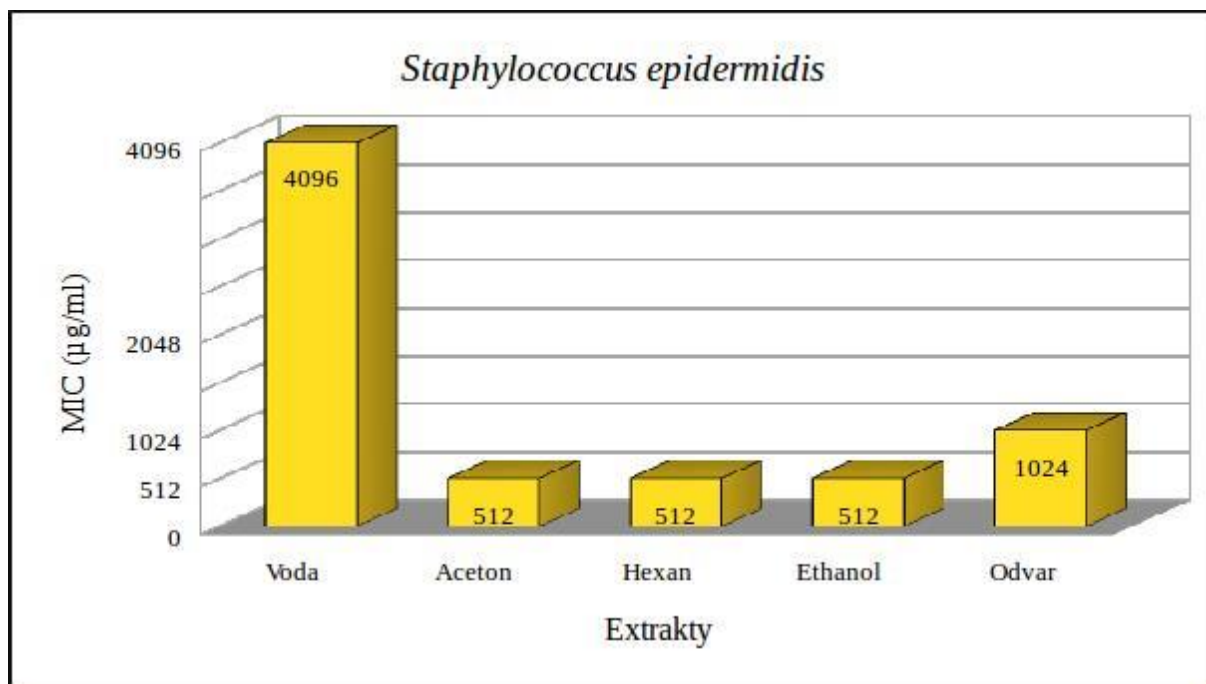
Vodný extrakt zapůsobil pouze ve dvou případech, na bakterie rodu *Staphylococcus ssp.* a to v nejvyšší možné testované koncentraci. Hexanový extrakt neprojevil inhibiční účinky u poloviny bakterií a u kvasinky pouze v nejvyšší možné koncentraci. Ethanolový extrakt a extrakt z odvaru neměly žádné zaznamenané účinky na růst *C. albicans* stejně tak jako na bakterie *E. coli* a *K. pneumoniae*.

**Tabulka 1:** Antimikrobiální aktivita extraktů *E. rostkoviana*

	H <sub>2</sub> O		Ac		Hex		EtOH		Odv		Cip
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>P. aeruginosa</i>	4096	nd	2048	4096	na	nd	2048	4096	4096	>4096	0,0625
<i>K. Pneumoniae</i>	na	nd	na	nd	na	nd	na	nd	na	nd	0,125
<i>E. faecalis</i>	na	nd	1024	4096	1024	2048	2048	>4096	4096	>4096	0,5
<i>E. coli</i>	na	nd	4096	>4096	na	nd	na	nd	na	nd	0,0039
<i>S. aureus</i>	4096	4096	1024	2048	1024	2048	1024	2048	1024	2048	0,5
<i>S. epidermidis</i>	4096	>4096	512	2048	512	>4096	512	2048	1024	4096	0,125
<i>C. albicans</i>	na	nd	2048	4096	na	nd	na	nd	na	nd	na

\* v případě *C. albicans* byly MIC zjišťovány po inkubaci 24h a 48h; CIP - ciprofloxacin; TIO - tioconazole; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC - minimální baktericidní koncentrace ( minimální fungicidní koncentrace v případě *C. albicans*); na – neaktivní při testovaných koncentracích; nd - nebylo stanoveno

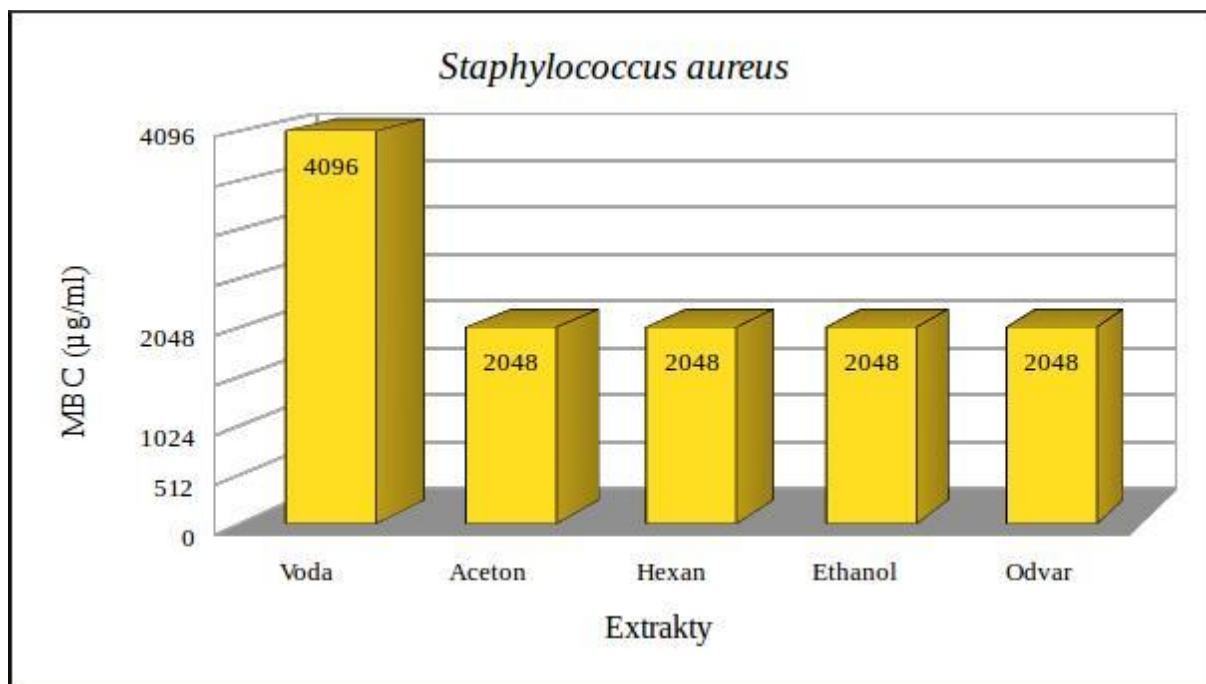
Při porovnávání účinku na jednotlivé bakterie byla zaznamenána MIC všech testovaných extraktů na *S. aureus* i na *S. epidermidis*, přičemž *S. epidermidis* byl vůbec nejcitlivějším testovaným mikroorganismem (Graf 2). Nejméně účinným byl vodný extrakt, který zapůsobil při koncentraci 4096 µg/ml. Jediný zaznamenaný inhibiční efekt na bakterii *E. coli* byl díky acetonovému extraktu a to v jeho nejvyšší testované koncentraci 4096 µg/ml (Graf 8), v ostatních případech nebyla inhibiční aktivita zjištěna. *E. faecalis* a *P. aeruginosa* reagovaly na většinu extraktů, kromě vodného a v případě pseudomonády nebyla zaznamenaná inhibiční aktivita ani u extraktu získaného za pomoci hexanu. Oba patogeny pak zareagovaly na extrakt z odvaru, až při nejvyšší použité koncentraci. Vliv extraktů na růst kvasinky *C. albicans* byl zaznamenán pouze u acetonového a hexanového extraktu. V případě *K. pneumoniae* nebyla při použitých koncentracích zaznamenána žádná inhibiční aktivita extraktů.



**Graf 2: Účinné koncentrace extraktů proti *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228**  
 MIC - minimální inhibiční koncentrace, ATCC - americké sbírkové kmeny

## 5.2 Baktericidní a fungicidní aktivita extraktů

Nejvyšší baktericidní aktivita byla zaznamenána u acetonového extraktu, který zapůsobil na čtyři bakterie, následovaný extraktem ethanolovým, který ovlivnil růst tří bakterií. Hexanový extrakt a extrakt z odvaru zapůsobily proti dvěma bakteriím a vůbec nejslabší baktericidní schopnost ukázal vodný odvar, kde bylo MBC zachycena v nejvyšší testované koncentraci a to pouze proti *S. aureus*. Ten byl také nejcitlivější testovanou bakterií, u které byla nalezena MBC při použití každého jednotlivého extraktu (Graf 3). Slabší reakci ukázal kmen *S. epidermidis* spolu *E. faecalis*. Žádný z extraktů nepůsobil cidně na *C. albicans*, ale také proti *E. coli*, *K. pneumoniae* a *P. aeruginosa*, tedy gram- bakteriím.



**Graf 3: Baktericidní koncentrace proti *Staphylococcus aureus* ATCC 29213**  
 MBC - minimální baktericidní koncentrace, ATCC - americké sbírkové kmeny

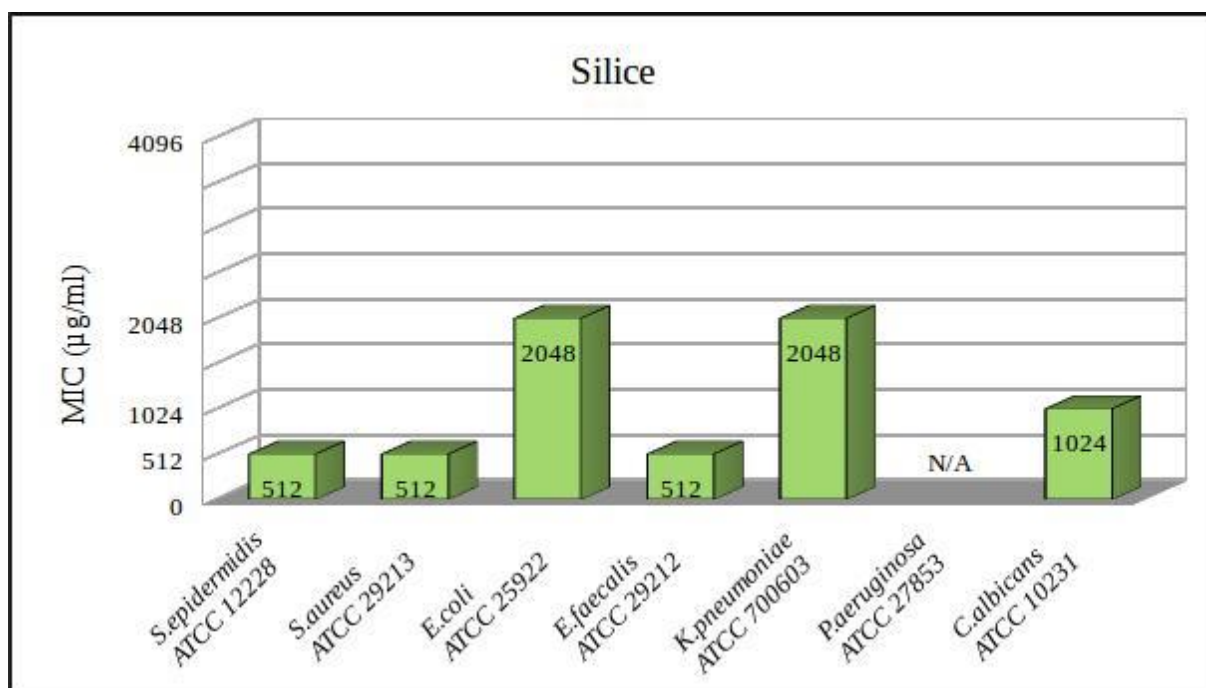
### 5.3 Inhibiční aktivita silice

Silice z *E.rostkoviana* prokázala inhibiční aktivitu proti šesti ze sedmi testovaných mikroorganismů, kdy se účinné hodnoty MIC pohybovaly od 512 µg/ml po 2048 µg/ml. *P.aeruginosa* byla jediným organismem, jehož růst nebyl ovlivněn ani nejvyšší použitou koncentrací, tedy 2048 µg/ml. Gram+ bakterie vykazaly větší citlivost a byly inhibovány při nižší koncentraci než ostatní mikroorganismy. Naměřené hodnoty MIC jsou uvedeny v Tabulce 2. Porovnání účinnosti proti jednotlivým testovaným mikroorganismům je znázorněno graficky v Grafu 4.

**Tabulka 2: Antimikrobiální aktivita silice *Euphrasia rostkoviana***

Microorganism	Silice <i>E. rostkoviana</i>			CIP	TIO
	MIC (µg/mL)		MBC/MFC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)
	24h	48h*	24h	24h	48h
<i>Enterococcus faecalis</i>	512	-	1024	0.5	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	512	-	>2048	0.5	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	512	-	>2048	0.25	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2048	-	>2048	0.125	-
<i>Escherichia coli</i>	2048	-	>2048	0.015	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2048	-	>2048	0.125	-
<i>Candida albicans</i>	128	1024	2048	-	0.063

\* v případě *C. albicans* byly MIC zjišťovány po inkubaci 24h a 48h; CIP - ciprofloxacin; TIO - tioconazole; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC - minimální baktericidní koncentrace; MFC - minimální fungicidní koncentrace



**Graf 4: Minimální inhibiční koncentrace silice *E. rostkoviana***

MIC - minimální inhibiční koncentrace, N/A - neaktivní, ATCC - americké sbírkové kmeny



#### 5.4 Baktericidní a fungicidní aktivita silice

Silice z *E.rostkoviana* neprokázala ani v nejvyšší použité koncentraci baktericidní účinek proti testovaným bakteriím. Naopak prokázala fungicidní účinek proti *C.albicans* a to v koncentraci 2048 µg/ml (Graf 22).

#### 5.5 Složení silice

Získaná žluto-hnědá silice o výtěžnosti 0,02% měla při pokojové teplotě tuhou konzistenci. Pravděpodobně to bylo způsobeno vysokým obsahem mastných kyselin (32,23% z celkového obsahu). Analýza GC-MS ukázala, že v silici je přítomno více než 70 složek, včetně kyseliny palmitové (18,47%), která je nejvíc zastoupenou, následuje thymol (7,97%), kyselina myristová (4,71%), linalool (4.65%), anethol (4.09%), kyselina linolenová (3.81%), hexahydrofarnesyl acetone (3.16%), kyselina laurová (2.79%), α-terpineol (2.39%), a borneol (2.39%). Kompletní seznam složek zjištěných v silici *E.rostkoviana* je prezentován v Tabulce 1.

Tabulka 3: Chemické složení silice *Euphrasia rostkoviana* Hayne

RI	Složka	(%)*	ID	RI	Složka	(%)	ID
-	1-hexanol <sup>d</sup>	0.10	a	1385	damascenone	0.56	a,b
981	1-octen-3-ol	1.82	a,b	1406	methyleugenol	0.23	a,b
992	$\beta$ -myrcene	0.14	a,b,c	1419	caryophyllene	1.28	a,b,c
996	3-octanol	0.13	a,b	1455	geranyl acetone	0.89	a,b
1027	p-cymene	0.81	a,b,c	1460	trans- $\beta$ -farnesene	0.13	a,b
1032	limonene	0.34	a,b,c	1462	alloaromadendrene	0.12	a,b
1034	eucalyptol	0.25	a,b,c	1478	$\gamma$ -muurolene	0.25	a,b
1062	$\gamma$ -terpinene	0.34	a,b,c	1482	germacrene D	0.31	a,b
1070	sabinene hydrate	0.14	a,b	1484	curcumene	1.21	a,b
1074	1-octanol	0.40	a,b	1487	trans- $\beta$ -ionone	1.53	a,b
1094	3,5-octadienone <sup>d</sup>	0.16	a,b	1493	valencene	0.13	a,b
1101	linalool	4.65	a,b,c	1495	$\alpha$ -selinened	0.17	a,b
1106	$\alpha$ -thujone	0.88	a,b	1498	epizonarene <sup>d</sup>	0.26	a,b
1118	$\beta$ -thujone	0.48	a,b	1500	$\alpha$ -muurolene	0.18	a,b
1146	camphor	1.00	a,b,c	1510	$\beta$ -bisabolene	0.94	a,b
1156	menthone	1.98	a,b,c	1515	$\gamma$ -cadinene	0.40	a,b
1163	2-nonenal, (E)-	0.10	a,b	1566	nerolidol <sup>d</sup>	0.10	a,b
1168	borneol	2.39	a,b,c	1574	lauric acid	2.79	a,b
1170	(+/-)lavandulol	0.16	a,b	1578	spatulenol	0.61	a,b
1175	menthol	2.02	a,b,c	1583	caryophyllene oxide	1.47	a,b
1179	4-terpineol	1.13	a,b	1587	pseudoionone <sup>d</sup>	0.18	a,b
1191	$\alpha$ -terpineol	2.39	a,b	1609	humulene epoxide II	0.25	a,b
1199	estragole	0.34	a,b,c	1613	longifolenaldehyde <sup>d</sup>	0.20	a,b
1207	decanal	0.15	a,b	1643	$\tau$ -cadinol	0.18	a,b
1222	$\beta$ -cyclocitral <sup>d</sup>	0.21	a,b	1651	$\beta$ -eudesmol	0.13	a,b
1238	thymol methyl ether	0.75	a,b	1771	myristic acid	4.71	a,b
1242	cumin aldehyde	0.23	a,b	1847	hexahydrofarnesyl acetone	3.16	a,b
1244	neral	0.14	a,b	1865	pentadecanoic acid	0.28	a,b
1246	carvone	1.28	a,b,c	1919	farnesyl acetone	0.50	a,b
1256	piperitone	0.18	a,b	1977	palmitic acid	18.47	a,b
1258	geraniol	0.79	a,b	2114	phytol <sup>d</sup>	0.12	a,b
1264	trans-2-decenal <sup>d</sup>	0.11	a,b	2143	linoleic acid	1.90	a,b
1273	geranial	0.15	a,b	2148	linolenic acid	3.81	a,b
1287	anethole	4.09	a,b	2300	tricosane	1.79	a,b
1289	safrole	0.21	a,b	2400	tetracosane	0.16	a,b
1295	thymol	7.97	a,b,c	2500	pentacosane	1.36	a,b
1304	carvacrol	1.96	a,b,c				
1318	2,4-decadienal, (E,E)-	0.21	a,b		Identifikováno celkem	98.91	
1374	capric acid	0.26	a,b				
1377	$\alpha$ -copaene	0.15	a,b				

RI- Retenční index; \* relativní procentické zastoupení olochy píku vztažené k celkové ploše všech píků; ID – způsob identifikace; a – identifikace na základě shody hmotnostních spekter; b – identifikace na základě porovnání RI; c – identifikace potvrzena pomocí autentického standardu; d – nejistá identifikace (upraveno podle: Novy et al., 2015)

## 6 Diskuze

Světlík lékařský (*E.rostkoviana*) je v tradičním léčitelství známý především pro svoje blahodárné účinky při léčbě různých očních obtíží. Z tohoto předpokladu se vycházelo při přípravě této práce. Už jeho samotný název napovídá o vztahu k očím. V angličtině se jmenuje Eyebright, v němčině Augentrost, ve španělštině Ojo brillante, polsky Swietlik, norský Augetrøst (EMA, 2010) a v češtině je známý také jako očanka (Hudak, 2014). Historie jeho použití je pravděpodobně starší, nicméně jeden z prvních záznamů o *E.rostkoviana* ve spojitosti s léčbou očních chorob se objevuje v 15.stol. (Porchezian et al., 2000). V lidovém léčitelství byl využíván k léčbě šedého zákalu, konjunktivitidy, červených, zanícených, suchých nebo jinak podrážděných očí, a to ve formě nálevu, který byl použit zevně jako oční koupel nebo aplikován jako kompresní zábal k léčbě ječného zrna (Blazic, 2010),

Z těchto informací vzešlo téma a také hypotéza závěrečné práce. Tedy pokud je světlík lékařský používán po mnoho století k léčbě stejných obtíží a děje se tak v navzájem rozdílných oblastech či kulturách, lze předpokládat, že má antimikrobiální schopnosti. Tuto teorii podporuje klinická studie, ve které (CCRH, 1989) testoval účinek kapek s obsahem světlíku lékařského na 44 pacientech. V dvojité zaslépené studii došlo k uzdravení všech členů skupiny, kteří kapky užívali.

Předpoklad, že by světlík mohl být použit jako hlavní léčebný prostředek při konjunktivitidě, podporuje také studie, která byla provedena na 65 pacientech ve věku 6 měsíců až 84 let, kteří trpěli zánětem a katarální reakcí spojivek z důvodů podráždění očí větrem, prachem, pylem a nebo jejich přetěžováním. Symptomy konjunktivitidy kompletně zmizely u 95% pacientů, po tom, co si kapali jednu kapku přípravku se světlíkem lékařským, jednou až pětkrát denně do postiženého oka, po dobu 3-17 dnů (Stoss et al., 2000).

Kromě zjevného úspěchu při léčbě očních obtíží, by bylo dobré zmínit, že světlík lze užívat i vnitřně. Studie od Porchezian et al. (2000) prokázala testováním na krysách, že vodný extrakt z *E.officinale* má schopnost snižovat hladinu cukru v krvi. Také poukazuje na budoucí možné využití ve farmacii, k čemuž by byl ovšem nutný farmakologický výzkum k objasnění mechanismů pozorovaného hypoglykemického efektu (Porchezian et al., 2000). Také Blazic (2010) zmiňuje možnost vnitřně využívat slabého nálevu ze světlíku lékařského při zažívacích potížích, křečích a problémech se žlučovými cestami.

A v neposlední řadě bychom neměli zapomenout na možnost jeho využití při léčbě zvířat, kdy Tarabishy and Jeng (2008) uvádí jako schopnost světlíku léčit konjunktivitidu u krav a to buď obkladem namočeném v čaji nebo kapáním přímo do očí.

Díky těmto informacím byly vybrány vhodné patogeny, související se záněty očí, aby na nich byla potvrzena nebo vyvrácena hypotéza o léčebných schopnostech světlíku lékařského. Šest bakterií a jedna kvasinka byly kontrolní skupinou pro pět extraktů a silici vyextrahovaných z rostliny, kdy cílem bylo zjistit, jestli inhibují jejich růst a pokud, tak při jaké koncentraci. Extrakty zapůsobily různým způsobem na testované bakterie s výjimkou *K.pneumoniae*, u které se neprojevila dostatečná inhibice růstu a extrakty tak byly v jejím případě označeny za neaktivní v dané koncentraci, která nepřekračovala 4096 µg/ml. Gram+ bakterie vykazovali větší citlivost než gram-.

V porovnání s Teixeira and Silva (2013), kteří testoval působení vodného a ethanolového extraktu jsou hodnoty MIC odlišné, což by mohlo být zapříčiněno samotným testovaným vzorkem rostliny, ale výsledky se různí na obě strany. Tedy v některých případech zaznamenal inhibici při nižších koncentracích a v jiném případě naopak inhibiční koncentraci několikrát vyšší, jako například u *E.faecalis*. To by mohlo být způsobeno použitím rostliny, která měla k růstu odlišné podmínky než námi testovaný vzorek. Na tento rozdíl ve výsledcích antimikrobiální aktivity stejné části rostliny poukazuje Doughari (2012), který vidí pravděpodobnou příčinu ve faktorech, které ovlivňují výsledné množství aktivní látky v orgánech rostliny. Na tomto se mohou podílet jak geografické podmínky, tak koncentrace živin v půdě stejně jako stáří rostliny při sběru.

Další část práce se byla zaměřena na extrahovanou silici, její antimikrobiální vlastnosti a také analýzu jejího složení.

Již dříve byl nalezen vysoký obsah mastných kyselin v silici příbuzné rostliny *E. stricta* (25.7%) také s velkým podílem kyseliny palmitové (20,3%) a kyseliny myristové (3,9%) (Miladinovic at al., 2014). Lze tedy předpokládat, že by silice *E.rostkoviana* mohla mít v některých ohledech podobné složení. Vyextrahovaná silice prokázala celkově větší efektivitu inhibovat růst mikroorganismů a to při nižších koncentracích než použité extrakty. To by z ní mohlo učinit hlavní bod zájmu pro budoucí výzkum, který by byl později aplikovatelný v klinické praxi. Jediným organismem, u kterého nebyla zachycena MIC při použití silice *E.rostkoviana* byla *P.aeruginosa*. Toto koresponduje se studií Hammer et al.

(1999), kdy z použitých 52 druhů silic, pouze u 3 byla zaznamenána inhibiční aktivita proti růstu této bakterie.

Aktivní koncentrace silice je srovnatelná s dříve zkoumanými účinky silic extrahovaných z jiných rostlin, jakými jsou *Thymus vulgaris*, *Myrtus communis*, *Mentha suaveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum basilicum* a *Artemisia annua*. Zejména jejich účinek na *candida spp.* (Rapper et al., 2013; Bilia et al., 2014; Stringaro et al., 2014). Vzhledem k tomu, že kyselina palmitová jako hlavní složka silice nepřesáhla 20% a dále bylo zjištěno více než 10 dalších aktivních složek s antimikrobiálním potenciálem v množství 1 až 8% je těžké rozhodnout, která látka je hlavním příčinou antimikrobiálního efektu. Kyselina palmitová byla již dříve označena jako hlavní složka při testování proti gram-bakteriím, ne však proti gram+ (Moradali et al., 2008).

Na druhé straně je známa schopnost středně dlouhých nasycených mastných kyselin a také dlouhých řetězců nenasyčených mastných kyselin inhibovat gram+ bakterie (Zhang, 2012). Navíc kyselina laurová vykazuje fungicidní aktivitu (Dayrit, 2015). Za schopností silice působit antimikrobiálně stojí zřejmě komplex látek v čele s mastnými kyselinami a dalšími látkami, které byly v silici identifikovány a u kterých jsou známe antimikrobiální účinky. Jsou mezi nimi borneol, menthol, thymol, camphor a další.

Potenciál světlíku v léčbě nemocí očí a nejen jich, je zřejmý. Nicméně faktorů ovlivňujících jeho složení a tedy i výsledný efekt je mnoho. Ať už se jedná o dříve zmíněné růstové faktory nebo nejednotný postup a metody extrakce, kdy výsledné složení a tedy ani léčebný efekt nemůže být zaručen. Toto je ale běžný problém při snaze začlenit léčivé byliny do běžné léčebné praxe.

I když jsou některé preparáty s obsahem *E.rostkoviana* určené k léčbě očí běžně dostupné na trhu, jejich léčebná aktivita je podložena převážně historickými záznamy a používáním v lidovém léčitelství. Pro využití v klinické praxi by bylo třeba více vědeckých výzkumů, které by prokázaly účinek extraktů ze světlíku a jeho prospěšnost v léčbě očních obtíží (Wszelaki and Melzik, 2011).

Záněty očí sice nepatří k hlavním problémům zdravotnictví, ale jsou obvykle podceňovány, vzhledem k časté absenci systémových příznaků (Bennett et al., 2015). Toto může mnohdy vést k zanedbání léčby, které může následně vést k nevratným změnám ve struktuře oka a tedy k omezení jeho schopností či úplně ztrátě zraku. Vzhledem k tomu, že

zrak je naším nejvyužívanějším smyslem, zasloužil by si jistě více pozornosti.

Bylo by dobré zmínit i stoupající počet patogenů, které jsou rezistentní vůči konvenční léčbě ATB. Jsou to především kmeny, které se předávají v nemocničním prostředí a jsou zodpovědné za nozokomiální infekce. Ty jsou často přidruženou komplikací, u již tak oslabených jedinců.

Resistence na ATB bohužel stoupá i mezi běžnou populací, tedy osobami, které nebyly hospitalizovány. Náchylnost nejběžnějších očních patogenů k rezistenci na antimikrobiální látky používané v oftalmologii dramaticky stoupá. *S.aureus* a *S.pneumoniae* již mají vybudovaný vysoký podíl rezistentních kmenů. Nedávná data také naznačují, že léčba ATB běžně používanými v oftalmologii může způsobit vznik rezistence mezi bakteriemi, které kolonizují oblasti mimo oko (Tarabishy and Jeng, 2008).

Toto by mohl být jeden z podstatných impulzů k hledání alternativní cesty léčby očních obtíží, ve které by jistě světlík mohl hrát svoji roli.

## 7 Závěr

Světlík lékařský (*E.rostkoviana*) se používá v lidovém léčitelství především k léčbě očních obtíží. I když roste ve více oblastech, kde už podle jeho názvu lze usuzovat, že o jeho účincích tamní obyvatelé vědí, nebylo ještě dostatečně prozkoumáno a popsáno, o jaké konkrétní působení se jedná.

Tato práce se zabývá testováním antimikrobiální aktivity jeho extraktů a silice proti běžným očním patogenům. Také složením silice a případnou identifikací konkrétních antimikrobiálních působků. V předchozích klinických studiích se potvrdila schopnost světlíku léčit zánět, ale ne o který konkrétní patogen se jedná. A také výzkum složení silice nikdy nepřinesl ucelené poznatky o látkách v ní obsažených.

Naše hypotéza o antimikrobiálním působení se potvrdila, neboť byly nalezeny MIC potřebné k utlumení růstu patogenů a to buď díky extraktům, nebo silici, která vykazovala efektivnější působení při nižší koncentraci. Zároveň pomocí GS-MS bylo zjištěno složení silice a potvrzení protizánětlivých vlastností, některých jejích složek.

Z výsledků vyplývá, že světlík lékařský má inhibiční a v některých případech i baktericidní a fungicidní účinky na mikroorganismy uplatňující se při nemocech očí. Má tak potenciál stát se rovnocenným léčebným prostředkem, k běžně používaným ATB. Vzhledem ke stoupající rezistenci různých bakteriálních kmenů na ATB, by tak mohl být vhodným řešením v situacích, kdy konvenční léčba selhala. Dílčí výsledky této práce byly již dříve publikovány v časopise Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Novy et al., 2015).

## 8 Seznam literatury

- Adams, R., P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, USA
- Al-Abd, N., M., Nor, Z., M., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M., S., Kassim, M. 2015. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. BMC Complementary and Alternative Medicine. 15(1). 385.
- Amorati, R., Foti, M., C., Valgimigli, L. 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. Journal of agricultural and food chemistry. 61 (46). 10835–10847
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. 1996. Lékařská mikrobiologie. Marvil. Praha. s.558. ISBN: 80-238-0297-6
- Bennett, J., E., Dolin, R., Blaser, M., J. 2015. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Elsevier/Saunders. Philadelphia. p.4320. ISBN: 978-1-4557-4801-3
- Bilia, A., R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M., C., Donato, R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 159819.
- Blazic, B., 2010. Analysis of medicinal plant phenoloids by coupled tandem mass spectrometry. Ph.D. Thesis. Semmelweis University, Department of Pharmacognosy.
- Cechinel-Filho, V. 2012. Plant Bioactives and Drug Discovery. Wiley-Blackwell. New Jersey, USA. p.594. ISBN: 9781118259467
- Central Council for Research in Homeopathy. 1989. An experimental doubleblind study to evaluate the use of Euphrasia in preventing conjunctivitis. Clinical Research in Epidemics. CCRH News. 15. 3-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, CLSI document M7-A8 . 8th Edition.
- Cos, P., Vlietinck, A., J., Berghe, D., V., Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology, 106 (3). 290–302.
- Čihař, J., Čihař, M., Formánek, J., Hodková, Z., Kholová, H., Moravec, Z., Pflieger, V., Skalická, A., Toman, J. 2002. Příroda v České a Slovenské republice. Academia. Praha. s.429. ISBN: 80-200-0938-8



- Dahiya, P., Purkayastha, S. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 74 (5). 443-450.
- Dayrit, F., M. 2015. The properties of Lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92 (1). 1–15.
- Doughari, J., H. (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents*, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech. <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potential-chemotherapeutic->
- Dugasová, A. 2002. *Babiččiny bylinky. Cesty*. Praha. s.216. ISBN: 80-7181-696-5
- EUCAST (2000) Terminology relating to methods for the determination of susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection* 6 (9). 503-8
- European Medicine Agency. 2010. Assessment report on *Euphrasia officinalis* L. and *Euphrasia rostkoviana* Hayne, herba . European Medicines Agency. p.13.
- Greenwood, D., Slack, R., C., B., Peutherer, J., F. 1999. *Lékařská mikrobiologie*. Grada. Praha. s.686. ISBN: 80-7169-365-0
- Hammer, K., A., Carson, C., F., Riley, T., V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology* 86 (6). 985-990.
- Hamplová, L., Göpfertová, D., Pazdiora, P., Dohnal, K., Janovská, D. 2015. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. Triton. Praha. s.263. ISBN: 978-80-7387-934-1
- Harkiss, K., J., Timmins, P. 1973. Studies in the Scrophulariaceae part VIII 1 phytochemical investigation of *Euphrasia officinalis*. *Planta Medica*. 23 (4). 342–347.
- Hermann, F. 2007. *100 českých léčivých rostlin*. Plot. Praha. s.222. ISBN: 978-80-86523-81-1
- Hudak, R. 2014. *Léčivé rostliny. Svojtka*. Praha. s.256. ISBN: 978-80-256-1344-3
- Jahodář, L. 2010. *Léčivé rostliny v současné medicíně*. Havlíček Brain Team. Praha. s.233. ISBN: 978-80-87109-22-9
- Janča, J., Zentrich, J., A. 1996. *Herbář léčivých rostlin. Eminent*. Praha. s.287. ISBN: 80-85876-20-5
- Leonti, R., Verpoorte, R. 2017. Traditional Mediterranean and European herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 199. 161-167.

- Levinson, W. 2014. Review of medical microbiology and immunology. McGraw-Hill Education. New York. p.789. ISBN: 978-1-25-925517-5
- Lippert, W., Podlech, D. 2002. Květiny. Slovart. Praha. s.253. ISBN: 80-7209-390-8
- Korbelář, J., Endris, Z. Naše rostliny v lékařství. 1985. Avicenum. Praha. s.501. ISBN: 08-001-85
- Marcela, A., Stulík, J., Tribichavský, I., Kroča, M., Janovský, S. 2006. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií. Grada. Praha. s.213. ISBN: 80-247-0664-4
- Miladinovic, D., L., Ilic, B., S., Nikolic, D., M. 2014. Volatile constituents of *Euphrasia stricta*. Chemistry of Natural Compounds. 49 (6). 1146–1147.
- Moradali, M., F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hejaroude, G., A. 2008. Investigation of antimicrobial fatty acids from medicinal artist conk mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphyllphoromycetidae*) by TLC and spectroscopic detection. International Journal of Medicinal Mushrooms, 10 (2). 149–154.
- Novy, P., Kloucek, P., Rondevaldova, J., Havlik, J., Kourimska, L., Kokoska, L. 2014. Thymoquinone vapor significantly affects the results of *Staphylococcus aureus* sensitivity tests using the standard broth microdilution method. Fitoterapia. 94. 102–107.
- Novy, P., Davidova, H., Serrano-Rojero, C. S., Rondevaldova, J., Pulkrabek, J. and Kokoska, L. 2015. Composition and antimicrobial activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne essential oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. Article ID 734101. 5 s.
- Porchezian, E., Ansari, S., H., Shreedharan, N., K., K. 2000. Antihyperglycemic activity of *Euphrasia officinale* leaves. Fitoterapia. 71. 522-526.
- Raaman, N. 2006. Phytochemical Techniques. New India Publishing. Delhi. p.318. ISBN: 81-89422-30-8
- Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., Vuuren, S. 2013. The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 852049.
- de la Rosa, L., A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzales-Aguilar, G., A. 2010. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability. Wiley-Blackwell. New Jersey. p.384. ISBN: 978-0-8138-0320-3
- Rozsival, P., Hlinomazová, Z., Jirásková, N., Kocúr, I., Krásný, J., Otradovec, J., Říčařová, R., Vlková, E., Toušková-Zichová, M. 2003. Infekce oka. Grada. Praha. s.204. ISBN: 80-247-0505-2
- Rozsival, P., Diblík, P., Dotřelová, D., Hejmanová, D., Hlinomazová, Z., Horáčková, M., Jirásková, N., Kolář, P., Korda, V., Kuchynka, P., Mokřý, J., Odehnal, M., Pašta, J., Ředinová, M.,

- Řehák, J., Řehořová, J., Řičařová, R., Synek, S., Továrek, L., Vlková, E., Výborný, P. 2006. Oční lékařství. Galén. Praha. s.373. ISBN: 80-7262-404-0
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., Gupta, A. 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 1 (6). 168-182.
- Singh, A. 2006. Compendia of Medicinal Plants of the World. Science Publishers. USA. p.357 ISBN: 9781578085989
- Stoss, M., Michels, C., Peter, E., Beutke, R., Gorter, R., W. 2000. Prospective cohort trial of Euphrasia single-dose eye drops in conjunctivitis. Journal of Alternative and Complementary Medicine. 6 (6). 499–508.
- Stringaro, A., Vavala, E., Colone, M. 2014. Effects of Mentha suaveolens essential oil alone or in combination with other drugs in Candida albicans. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 125904.
- Tarabishy, A., B., Jeng, B., H. 2008. Bacterial conjunctivitis: A review for internists. Cleveland clinical journal of medicine. 75(7). 507-512.
- Teixeira, R., Silva, L., R. 2013. Bioactive compounds and in vitro biological activity of Euphrasia rostkoviana Hayne extracts. Industrial Crops and Products. 50. 680– 689.
- Tiwari, B., K., Brunton, N., P., Brennan, Ch. 2013. Handbook of plant food phytochemicals. Wiley-Blackwell. New Jersey. p.526. ISBN: 978-1-4443-3810-2
- WHO. 1999. WHO Monographs on selected medicinal plants vol.1. World Health Organization. Geneva. p.289. ISBN: 9241545178
- WHO. 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. World Health Organization. Geneva. p.85.
- WHO. 2001. Infections and infectious diseases: A manual for nurses and midwives in the WHO European region. World Health Organization. p.271.
- WHO. 2004. Guidelines on Developing Consumer Information on Proper Use of Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. World Health Organization. Geneva. p.87. ISBN: 9241591706
- WHO. 2007. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. World Health Organization. Geneva. p.72. ISBN: 9789241547161
- Wijesekera, R., O., B. 1991. The Medicinal Plant Industry. CRC Press. p.280. ISBN: 9780849366697
- Wszelaki, N., Melzik, M., F. 2011. Eyebright: Euphrasia officinalis L. Zeitschrift fur Phytotherapie. 32 (1). 40-46.

Zhang, H., Zhang, L., Peng, L., J. 2012. Quantitative structure activity relationships of antimicrobial fatty acids and derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 13 (2), 83–93.

## **9 Seznam použitých zkratek a symbolů**

ATB - antibiotika

ATCC – americké sbírkové kmeny (American Type Culture Collection)

GRAM+ -grampozitivní

GRAM- - gramnegativní

GS-MS - plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MFC – minimální fungicidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

N/A - neaktivní

NMF – normální mikrobiální flóra

WHO -Světová zdravotnická organizace