

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



**Potenciální antimikrobiální účinky vybraných  
přírodních látek**

Bakalářská práce

**Hana Mašková**

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Martin Selinger

České Budějovice 2016

Mašková, H., 2016: Potenciální antimikrobiální účinky vybraných přírodních látek. [Potential antimicrobial effects of selected natural substances. Bc. Thesis, In Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This study was focused on potential antiviral and antibacterial effects of viniferin and some derivatives of adamantane. The most suitable concentration was determined using flow cytometer. The antiviral effect on tick-borne encephalitis virus infection in glioblastoma cells was determined. Virus concentration was determined using plaque assay. The antibacterial effect was detected by the incubation of bacterial strains with suitable concentration of selected natural substances. The rate of bacterial growth was determined using absorbance measurement at 600 nm and plating on agar plates.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 21.4.2016

.....

Hana Mašková

## **Poděkování**

„Děkuj za málo a najdeš víc“ říká jedno známé moudro. V mém životě se díky jedné velké maličkosti změnil celý život. Díky mému školiteli Jankovi, který mi dal příležitost pracovat v jeho laboratoři, jsem objevila další směr mého života. Tímto bych mu velice ráda poděkovala za příležitost naučit se nové věci, ochotu kdykoliv zodpovědět všechny mé dotazy, seznámení se skvělým kolektivem a především za jeho trpělivost a připomínky při opravování mé práce. Další mé děkuji patří Martinovi a Páji, kteří mě naučili v laboratoři mnoho nového a kdykoliv byli ochotní poradit a řešit jakékoliv problémy. Nesmím opomenout ani rodinu, která mě vždy v mých životních cestách podporovala. Poslední děkuji patří mým kamarádům, díky nimž bych jen těžko hledala další energii v náročných chvílích a mohla s nimi přijít na jiné myšlenky. Díky těmto všem jsem objevila v životě mnohem víc.

**DĚKUJI!!!**

# Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	1
ÚVOD.....	3
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
1.1 Antimikrobiální látky .....	4
1.1.1 Antimikrobiální látky v rostlinách.....	5
1.1.1.1 Resveratrol .....	6
1.1.1.2 $\alpha$ -viniferin.....	7
1.1.1.3 $\delta$ -viniferin.....	8
1.1.1.4 $\epsilon$ -viniferin .....	9
1.1.1.5 R2-viniferin .....	10
1.1.2 Další přírodní antimikrobiální látky .....	11
1.1.2.1 Adamantany .....	11
1.2 Vybrané patogenní organismy.....	13
1.2.1 Viry.....	13
1.2.1.1 Klíšťová encefalitida .....	14
1.2.2 Bakterie.....	15
1.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.2.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	17
1.2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
1.2.2.4 <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> .....	18
2 CÍLE PRÁCE .....	19
3 MATERIÁL A METODY .....	20
3.1 Vybrané přírodní látky.....	20
3.2 Použitá buněčná linie.....	21
3.3 Optimalizace koncentrace přírodních látek .....	21
3.3.1 Ředící řady látek .....	21
3.3.2 Počítání živých buněk.....	22
3.3.3 Určení koncentrace pomocí průtokového cytometru.....	22
3.4 Infekce virem klíšťové encefalidity.....	23
3.5 Plaková titrace .....	25
3.6 Ověření vlivu přírodních látek na standardní kmeny bakterií .....	26
3.7 Inkubace <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> s viniferinem .....	28

4	VÝSLEDKY .....	29
4.1	Optimalizace koncentrace vybraných přírodních látek .....	29
4.2	Infekce buněk inkubovaných s přírodními látkami .....	32
4.3	Plaková titrace odebraných vzorků.....	32
4.4	Ověření účinku přírodních látek na standardní kmeny bakterií .....	38
4.5	Ověření účinku viniferinu na <i>B. burgdorferi</i> s. l. ....	41
5	DISKUZE.....	42
6	ZÁVĚR.....	45
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(-)ssRNA	jednovláknová RNA s negativní polaritou
(+)ssRNA	jednovláknová RNA s pozitivní polaritou
AD-2-OX	adamantan-2-oxim
BOFES	bovine fetal serum, fetální hovězí sérum
BSK II médium	Barbour-Stoenner-Kelly médium II
CASO	Casein Soja Pepton Bouillon
CFU	z anglického colony forming unit, jednotka tvořící kolonie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FSC	forward scatter, přímý rozptyl
IMDM médium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
L15 médium	Leibovitz L15 médium
MOI	z anglického „multiplicity of infection“
mRNA	messenger RNA
MRSA	methicilin rezistentní zlatý stafylokok
OD 600	optical density, optická hustota při vlnové délce 600 nm
PBS	z anglického „phosphate-buffered saline“
PFU	z anglického „plaque forming unit“, plakotvorná jednotka
PI	propidium jodid
PS buňky	porcine kidney stable buňky
PTS	New born Calf serum; precolostrální sérum
RCF	z anglického „relative centrifugal field“
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	z anglického „revolutions per minute“, otáčky/minutu
SSC	side scatter, boční rozptyl

TK-DION AD	1,3,5,7-tetrakarboxy-2,6-dion adamantan
VIN	viniferin
VKE	virus klíšťové encefalidity

# ÚVOD

Přírodní antimikrobiální látky jsou již po celá staletí významnou součástí klasické medicíny, a to především pokud se jedná o látky rostlinného původu. V některých částech světa lidé stále věří v léčebné účinky bylin a dalších rostlin více než účinkům dnešních syntetických léků, v jiných částech se k nim opět navracejí. Je známo, že rostliny mají např. protizánětlivé účinky, mírní bolesti, snižují horečku, fungují jako přírodní antibiotika, mají různé podpůrné a tlumící účinky a k tomu mají mnoho dalších účinků (Wenzel, 2014). Obecně v přírodních látkách lze tedy předpokládat velký potenciál antimikrobiálních účinků, ať se jedná o rostliny či jiné přírodní látky.

V dnešní době se stále více objevuje problém s patogenními mikroorganismy, kdy se jejich léčba stává složitější kvůli vznikající rezistenci. To je důvodem pro zkoumání dalších možných bioaktivních látek, jež by se mohly stát dalšími potenciálními antimikrobiálními látkami. Tato práce se zabývá zkoumáním možných antivirotických a antibakteriálních účinků vybraných přírodních látek v různých koncentracích proti viru klíšťové encefalidity, vybraným standardním kmenům bakterií a některým kmenům *Borrelia burgdorferi* sensu lato.



# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou všechna činidla syntetického, polosyntetického či přírodního původu, jejichž účinkem jsou mikrobiální buňky buď zabíjeny nebo je inhibován jejich růst a rozmnožování. Jedná se tedy o látky používané k léčbě nebo prevenci různých infekčních onemocnění. Z tohoto důvodu by tyto látky měly s vysokou účinností působit na infekční mikroorganismy a jen minimálně, nejlépe žádným způsobem, ovlivňovat makroorganismus (Sandle, 2016; Hynie, 1998). Na rozdíl od antibiotik, která jsou často s těmito látkami zaměňována, působí i proti virům antivirotickým účinkem, a stejně jako antibiotika mají antibakteriální, antiprotozoální a antifungicidní účinek (Prasun a Wakode, 2015).

Z historického hlediska je již tisíce let známo, že rostliny mají rozsáhlé léčebné vlastnosti. Díky rozvoji tradiční medicíny můžeme pozorovat, že využívání rostlin a jejich produktů se předává po celá staletí z generace na generaci. Léčivé rostliny a přírodní léky hrají významnou roli i v dnešní době, kdy dle Světové zdravotnické organizace (WHO) přibližně 80% populace využívá rostliny jako součást zdravotní péče (Foster a kol., 2005). Největší rozvoj antimikrobiálních látek se odehrál po objevu mikroorganismů v polovině 19. století. Chemoterapie se začala rozvíjet jako hlavní léčebná metoda proti mikroorganismům, které jsou zodpovědné za různé infekční choroby. První syntetickou antimikrobiální látkou na světě, objevenou Paulem Erlichem v roce 1910, byl salvarsan (jako lék proti syfilisu). Roku 1928 Alexander Fleming zjistil, že růst bakterie *Staphylococcus aureus* je inhibován v zóně, kterou obklopovala kontaminace modré plísně rodu *Penicillium* v kultivačních miskách. Toto zjištění vedlo k objevu penicilinu, významného antibiotika, jehož hojné používání začalo během druhé světové války. Během následujících let nastala zlatá éra syntetických antimikrobiálních látek. Po celém světě vědci dále syntetizovali další antimikrobiální látky jako např. streptomycin, tetracyklin a mnoho dalších (Saga a Yamaguchi, 2009).

Celkově vývoj antimikrobiálních léčiv představuje jeden z nejvýznamnějších pokroků v terapii léčby, jelikož účinný způsob léčení vážných infekcí zlepšil kvalitu života a umožnil pokroky i v mnoha dalších oblastech medicíny. Například chemoterapie nádorů, transplantace orgánů a velké chirurgické výkony (zvláště provázené zavedením protetikých

pomůcek) jsou takřka plně závislé na dostupnosti vhodných antimikrobiálních léčiv (Bertram a kol., 1994). Z tohoto důvodu a vzhledem ke stále se zvyšující rezistenci a odolnosti mikroorganismů je třeba zkoumat další potenciální antimikrobiální látky.

### **1. 1. 1 Antimikrobiální látky v rostlinách**

Rostliny tvoří rozsáhlý zdroj nových léčebných sloučenin. Existuje důkaz, že Neandertálci, žijící cca před šedesáti tisíci lety, používali rostliny rodu *Alcea* (rod topolovka), které jsou v dnešní době stále hojně používány v některých částech světa. Již Hippocrates v 5. stol. př. n. l. popsal léčebné účinky u přibližně 300 – 400 rostlin (Thompson, 1983). Během 1. stol. př. n. l., Dioscorides sepsal *De Materia Medica*, první rostlinný přehled pro medicínu, který se později stal prototypem pro moderní medicínské lékopisy (Stockwell, 1988). Léčivé rostliny byly používány jako lék dlouho před rozvojem západní medicíny a před příchodem vědy a techniky (Abdallah, 2011). Jako příklad lze uvést tradiční čínskou medicínu, která používá zejména rostlinné materiály pro organizovaný léčebný systém hrající důležitou roli v boji proti různým nemocem a k zachování zdraví (Zuo, 2012).

Rostliny produkují celou řadu různých sloučenin, které nemají zvláštní význam pro primární metabolismus, ale hrají roli v přizpůsobivosti rostlin na nepříznivé podmínky prostředí. Mohou také ovlivňovat ostatní rostliny, mikroorganismy a zvířata z jejich bezprostředního nebo širšího životního prostředí. Všechny tyto organické sloučeniny představují sekundární metabolity vyskytující se jako meziprodukty nebo konečné produkty sekundárního metabolismu rostlin. Tyto biologicky aktivní látky, na rozdíl od typických rostlinných znaků (jako jsou např. barva a vůně květů a plodů, charakteristická chuť koření, zeleniny), podporují fungování rostlinného organismu a tím i biologickou a farmakologickou účinnost rostlin (Hartmann, 2008). Odhaduje se, že 14-28% vyšších rostlin je medicínsky využíváno a 74% známých farmakologicky aktivních rostlinných složek bylo objeveno v návaznosti na etnomedicínské využití rostlin (Farnsworth a Soejarto, 1991).

Léčivé rostliny jsou i dnes bohatým zdrojem antimikrobiálních látek. Na léčebné účinky přírodních produktů se postupně začíná klást větší důraz a dochází tak k rostoucímu zájmu o tyto produkty po celém světě (Olowosulu a Ibrahim, 2006). Sekundární metabolity produkované rostlinami byly zkoumány *in vitro* a bylo zjištěno, že mnoho z těchto produktů má antimikrobiální aktivitu (Cowan, 1999). Tato rostlinná antibiotika jsou klasifikována

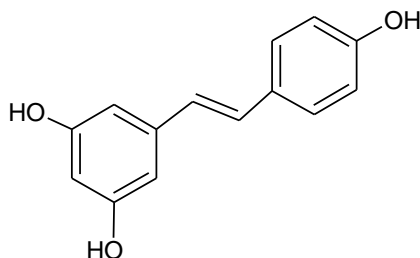
jako tzv. fytoanticipiny, tj. chemické sloučeniny působící jako bariéra proti mikroorganismům, a nebo jako tzv. fytoalexiny, tedy sloučeniny vznikající v reakci na stres jako např. při napadení mikroorganismy (VanEtten a kol., 1994). Antibakteriální sekundární metabolity jsou rozdělovány do třech velkých molekulových rodin na terpeny, alkaloidy a fenolické sloučeniny.

Fenoly a polyfenoly jsou jedna z největších skupin sekundárních metabolitů, které vykazují antimikrobiální aktivitu (Bobbarala 2012). Je dokázáno, že tyto sloučeniny mají pozitivní efekt na lidské zdraví, jelikož vykazují protizánětlivé, antimikrobiální účinky a hrají roli v prevenci kardiovaskulárních chorob (Ivanova, 2011). Jsou také považovány za původce antioxidačních účinků hroznů a vína (Burns a kol., 2000). Vinná réva (*Vitis vinifera*) obsahuje nejvíce fenolických sloučenin ve slupce hroznů, u některých druhů i v listech. Obecně je lze rozdělit do dvou základních skupin na flavonoidy a ne-flavonoidy na základě jejich primární chemické struktury (Gómez Gallego, 2011; Liang a kol., 2011). Tyto sloučeniny jsou jedním z hlavních faktorů kvality hroznů a vína, díky jejich přínosu na barvu vína, oxidační reakce, interakce s proteiny a dalším vlastnostem jako je například trpkost (Figueiredo-González, 2012). V poslední době postupně roste zájem o tyto sloučeniny, a to především kvůli snaze omezit použití syntetických antioxidantů (Anastasiadi a kol., 2012). Mezi ne-flavonoidy řadíme i skupinu stilbenů, do které spadají i vybrané přírodní látky nacházející se ve vinné révě (resveratrol a viniferiny). Stilbeny jsou malá skupina významných fytoalexinů, jež vznikají jako reakce na různé biotické a abiotické stresy, jako např. při ataku patogenů (Langcake a Pryce, 1976). Mnoho stilbenů jsou dimery, trimery a tetramery, které se vytvoří oxidativním spojením z resveratrolu nebo derivátů resveratrolu (Hernâni a kol., 2012).

### **1.1.1.1 Resveratrol**

Hlavním zástupcem rodiny stilbenů je resveratrol (Obr. 1), vyskytující se ve vinné révě, burských oříšcích, v menším množství v borůvkách, červeném zelí, špenátu a v některých bylinkách. Resveratrol existuje ve dvou konformacích, a to jako cis-trans isomer (Burns a kol., 2002; Grippi a kol., 2008). Trans-resveratrol se na rozdíl od cis-resveratrolu vyskytuje hojněji a je stabilnější na světle (Seeram a kol., 2005). V poslední době se především oceňují jeho kardiovaskulární, antitrombotické, antikancerogenní, antidiabetické a neuroprotektivní účinky. Využívá se nejen ve farmaceutickém a potravinovém průmyslu, ale také v kosmetickém průmyslu. Bylo zjištěno, že chrání buňky

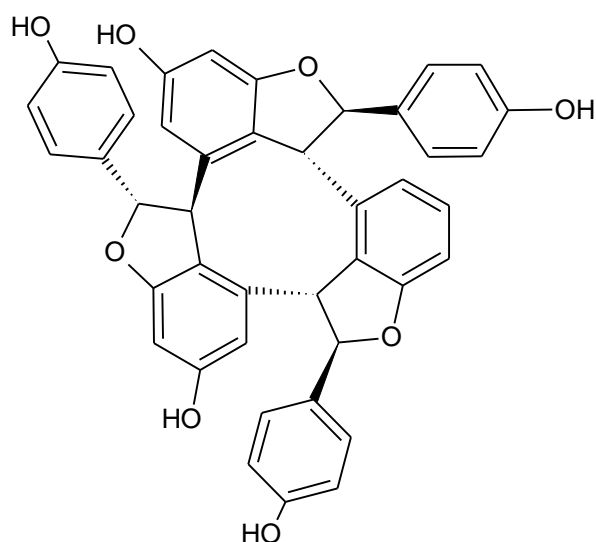
před poškozením oxidací a tím pomáhá zpomalovat stárnutí těchto buněk (Švajdová, 2011; Jeandet, 2012). Ve vinné révě se vyskytují i oligomery resveratrolu, tzv. viniferiny. Jelikož jsou strukturou podobné resveratrolu dá se předpokládat, že i viniferiny mohou mít podobné účinky, což některé studie i dokazují (Zghonda a kol., 2012).



**Obrázek 1:** Vzorec resveratrolu.

### 1.1.1.2 $\alpha$ -viniferin

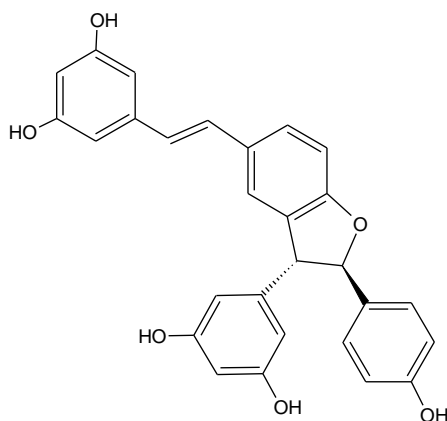
Doposud bylo objeveno přibližně sedm druhů viniferinu. Jedním ze zástupců viniferinu je  $\alpha$ -viniferin. Jedná se o trimer resveratrolu (Obr. 2), který byl poprvé izolován z rostliny *Caragana chamlagu*, tj. čičišník (Kitanaka a kol., 1990). Před několika lety byl  $\alpha$ -viniferin izolován i z jiných druhů rostlin a bylo zjištěno, že inhibuje cyklooxygenázovou a cytotoxickou aktivitu (Lee a kol., 1998). Mezi jeho další účinky patří protizánětlivé, antioxidantní, anti-artritidní a anti-tumorozní vlastnosti (Lee a kol., 2004; Jin a kol., 2012). Podle dalších studií bylo zjištěno, že  $\alpha$ -viniferin má inhibiční vliv na lidský cytochrom P450, především na CYP2C19 a 3A4 izoenzymy (Sim a kol., 2014). Pokud je aktivita těchto oxidativních enzymů pozměněna, může docházet k nechtěným interakcím, tj. vzájemnému ovlivňování, snížení či zvýšení efektivity, mezi léky, nebo mezi léky na přírodní bázi a léky syntetickými (Guengerich, 1997). Předpokládá se, že  $\alpha$ -viniferin obsažený v přírodním léku tedy způsobuje jednu z výše jmenovaných interakcí (Sim a kol., 2014). Jeho velká molekula také působí i jako významný inhibitor enzymu acetylcholinesterázy, která degraduje acetylcholin (Sung a kol., 2002). Při Alzheimerově chorobě se v těle nachází tohoto enzymu vysoké množství, čímž dochází k obrovské degradaci acetylcholinu, který za normálních okolností funguje jako jeden z nejdůležitějších neurotransmiterů (Čolović a kol., 2013).  $\alpha$ -viniferin se váže na acetylcholinesterázu, tím brání její vazbě na acetylcholin, a proto není acetylcholin degradován a jeho hladina v těle neklesá (Sung a kol., 2002).



**Obrázek 2:** Vzorec  $\alpha$ -viniferinu.

### 1.1.1.3 $\delta$ -viniferin

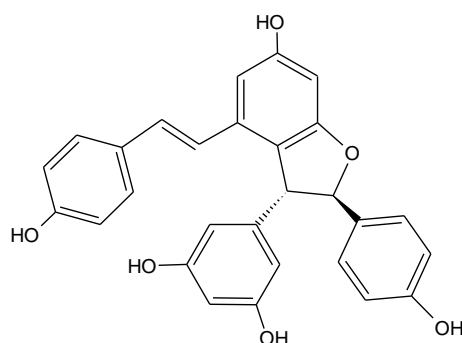
$\delta$ -viniferin je složením dehydrodimer resveratrolu (Obr. 3) nacházející se v listech vinné révy napadených plísní *Plasmopara viticola*. Vzniká podobným způsobem jako  $\epsilon$ -viniferin, jelikož je jeho trans izomerem. Při napadení rostliny plísní se resveratrol oxiduje na  $\delta$ -viniferin popř.  $\epsilon$ -viniferin jako obranná reakce na infekci (Pezet a kol., 2003; Djoukeng a kol., 2009). Bylo prokázáno, že  $\delta$ -viniferin se nachází v rozdílných koncentracích v různých odrůdách brazilského vína, a to od 0 mg/l až do 22 mg/ml. Předpokládá se, že pětinnový podíl stilbenů ve vinné révě představuje právě  $\delta$ -viniferin (Vitrac a kol., 2005).



**Obrázek 3:** Vzorec  $\delta$ -viniferinu.

#### 1.1.1.4 $\epsilon$ -viniferin

Jako  $\epsilon$ -viniferin označujeme dimer resveratrolu (Obr. 4). Jedná se o pravděpodobně nejvíce zkoumaný oligomer resveratrolu. Lze ho přirozeně nalézt ve vinné révě, víně i rostlině *Dryobalanops aromatica*, tj. pětikřídlec vonný (Wibowo a kol., 2011). Bylo zjištěno, že pokud byly určité odrůdy vína napadeny šedou plísní, tak při jejím rozvoji byla koncentrace  $\epsilon$ -viniferinu nižší a s následnou šířící se infekcí do dalších rostlinných buněk se hladina  $\epsilon$ -viniferinu zvyšovala (Landrault a kol., 2002). Jeho pozitivní účinky byly prokázány v mnoha různých směrech. Je zjištěno, že  $\epsilon$ -viniferin částečně vyvolává apoptózu u leukemických B-buněk (Billard a kol., 2002), má hepatoprotektivní účinek na kulturu krysích hepatocytů (Oshima a kol., 1995), dále inhibuje lidský cytochrom P450, konkrétně CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP4A izoenzymy (Piver a kol. 2003) a také byl prokázán jeho antioxidační účinek (Privat a kol., 2002). Dle výzkumu Zghondy a kol. (2012)  $\epsilon$ -viniferin stimuluje vaskulární endotelové buňky při poranění, což vede k jejich proliferaci a následnému rychlejšímu hojení zranění. Dále chrání tyto buňky proti cytotoxickému efektu  $H_2O_2$ , *in vitro* inhibuje angiotensin konvertující enzym a u hypertenzních myší snižuje krevní tlak.  $\epsilon$ -viniferin obsažený v extraktu Vineatrol<sup>®</sup>30, vyvinutém francouzskou firmou Actichem a BRECO GmbH, inhibuje lidskou topoizomerázu typu II $\alpha$ , při koncentraci vyšších než 25  $\mu$ M, čímž zabráňuje topoizomeráze rozvolňovat DNA (Dicker, 2012).

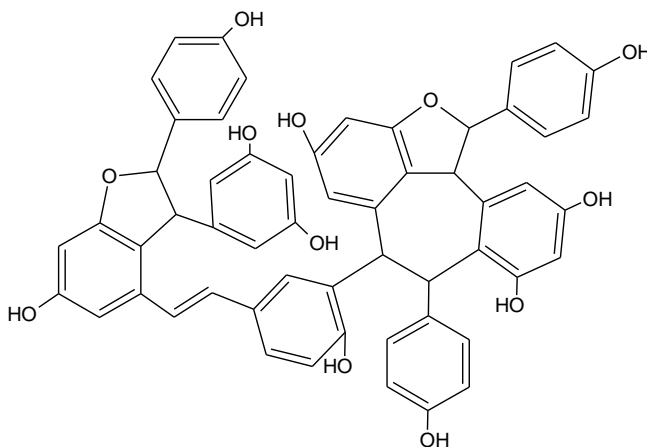


**Obrázek 4:** Vzorec  $\epsilon$ -viniferinu.

Různorodé využití  $\epsilon$ -viniferinu je zkoumáno nejen pro jeho vliv na lidské tělo a zdraví, ale také v souvislosti s bakteriemi. Byl zkoumán jeho účinek proti *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* a také proti methicilin rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (zlatému stafylokokovi, tj. MRSA).  $\epsilon$ -viniferin měl na všechny tyto rody bakterií inhibiční účinek, čímž bylo prokázáno, že působí jako antimikrobiální činidlo proti většině Gram-pozitivních bakterií (Basri a kol., 2014).

### 1.1.1.5 R2-viniferin

R2-viniferin (Obr. 5), známý také pod názvem Vitisin A, je tetramer resveratrolu skládající se z  $\epsilon$ -viniferinu a ampelosinu B. Jeho přítomnost byla prokázána i u české odrůdy vína Cabernet Moravia (Soural a kol., 2015). Z dosavadních výsledků zkoumání tohoto viniferinu nebyl prozatím prokázán pozitivní vliv na lidské zdraví. Na druhou stranu však byl zjištěn neblahý fakt, že vyvolává apoptózu kardiomyocytů u krys (Seya a kol., 2009).

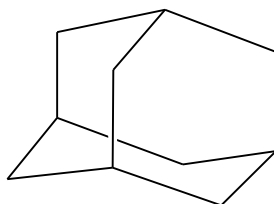


**Obrázek 5:** Vzorec R2-viniferinu.

## 1. 1. 2 Další přírodní antimikrobiální látky

### 1.1.2.1 Adamantany

Adamantany (Obr. 6), nebo-li tzv. diamantoidy, jsou chemickým složením cykloalkany, jež byly poprvé izolovány z hodonínské ropy v roce 1930 (Landa a Macháček, 1933). Jelikož se této látky nachází v ropě jen malé množství (0,02 - 0,03%), tak se ropa jako zdroj adamantanů využívala jen do doby, než se objevila metoda jejich velkokapacitní syntetické výroby (Vícha a Potáček, 2004). Výrobu adamantanu z esteru poprvé provedl Vladimír Prelog roku 1941 (Prelog a Seiwerth, 1941). Jejich vznik probíhá pravděpodobně dvěma cestami, a to izomerizací sloučenin od cyklohexanu po skvalen pomocí Lewisových kyselin či střídavou oxidací a polymerizací lipidů. Adamantany však již mohou být přítomny v organickém materiálu (Vícha a Potáček, 2004). Adamantan našel postupně uplatnění ve farmakologii, jako antivirotikum proti viru chřipky typu A , a také v chemii polymerů, kde se připravovaly velmi tepelně odolné polymery na bázi adamantanu využívané v kosmonautice (Tříška, 2012).



**Obrázek 6:** Vzorec adamantanu.

Za jednu z největších výhod adamantanu je brána jeho relativně malá velikost, cca 10 nm, a také jeho struktura, do níž lze uzavřít např. léčivé látky a tím je přímo dopravit do buňky, tzn. využít adamantan jako pouzdro při transportu léků (Ramezani a Mansoori, 2007). Výhodou je i fakt, že diamantoidy, konkrétně amantadin (1-aminoadamantan) a rimantadin (1-(1-adamantyl) ethanamin) mají v krvi relativně dlouhý poločas rozpadu (přibližně 12-36 hodin), čímž může lék zakomponovaný v nich působit déle než za normálních okolností (Mansoori, 2007).



Deriváty adamantanu mají různorodé využití a stále jsou syntetizovány nové deriváty, ale i zjišťovány nové účinky. Amantadin (1-aminoadamantan) a memantin (3,5-dimethyl-1-aminoadamantan) má využití v medicíně jako lék na neurodegenerativní onemocnění jako je např. Parkinsonova choroba (Mirzoyan a kol., 2014). Dále také u amantadinu byl zjištěn v *in vitro* pokusu inhibiční účinek na replikaci viru horečky dengue (Koff a kol., 1980).

## 1.2 Vybrané patogenní organismy

Za patogeny označujeme mikroorganismy, které jsou schopné vyvolávat choroby. Od konce 19. století, kdy se začal tento termín užívat, vědci zkoumali bakterie, viry, houby, parazity jako původce onemocnění v hostiteli (Casedevall a Pirofski, 2014). Hostitelem může být člověk, živočich, rostlina, houba či jiný mikroorganismus.

### 1.2.1 Viry

Viry jsou malé nebuněčné infekční organismy obsahující genetickou informaci ve formě jednovláknové nebo dvouvláknové DNA či RNA, která může či nemusí být zabalena v proteinovém obalu - kapsidě. Tyto mikroorganismy nejsou schopny se nezávisle replikovat mimo svého hostitele. Jedná se o intracelulární parazity, kteří využívají buňku k získání energie, intermediárnímu metabolismu, pro replikaci své nukleové kyseliny a syntézu proteinů (Madigan a kol., 2012). Předpokládá se, že DNA viry vznikly osamocněním plazmidu a RNA viry z uvolněné mRNA (Schindler, 2014). Jako první byl roku 1892 objeven virus tabákové mozaiky Dimitriem Ivanovskim (Zaitlin, 1998). Pomocí elektronové mikroskopie však byly viry pozorovány až roku 1939 (Ruska a kol., 1939).

Viry jsou vysoce specifické organismy schopné infikovat pouze svého specifického hostitele. Lze je tedy rozdělit do skupin na bakteriofágy – infikující bakterie, rostlinné viry, mykoviry a viry živočišné. Další dělení zahrnuje komplexní vlastnosti virů jako je tvar, velikost, obal a místo replikace (Schindler, 2014). Nejčastějším dělením je však Baltimorovo dělení podle genetické informace, a to na viry s dvouvláknovou DNA, jednovláknovou (ss) DNA, dvouvláknovou RNA, (+)ssRNA a (-)ssRNA, retroviry a viry s dvouvláknovou DNA nejprve transkribovanou do RNA a následně reverzně přepisovanou do DNA.

Po vniknutí viru do organismu následuje jeho adsorpce na vhodnou buňku. Vir tak je schopen infikovat pouze tuto danou buňku a nikoliv jinou. Následuje vniknutí virionu do buňky mechanismem endocytózy, kde se poté pomocí hostitele tato informace množí a vytváří virové proteiny. Vznikne tak nová virová částice, která po dozrání může z buňky uniknout a infikovat další buňky (Madigan a kol., 2012). Těmito všemi kroky viry mění funkci, ale i strukturu buňky a mají na buňku cytopatický efekt. Mnoho virů inhibuje tvorbu hostitelské DNA, RNA či proteinů, s čímž souvisí i následná fragmentace či přestavba chromozomů. Lze také předpokládat i následné změny vlastností infikované buňky, jak její růst a velikost, tak její možné změny v imunitní odpovědi (Albrecht a kol., 1996).

### 1.2.1.1 Klíšťová encefalitida

Virus klíšťové encefalidity (VKE) řadíme do čeledi *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. Do tohoto rodu dále zařazujeme virus horečky dengue, virus žluté zimnice, západonilský virus, ale také Zika virus. Většina flavivirů je přenášena členovci (komáry či klíšťaty), proto se řadí mezi tzv. arboviry. Celosvětově způsobují flaviviry vysokou morbitu a mortalitu (Gubler a kol., 2007). Virus klíšťové encefalidity přenášejí klíšťata a po celém světě má mnoho příbuzných kmenů jako je např. virus vrtivky, virus Langat, virus Powassan, virus horečky kyasanurského lesa a také virus omské hemoragické horečky (Růžek a kol., 2015).

Z historického hlediska byl VKE poprvé pozorován lékařem H. Schneiderem roku 1931, kdy zaznamenal výskyt sezónní nemoci s podobnými příznaky u několika pacientů (Schneider, 1931). Na území Československa se VKE poprvé objevil roku 1948. V tomto období propukla největší epidemie na Vyškovsku, kde bylo ošetřeno cca 60 pacientů s virovou neuroinfekcí (Hloucal, 1949). V dnešní době rozlišujeme tři podtypy VKE – evropský, dálnovýchodní a sibiřský. Evropský subtyp s prototypovým kmenem Neudoerfl se vyskytuje v oblastech střední Evropy, jako je např. Německo, Rakousko, Švýcarsko, Česká republika, Francie. Dálnovýchodní typ, kde je významným kmenem např. kmen Sofjin, se vyznačuje velmi závažným průběhem a vyskytuje se v Rusku, Číně, Japonsku, Litvě a Ukrajině. Do posledního subtypu – sibiřského jsou řazeny kmeny izolované v centrální Sibiři s prototypovými kmeny Vasilchenko a Zausaev (Růžek a kol., 2015; Ecker a kol., 1999; Gritsun a kol., 2003).

Virion VKE má kulovitý tvar s velikostí přibližně 50 nm, skládající se z proteinového obalu – kapsidy a z genetické informace ve formě jednovláknové RNA s pozitivní polaritou. Kapsida je obalena membránou, na které najdeme proteiny E (angl. envelope) a M (angl. membrane) (Mansfield a kol., 2009). Při infekci buňky virem KE dochází k jeho navázání na receptor buňky a následné endocytóze. Ta vyvolá konformační změnu proteinu E, což způsobí následné uvolnění virové nukleokapsidy a dojde tak k uvolnění virové RNA. Pozitivní virová RNA slouží jako templát pro syntézu proteinů a také pro tvorbu negativní RNA, jež následně slouží pro syntézu genetické informace nových virových částic (Růžek a kol., 2015). U infikovaných buněk dochází k přestavbám endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu, což vyvolává tvorbu struktur, které shromažďují virové kompartmenty v omezeném prostoru a vytváří tak prostředí vhodné pro replikaci VKE (Růžek a kol., 2009; Palus a kol., 2014). Dále dochází k produkci interferonu typu I, čímž je indukován

antivirotický účinek okolních buněk pomocí parakrinního efektu, ale také může docházet k apoptóze samotné infikované buňky (Růžek a kol., 2015). Interferon typu I také indukuje expresi proteinu Viperin, jenž silně inhibuje syntézu KE (Upadhyay a kol., 2014).

Obecně lze rozdělit průběh infekce do několika stádií. V prvním stádiu se VKE dostává z krevsajícího klíštěte (v České republice se jedná o klíště *I. ricinus*) do těla hostitele, kde nejprve dochází k transportu do spádových lymfatických uzlin, následně replikaci VKE a rozšíření do dalších orgánů v těle. Tyto děje jsou doprovázeny nespecifickými příznaky infekce - zvýšenou teplotou, bolestmi hlavy, kloubů a svalů (Mandl, 2005; Málková a Fraňková, 1959). Po několika dnech dochází k rozvoji další fáze, ve které se VKE dostává do centrální nervové soustavy, kde napadá neurony. To vede k rozvoji encefalitidy (zánětu mozku) spojené s vysokými horečkami, nevolností, ztuhnutím šíje a ve vážných případech k obrně svalů jazyka, lícních svalů i dolních končetin až ke smrti (Hirano a kol., 2014; Grešíková, 1999).

## 1. 2. 2 Bakterie

Bakterie jsou jedny z nejrozšířenějších malých jednobuněčných organismů vyskytující se prakticky všude. Jedná se o velmi odolná prokaryota, která bez problémů zvládají nízké i vysoké teploty a mohou růst na jakémkoliv povrchu, který je jim živnou půdou. Bakterie mohou být prospěšné, ale některé z nich jsou patogeny lidí a zvířat vyvolávající mnoho onemocnění. Svou vysokou adaptabilitou jsou schopné se přizpůsobit daným podmínkám a prostředí (Baron, 1996). V dnešní době tak vzniká problém, kdy kvůli vysoké odolnosti některých patogenních bakterií a jejich schopnosti reagovat na změny dochází ke vzniku jejich rezistence na antibiotika a tím i k následnému šíření těchto bakterií a potřebě nacházet stále nové léky na léčbu bakteriální infekce (Andersson, 2003).

Bakterie rozdělujeme podle Grammova barvení na dvě základní skupiny, grampozitivní a gramnegativní bakterie. Mezi grampozitivní bakterie řadíme například bakterie rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus* a naopak zástupcem gramnegativních bakterií je *Escherichia* či *Haemophilus* (Struthers a Westran, 2003).

### 1.2.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je anaerobní gramnegativní bakterie tyčkovitého tvaru. Za normálních okolností se vyskytuje v tlustém střevě jako běžný komenzál teplokrevných živočichů (Bednář a kol., 1994). Existuje několik různých sérotypů *E. coli* dle jejich typu antigenů jako např. sérotyp O157:H7. Bylo zjištěno, že tento sérotyp zodpovídá za kontaminaci hovězího masa, čímž se může stát příčinou sporadických infekcí. U člověka pak způsobuje průjmy, křeče v břiše s možnou zvýšenou teplotou (Vogt a Dippold, 2005).

Všechny tyto patogenní kmeny *E. coli* lze rozdělit do několika základních skupin (Beneš a Machala, 2011; Bednář a kol., 1994; O'Brien a Holmes, 1987; Schindler, 2014):

- enterotoxigenní kmeny produkující toxin, jenž po navázání na buňky střeva způsobí zvýšenou sekreci iontů a vody do střeva, čímž vyvolají tzv. cestovatelské průjmy vyskytující se v tropických a subtropických oblastech
- enteroinvazivní kmeny, které s pomocí bílkoviny přilnou na sliznici, proniknou do sliznice, množí se v ní a následně vyvolávají onemocnění podobné úplavici s krvavými průjmy
- enteropatogenní kmeny neprodukující toxiny, avšak vyvolávající silné průjmy u novorozenců s následnou dehydratací a nevstřebáváním živin, což může vést až ke smrti
- enterohemoragické kmeny se váží na endotel tlustého střeva a produkují účinný verotoxin (tzv. shiga toxin) podobný bakterii *Shigella dysenterie* typu 1, čímž v důsledku mohou vyvolat až hemolyticko-uremický syndrom
- enteroadherující kmeny nebo enteroagregující kmeny, jež vytváří bakteriální ostrůvky na povrchu sliznice, způsobují akutní i přetrvávající průjmy u dětí i dospělých a především problémy u lidí s vážnou poruchou imunitního systému jako např. u lidí s AIDS

Infekce bakterií *E. coli* má horší průběh u dětí než u dospělých. Vyšší výskyt infekcí bakterií *E. coli* lze také zaznamenat v oblastech se špatnou kanalizační sítí a horšími hygienickými podmínkami. Občas se však vyskytne i v oblastech, kde došlo ke kontaminaci vody a jídla, jako např. ve Spojených státech amerických a Japonsku (Baron, 1996).

### 1.2.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* je grampozitivní kulovitá bakterie z rodu *Staphylococcus*. Jedná se o bakterii, která se nachází v lidské mikroflóře, a to konkrétně na kůži a sliznicích blízko tělesných otvorů (Schleifer a Kloos, 1975). U oslabených jedinců *S. epidermidis* může vyvolat těžká onemocnění jako je sepse, infekce močových cest či infekce ran. Především se uchytává a množí na dlouhodobě zavedených katetrech, umělých chlopních a endoprotézách, kde vytváří biofilm s polysacharidovou substancí bránící ji před účinkem antibiotik (Bednář a kol., 1994).

### 1.2.2.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* patří mezi grampozitivní bakterie ve tvaru koku. Přirozeně se vyskytuje jako neškodlivá bakterie na kůži, ale i na nosní sliznici či sliznici dýchacího traktu. *S. aureus* také tvoří obrovské množství bílkovinných exoproduktů, které představují antigeny a biologicky aktivní látky vytvářející patogenitu této bakterie. Jako příklad těchto antigenů lze uvést stafylokokový protein A schopný vázat se na imunoglobuliny IgG, IgM a IgA, čímž vyvolá aktivaci komplementu a uvolnění histaminu z leukocytů (Bednář a kol., 1994). *S. aureus* také produkuje toxiny vyvolávající potíže s projevy mírné infekce kůže až po vážné otravy krve (Ala'aldeen a Hiramatsu, 2004). Nejzávažnější je však fakt, že některé bakterie *S. aureus* jsou rezistentní vůči mnoha antibiotikům, jako jsou např. penicilin, methicilin, vankomycin či chinolin, čímž se léčba infekcí značným způsobem ztěžuje a bakterie má větší možnost přežívání (Lowy, 2003).

#### 1.2.2.4 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

*Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) jsou gramnegativní bakterie ve tvaru spirochéty pohybující se pomocí bičíků šroubovitým pohybem. Přenašečem spirochét je klíště rodu *Ixodes*, které přisátím na člověka přeneše spirochéty a ty následně mohou vyvolat tzv. Lymskou boreliózu (Burgdorfer a kol., 1982). Doposud bylo objeveno 21 druhů řadících se do druhového komplexu *B. burgdorferi* s. l. (Rudenko a kol., 2011a; Casjens a kol., 2011; Ivanova a kol., 2014; Pritt a kol., 2016). Jen některé z nich však vyvolávají Lymskou boreliózu a také se liší místem svého výskytu a různými projevy nemoci (Margos a kol., 2010; Margos a kol., 2011). U druhů *B. burgdorferi* sensu stricto (s. s.), *B. afzelii* a *B. garinii* byla prokázána patogenita vyvolávající Lymskou boreliózu. Všechny tyto kmeny se vyskytují v Evropě, *B. burgdorferi* s. s. i v Severní Americe a zbylé dva kmeny v Asii. Každý z nich se však projevuje jinými symptomy nemoci – *B. burgdorferi* s. s. především artritidními problémy, *B. afzelii* projevy na kůži a *B. garinii* s postižením centrální nervové soustavy (van Dam, 2002; Stanek a Strle, 2009). Mezi další kmeny objevené u pacientů s Lymskou boreliózou řadíme *B. bavariensis*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana* (Casjens a kol., 2011; Schwab a kol., 2013). Existují však i kmeny bez zjištěné patogenity, jako je např. *B. californiensis*, *B. andersonii*, *B. carolinensis* ze Severní Ameriky, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. sinica* z Asie a evropský kmen *B. finlandensis* (de Carvalho a kol., 2008; Rijpkema a kol., 1997; Diza a kol., 2004; Casjens a kol., 2011; Rudenko a kol., 2011b).

## 2 CÍLE PRÁCE

- Optimalizace vhodné koncentrace viniferinu, adamantan-2-oximu a 1,3,5,7-tetrakarboxy-2,6-dion adamantanu, při které glioblasty přežívají
- Infekce glioblastů virem klíšťové encefalitidy ošetřených v různých časových intervalech vybranými přírodními látkami
- Provedení plakové titrace odebraných vzorků a zjištění titru viru u daných variant
- Ověření vlivu vybraných přírodních látek na množení vybraných standardních kmenů bakterií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*) a vybraných kmenů *Borrelia burgdorferi* s.l. (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. finlandensis*)

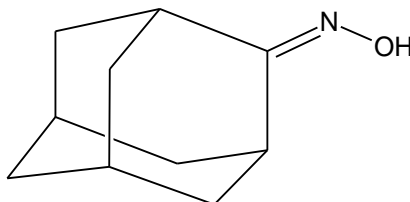


### 3 MATERIÁL A METODY

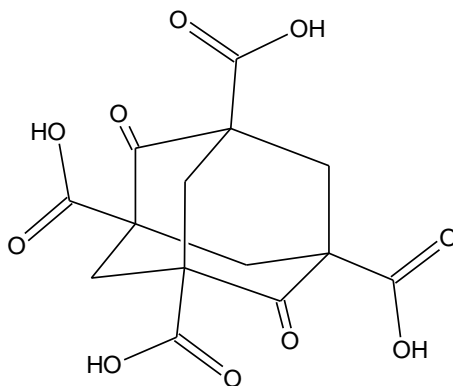
#### 3.1 Vybrané přírodní látky

Jako zástupce rostlinných přírodních látek byla obdržena směs viniferinů (dále VIN) purifikovaná v laboratoři prof. RNDr. Třísky, CSc. Bylo dodáno 0,16 g viniferinu, z něhož byl vyroben zásobní roztok v dimethylsulfoxidu (DMSO) o koncentraci 20 mg/ml. Tento zásobní roztok byl následně přefiltrován a poté uchováván v chladu bez přístupu světla. Tento zásobní roztok byl použit k přípravě druhého zásobního roztoku (1 mg/ml v 10% DMSO v PBS (phosphate-buffered saline; 0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,4)).

Dalšími zkoumanými látkami od prof. RNDr. Třísky, CSc. byly deriváty adamantanu, konkrétně adamantan-2-oxim (Obr. 7, dále AD-2-OX) a 1,3,5,7-tetrakarboxy-2,6-dion adamantan (Obr. 8, dále TK-DION AD). Tyto látky byly dodány ve formě prášku a 0,2 g těchto látek bylo rozpuštěno v 10 ml DMSO a přefiltrováno, čímž byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 20 mg/ml. Z těchto zásobních roztoků byly vytvořeny druhé zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml v 5% DMSO v PBS.



**Obrázek 7:** Vzorec adamantan-2-oximu.



**Obrázek 8:** Vzorec 1,3,5,7-tetrakarboxy-2,6-dion adamantanu.

## 3.2 Použitá buněčná linie

S ohledem na cílové buňky, které jsou napadány virem klíšťové encefalitidy, byla jako vhodná buněčná linie vybrána linie glioblastů. Buňky byly kultivovány v IMDM médiu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Biowest) s 10% BOFES (bovine fetal serum, Sigma-Aldrich), 1% antibiotik (Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 units/ml, Streptomycin 100 µg/ml) a 1% glutaminem při 37°C. Buňky byly pravidelně dvakrát týdně pasážovány. Práce s buňkami byla vždy prováděna ve sterilním prostředí, v biohazard boxu.

## 3.3 Optimalizace koncentrace přírodních látek

Buňky v IMDM médiu byly nasazeny na 24 jamkový panel, kdy do každé jamky bylo přidáno 0,5 ml buněčné suspenze obsahující  $4 \times 10^5$  buněk/ml. Panel byl ponechán po dobu 4 hodin při 37°C, aby buňky adherovaly na povrch jamky. Po čtyřech hodinách bylo médium opatrně odebráno a bylo přidáno IMDM médium spolu s různými koncentracemi přírodních látek.

### 3.3.1 Ředící řady látek

IMDM médium s VIN bylo připraveno ředící řadou, kdy pro první ověření vhodné koncentrace byla zvolena nejvyšší možná koncentrace 100 µg/ml v 0,5% DMSO. Do dalších pěti zkumavek byla vytvořena desítková ředící řada látek s koncentracemi 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml se snižující se koncentrací DMSO. Na panelu také byly kontroly ve formě čistého média a média s 0,5% DMSO (vše v triplikátech). Tyto koncentrace byly přidány k buňkám a byly inkubovány 4 dny při 37°C.

Obdobným způsobem bylo připraveno IMDM médium s vybranými deriváty adamantanu. Rozdílné byly jen zkoumané koncentrace, a to konkrétně jako nejvyšší koncentrace bylo zvoleno 500 ng/ml v  $2,5 \times 10^{-3}$  % DMSO. Pomocí dvojkového ředění byly vytvořeny další koncentrace 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml a 15,625 ng/ml se stále se snižující koncentrací DMSO. Následně byly tyto koncentrace přidány k buňkám a inkubovány stejným způsobem jako buňky s VIN.

### 3. 3. 2 Počítání živých buněk

Po čtyřech dnech bylo médium z jamek opatrně odebráno a buňky promyty 0,5 ml sterilního PBS, které bylo následně odebráno, dále bylo přidáno 50  $\mu$ l trypsinu (Biowest) a na 5 minut byl panel vrácen do termoboxu. Poté byly buňky rozsuspendovány ve 300  $\mu$ l IMDM média.

K počítání buněk bylo potřeba buňky v poměru 1:1 obarvit trypanovou modří a živé buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem. V Bürkerově komůrce bylo spočítáno třikrát 25 malých čtverců a následným výpočtem byl u každé jamky zjištěn počet buněk v 1 ml.

Takto byl proveden hrubý odhad přípustných koncentrací VIN, kdy musel být brán ohled i na přípustnou koncentraci DMSO, proto byl proveden i pokus s desítkovou řadící řadou DMSO od 0,5% až do  $5 \times 10^{-6}$  %. Z těchto pokusů bylo zjištěno, že nejvyšší přípustná koncentrace DMSO byla 0,1%, od čehož se následně musela odvíjet i koncentrace přírodních látek.

U derivátů adamantanu byl postup přípravy k počítání stejný až na použitý způsob počítání živých a mrtvých buněk. Zde byl použit přístroj Countess<sup>TM</sup> Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Scientific). Obarvená buněčná suspenze byla nanesena na sklíčko určené pro cell counter a byly změřeny procenta přeživších a mrtvých buněk.

### 3. 3. 3 Určení koncentrace pomocí průtokového cytometru

Pro přesnější určení vhodné koncentrace byla tedy použity koncentrace 10  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 0,08  $\mu$ g/ml, 0,016  $\mu$ g/ml a 0,0032  $\mu$ g/ml viniferinu vše již v 0,1% DMSO. Později byly tyto koncentrace doplněny navíc o nejvyšší možnou koncentraci viniferinu 20  $\mu$ g/ml v 0,1% DMSO. U derivátů adamantanu pak byla vybrána nejvyšší zkoumaná koncentrace 500 ng/ml a další koncentrace 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml v 0,0025% DMSO.

Buňky byly i v tomto případě nasazeny na 24 jamkový panel, kdy do jamky bylo přidáno 0,5 ml buněčné suspenze, tentokrát však v koncentraci  $10^5$  buněk/ml. Buňky byly ponechány 4 hodiny při 37°C, aby přilnuly na povrch jamky. Následně bylo médium opatrně odebráno a bylo přidáno 0,5 ml čerstvého média s přírodní látkou o dané koncentraci. Každá

koncentrace byla nanesena třikrát a jako kontrola sloužilo médium s 0,1% DMSO a čisté médium.

Po 4 dnech bylo médium opatrně odebráno, buňky byly promyty 0,5 ml 1% BOFES v PBS, které bylo následně odebráno a bylo přidáno 50  $\mu$ l trypsinu k uvolnění buněk z povrchu jamky. Poté byly buňky rozsuspendovány v 0,5 ml 1% BOFES v PBS a dány do zkumavek určených na průtokový cytometr a uchovávány na ledu.

Počty živých a mrtvých buněk byly v jednotlivých vzorcích určeny pomocí průtokové cytometrie. Jedná se o systém detekce buněk a určení jejich charakteristik pomocí laserů a zrcadel, které dle velikosti (přímý rozptyl = forward scatter; FSC), granularity jednotlivých buněk (boční rozptyl = side scatter; SSC) a fluorescence s ohledem na použité značení. K měření byl použit průtokový cytometr BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). V programu BD Diva bylo potřeba nastavit hodnoty napětí pro různé parametry (FSC = 160; SSC = 330). Jelikož bylo třeba rozlišit mrtvé a živé buňky, proto jako kontrastní látka byl použit propidium jodid (PI; Bio Rad), tudíž bylo nastaveno napětí PE-Texas = 430.

Po takto nastavených parametrech byl změřen kontrolní vzorek bez PI. Následně byl každý vzorek změřen s 1 kapkou PI. Po změření všech vzorků byly vybrány nejvyšší buňkami tolerované koncentrace a ty poté byly následně použity pro další pokusy.

### **3.4 Infekce virem klíšťové encefalitidy**

Pro infekci buněk byl použit vir klíšťové encefalitidy, kmen Neudoerfl, namnožený v glioblastomech, v IMDM médiu o koncentraci  $9,6 \times 10^7$  PFU/ml (plaque forming unit; plakotvorná jednotka).

První den byly nasazeny buňky na tři 24 jamkové panely (pro každou variantu jeden – zobrazení jedné varianty a označení pro jednotlivé látky v Tabulce I) s koncentrací v každé jamce  $3 \times 10^5$  buněk/ml. Na každou jamku bylo přidáno 0,3 ml buněčné suspenze a panely byly inkubovány v boxu při 37°C s 0,5% CO<sub>2</sub> do druhého dne, aby se buňky přichytily na povrch jamky.

**Tabulka I:** Označení jednotlivých látek a kontrol na 24 jamkovém panelu.

	1	2	3	4	5	6
A	VIN (10µg/ml)	VIN (10µg/ml)	VIN (10µg/ml)	VIN (20µg/ml)	VIN (20µg/ml)	VIN (20µg/ml)
B	AD-2-OX.	AD-2-OX.	AD-2-OX.	IMDM MEDIUM	IMDM MEDIUM	IMDM MEDIUM
C	TK-DION AD.	TK-DION AD.	TK-DION AD.			
D	DMSO	DMSO	DMSO			

Pro zjištění účinnosti jednotlivých vybraných přírodních látek byly zvoleny tři varianty infikování a přidání látky. V první variantě byla nejprve provedena infekce buněk a následující den přidána látka. Ve druhé variantě byly buňky v jeden den infikovány a současně byla přidána studovaná látka. Ve třetí variantě byly buňky nejprve ošetřeny látkou a následující den infikovány. Tyto varianty jsou spolu s postupy pro následující dny zobrazeny v Tabulce II. Jako kontrola byl zvolen 0,1% roztok DMSO v IMDM médiu, který byl také podle typů variant přidán namísto studovaných látek.

**Tabulka II:** Varianty infekce virem KE.

varianta	1. den	2. den	3. den	4. den
č. I	nasazení buněk	infekce + přidání média	přidání látky, inkubace	inkubace
č. II	nasazení buněk	infekce + přidání látky	inkubace	inkubace
č. III	nasazení buněk	přidání látky	infekce + přidání látky	inkubace
varianta	5. den	6. den	7. den	
č. I	inkubace	odebrání vzorků		
č. II	inkubace	odebrání vzorků		
č. III	inkubace	inkubace	odebrání vzorků	

Infekce buněk proběhla v koncentraci 1 MOI (multiplicity of infection). Z panelů bylo opatrně odebráno médium, poté bylo přidáno 200  $\mu$ l virové suspenze a inkubovalo se 2 hodiny při teplotě 37°C v boxu s 0,5% CO<sub>2</sub>. Po dvou hodinách byla virová suspenze odebrána, buňky byly promyty 200  $\mu$ l sterilního PBS, které bylo následně odebráno. Dle variant infekce a postupu pro jednotlivé dny z Tab. II pak bylo k variantám přidáno buď 0,5 ml IMDM média s látkami (VIN o koncentraci 20  $\mu$ g/ml a 10  $\mu$ g/ml; AD-2-OX o koncentraci 500 ng/ml, TK-DION AD o koncentraci 500ng/ml a 0,1% roztok DMSO) nebo 0,5 ml čistého IMDM média.

V případě, kdy bylo potřeba vyměnit médium za IMDM médium s látkami (dle Tab. II), bylo staré médium opatrně odebráno a následně bylo přidáno 0,5 ml IMDM média s látkami. Panely byly vždy po provedené práci inkubovány do dalšího dne v boxu při 37°C s 0,5% CO<sub>2</sub>.

Po čtyřech dnech inkubace každé varianty, byly odebrány vzorky. Nejprve bylo odebráno médium do připravených mikrozkušavek, dáno na led a poté uchováváno v mrazícím boxu při teplotě -80 °C. Buňky byly promyty 0,5 ml sterilního PBS, které bylo následně odebráno. Byl přidán trypsin (50  $\mu$ l) k uvolnění od povrchu jamky. Poté byly buňky rozsuspendovány ve 300  $\mu$ l IMDM média, napipetovány do mikrozkušavek a zcentrifugovány v chlazené centrifuze (Hermle Labortechnik GmbH typ Z326 K) při 4 °C na 500 RCF (relative centrifugal field, relativní centrifugační zrychlení) po dobu 7 minut. Poté bylo přebytečné médium odebráno a zkumavky s buňkami byly zmrazeny v tekutém dusíku. Vzorky poté byly uchovávány v mrazícím boxu při -80°C.

U viniferinu o koncentraci 20  $\mu$ g/ml byl navíc proveden stejný pokus, ale s koncentrací viru 0,1 MOI. Postup byl jinak totožný jako u koncentrace 1 MOI.

### **3.5 Plaková titrace**

Metodou plakové titrace zjišťujeme množství virových částic v daném vzorku. Výsledný počet virových částic se uvádí v plakotvorných jednotkách na 1 ml (tj. PFU = plaque forming unit). Plaková titrace se prováděla na prasečích PS buňkách (Porcine stable kidney).

Jednotlivé vzorky byly rozředěny desítkovou řadou v L15 médiu (Leibovitz L15 Medium – Biowest, 3% PTS (Newborn Calf serum; Biowest), antibiotikum, glutamin)

ve 24 jamkovém panelu každý do 6 jamek. Po naředění všech vzorků bylo do každé jamky přidáno 300  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze o koncentraci  $3 \times 10^5$  buněk/ml. Panely byly následně ponechány čtyři hodiny v boxu při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a 0,5%  $\text{CO}_2$  k adherování buněk na povrchy jamek. Po čtyřech hodinách bylo do každé jamky přidáno 400  $\mu\text{l}$  pokrývky. Pokrývka byla vytvořena z 3% vodního roztoku karboxymethylcelulózy (Sigma-Aldrich) a dvojnásobně koncentrovaného média L15 v poměru 1:1 a následně byly buňky inkubovány 5 dní při  $37^\circ\text{C}$ .

Po pěti dnech byly neinfikované buňky obarveny a zároveň vyobrazeny plaky, tj. místa, kde byly buňky usmrceny virovými částicemi. Panely byly nejprve promyty fyziologickým roztokem (9 g NaCl (Lach-Ner) do 1 l destilované vody) a poté byly barveny pomocí naftalenové černi (1 g naftalenové černi, 62,5 ml 96% ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného doplněné do 1 litru vody a následně přefiltrované) po dobu 45 minut. Poté byly buňky promyty destilovanou vodou a ponechány oschnout do druhého dne, kdy mohly být plaky spočítány a následně dopočítáno množství virových částic.

### **3.6 Ověření vlivu přírodních látek na standardní kmeny bakterií**

Jako standardní kmeny bakterií byly vybrány bakterie *E. coli* (strain Seattle 1946 ATCC 25922), *S. epidermidis* (strain RP 62A ATCC 35984) a *S. aureus* (strain ATCC 25923). 1 ml zásobního roztoku bakterií byl přidán k 10 ml CASO media (Casein Soja Pepton Bouillon; Carl Roth GmbH) a byl ponechán do druhého dne v třepacím boxu při 160 rpm (revolutions per minute; otáčky/minutu) množit se. Druhý den bylo v mikrozkuhavce smícháno 250  $\mu\text{l}$  narostlé bakteriální suspenze se 100  $\mu\text{l}$  80% sterilního glycerolu a řádně promícháno pomocí vortexu. Takto připravené bakteriální zásobní roztoky byly uchovány pro další pokusy v mrazícím boxu při teplotě  $-80^\circ\text{C}$ .

K ověření účinku přírodních látek proti bakteriím byla vybrána koncentrace 20  $\mu\text{g/ml}$  pro všechny látky (VIN, AD-2-OX, TK-DION AD) a následným dvojkovým ředěním bylo docíleno pěti koncentrací 20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$  a 1,25  $\mu\text{g/ml}$  v 0,1% DMSO. Jako pozitivní kontrola byla zvolena kultura bakterií v CASO médiu bez ošetření látkou či antibiotiky. Negativní kontrola byla provedena přidáním ampicilinu k bakteriím v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Zásobní roztok bakterií byl rozmrazen na ledu a 10  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku bylo přidáno k 15 ml CASO média a ponecháno v třepacím boxu při  $37^\circ\text{C}$  a 180 rpm po dobu cca 2 hodin.

Poté byly jednotlivé bakterie spočteny pod mikroskopem s temným polem a následným výpočtem byl určen počet bakterií v CFU/ml (colony forming unit; jednotka tvořící kolonie). Bakterie byly naředěny na koncentraci 100 CFU/50  $\mu$ l.

Na 96 jamkový panel byly v triplikátech přidány jednotlivé koncentrace přírodních látek v objemu 50  $\mu$ l a následně k nim bylo přidáno 50  $\mu$ l bakteriální suspenze o koncentraci 100 CFU/50  $\mu$ l. Jako pozitivní kontrola bylo do jamky nanášeno 50  $\mu$ l CASO média a 50  $\mu$ l bakteriální suspenze. Bylo také ověřeno, zda DMSO neovlivňuje výsledky pokusu s použitím 50  $\mu$ l 0,1% DMSO v CASO médiu s přidáním 50  $\mu$ l bakteriální suspenze. Pro negativní kontrolu bylo do jamky přidáno 40  $\mu$ l CASO média, 10  $\mu$ l ampicilinu (o koncentraci 1 mg/ml) v CASO médiu a 50  $\mu$ l bakterií. Panel byl ponechán po dobu 24 hodin v třepacím boxu při 37°C a 150 rpm.

Následující den byla změřena koncentrace bakterií pomocí přístroje Synergy H1 microplate reader (Biotek) metodou OD 600 (optical density), tj. absorbance při vlnové délce 600 nm a tím mohla být odhadnuta přibližná naředění bakterií před vysazením na CASO plotny (40 g Casein Soja Pepton Agar (Sigma-Aldrich), destilovaná voda do 1 l). Bakteriální suspenze byla tedy následně rozředěna dle potřeby (většinou  $1 \times 10^6$ ) a poté 100  $\mu$ l rozředěné suspenze bylo nanášeno pomocí očkovací hokejky na CASO plotny. Takto nanášené vzorky byly na plotnách ponechány do dalšího dne při 37°C, poté byly spočítány narostlé kolonie a dopočteno množství bakterií v CFU/ml. Každý vzorek byl poté porovnán s pozitivní kontrolou.



### 3.7 Inkubace *Borrelia burgdorferi* sensu lato s viniferinem

Byly vybrány čtyři kmeny *Borrelia burgdorferi* s. l., a to konkrétně *B. burgdorferi* s. s. (B31), *B. afzelii* (CB43), *B. finlandensis* (SV1) a *B. garinii* (PBi). Každý tento kmen byl nejprve 10x zředěn, konkrétně bylo promícháno 50  $\mu$ l bakteriální kultury se 450  $\mu$ l BSK II média (Barbour-Stoenner-Kelly medium; 9,7 g/l 10x CMRL (US Biological), 5 g Neopeptone, 50 g BSA (Millipore), 2 g Yeastolate (BD Biosciences), 6 g HEPES (Calbiochem), 5 g glukóza, 0,7 g citrát sodný, 0,8 g pyruvát sodný, 0,4 g N-acetyl glukosamin, 10 g uhličitan sodný, 60 ml králičí sérum (všechny Sigma-Aldrich), do 1 l vody). Následně byly spirochéty spočítány pomocí Petroff-Hausserovy komůrky, kdy bylo spočítáno 5 velkých čtverců a podle vzorce dopočítána koncentrace borrelií na 1 ml. Jednotlivé kultury byly naředěny na koncentraci  $10^7$  borrelií/ml.

Pro ověření vlivu na borrelie byl vybrán viniferin o koncentracích 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml a 1,25  $\mu$ g/ml v 0,1% DMSO a BSK II médiu. Jednotlivé koncentrace byly nasazeny na 96 jamkový panel v triplicátech (každý po 50  $\mu$ l) pro každý kmen *B. burgdorferi* s. l., jako pozitivní kontrola byly jednotlivé viniferinem neošetřené kmeny borrelií a negativní kontrola byla zvolena jako čisté BSK II médium. K takto připraveným koncentracím bylo přidáno po 50  $\mu$ l jednotlivých kmenů *B. burgdorferi* s. l., panel byl utěsněn pomocí parafilmu k udržení vlhkosti a po dobu jednoho týdne byly bakterie inkubovány v boxu při 34°C.

Po týdnu inkubace byly jednotlivé kmeny borrelií spočítány pod mikroskopem na podložním sklíčku v jednom zorném poli a následně přepočteny pomocí vzorce na koncentraci počtu borrelií v 1 ml. Poté byly výsledky z jednotlivých koncentrací porovnány s pozitivní kontrolou, zda se vyskytne výrazný rozdíl či nikoliv.

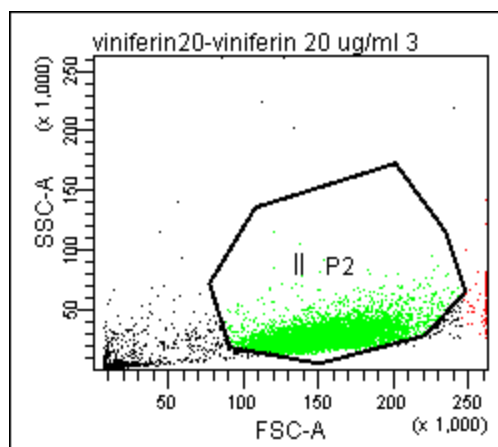
Při opakování pokusu byly použity kmeny *B. burgdorferi* s. s. (B31), *B. afzelii* (CB43), *B. garinii* (PBi) a dále *B. burgdorferi* s. s. (297), který díky následnému obarvení PI a fluorescenčnímu mikroskopu zobrazil živé a mrtvé spirochéty. Na panel již byla nanášena pouze nejvyšší koncentrace viniferinu. Dále byla při třetím pokusu provedena kontrola s 0,1% DMSO v BSK II médiu k vyloučení vlivu DMSO na jednotlivé kmeny *B. burgdorferi* s. l.

## 4 VÝSLEDKY

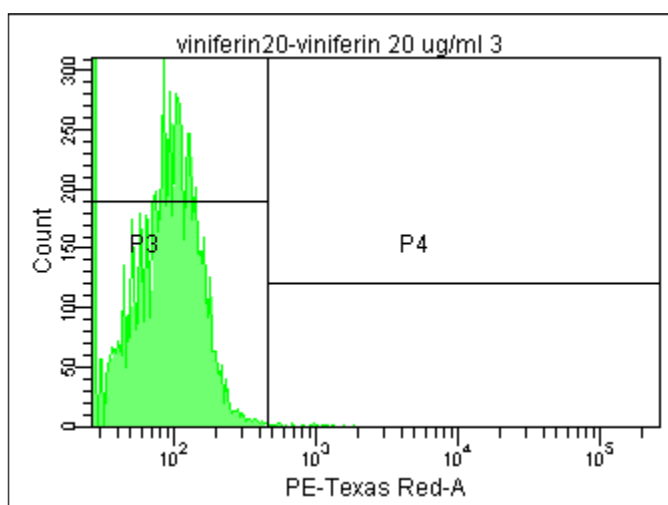
### 4.1 Optimalizace koncentrace vybraných přírodních látek

Při pokusu o určení nejvýše tolerované koncentrace studovaných přírodních látek glioblastomy pomocí Bürkerovy komůrky a mikroskopu se ukázalo, že toto počítání je velmi nepřesné. Objevily se zde obrovské rozdíly mezi triplikáty ve stejných koncentracích. Bylo potřeba tedy zvolit jinou možnost počítání a určení přeživších buněk.

Tento pokus byl proto zopakován s použitím průtokového cytometru. Jednotlivé vzorky byly obarveny pomocí PI a následně změřeny na průtokovém cytometru. Výsledný počet přeživších a mrtvých buněk znázorňují grafy na Obr. 9 a 10. Na obrázku č. 9 je patrné použité ohraničení vymezující námi studované buňky, označené jako populace P2.



**Obrázek 9:** Graf jednotlivých populací buněk v závislosti přímého rozptylu (FSC) na bočním (SSC).



**Obrázek 10:** Histogram populace glioblastů v závislosti na PI.

Na Obr. 10 je znázorněn histogram značení buněk (populace P2) po obarvení PI. V případě, že by některé buňky byly mrtvé, byl by patrný pík při vyšších hodnotách fluorescence (populace P4), a to z důvodu proniknutí PI do buněk. Jelikož zde je přítomen pouze pík v levé části grafu, jedná se tedy o přeživší buňky (populace P3), a tím i o vhodnou koncentraci pro další pokusy.

Takto naměřené hodnoty pro jednotlivé koncentrace byly zobrazeny v procentuálním zastoupení živých a mrtvých buněk. Pro jednotlivé vybrané přírodní látky pak byly zapsány do Tab. III, IV a V, kde jsou uvedeny procenta přeživších a mrtvých buněk při vybraných koncentracích VIN, AD-2-OX a TK-DION AD. Všechna měření byla provedena v triplicátech, jak je uvedeno v tabulkách.

**Tabulka III:** Množství přeživších a mrtvých buněk po inkubaci s VIN.

VIN [μg/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b. %	VIN [μg/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b. %
20 /1	99,4	0,6	0,04 /3	97,5	2,5
20 /2	99,6	0,4	0,08 /1	97,4	2,6
20 /3	99,7	0,3	0,08 /2	97,2	2,8
10 /1	96,7	3,3	0,08 /3	98,3	1,7
10 /2	94,8	5,2	0,016 /1	97,7	2,3
10 /3	97,4	2,6	0,016 /2	97,8	2,2
2 /1	97,0	3,0	0,016 /3	97,0	3,0
2 /2	98,2	2,8	$3,2 \cdot 10^{-3}$ /1	98,6	1,4
2 /3	96,7	3,3	$3,2 \cdot 10^{-3}$ /2	97,1	2,9
0,4 /1	97,6	2,4	$3,2 \cdot 10^{-3}$ /3	97,4	2,6
0,4 /2	97,8	2,2			

**Tabulka IV:** Množství přeživších a mrtvých buněk po inkubaci s AD-2-OX.

AD-2-OX [ng/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b %	AD-2-OX [ng/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b. %
500 /1	95,5	4,5	62,5 /1	98,0	2,0
500 /2	97,3	2,7	62,5 /2	98,6	1,4
500 /3	95,9	4,1	62,5 /3	98,8	1,2
250 /1	98,2	1,8	31,25 /1	98,1	1,9
250 /2	96,8	3,2	31,25 /2	98,3	1,7
250 /3	98,0	2,0	31,25 /3	98,8	1,2
125 /1	96,6	3,4	15,625 /1	96,9	3,1
125 /2	97,4	2,6	15,625 /2	98,9	1,1
125 /3	97,9	2,1	15,625 /3	98,1	1,9

**Tabulka V:** Množství přeživších a mrtvých buněk po inkubaci s TK-DION AD.

TK-DION AD [ng/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b %	TK-DION AD [ng/ml]/vzorek	živé b. %	mrtvé b.%
500 /1	93,6	6,4	62,5 /1	97,9	2,1
500 /2	96,3	3,7	62,5 /2	96,7	3,3
500 /3	96,0	4,0	62,5 /3	96,7	3,3
250 /1	95,4	4,6	31,25 /1	96,0	4,0
250 /2	95,9	4,1	31,25 /2	97,0	3,0
250 /3	98,0	2,0	31,25 /3	97,7	2,3
125 /1	96,2	3,8	15,625 /1	97,7	2,3
125 /2	96,5	3,5	15,625 /2	96,9	3,1
125 /3	96,5	3,5	15,625 /3	97,4	2,6

Z jednotlivých tabulek je patrné, že všechny nejvýše zvolené koncentrace jsou vhodné pro další pokusy (podíl mrtvých buněk u těchto koncentrací je nižší než 5%). Konkrétně pro VIN se jedná o 20 µg/ml, AD-2-OX a TK-DION AD v koncentraci 500 ng/ml. Dále byly změřeny kontroly s 0,1% roztokem DMSO v IMDM médiu a také kontrola s čistým IMDM médiem. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v Tab. VI.

**Tabulka VI:** Množství přeživších a mrtvých buněk po inkubaci s DMSO a čistým IMDM médiem.

0,1% DMSO vzorek	živé b. %	mrtvé b %	IMDM médiu vzorek	živé b. %	mrtvé b.%
1	96,6	3,4	1	97,9	2,1
2	96,9	3,1	2	97,9	2,1
3	96,5	3,5	3	97,6	2,4

Z tabulky VI lze odečíst, že DMSO, ve kterém jsou přírodní látky rozpuštěny, nijak významně neovlivňuje přežívání glioblastů v koncentracích, v kterých bylo použité. Byly tedy určeny nejvýše glioblasty tolerované koncentrace, a to pro viniferin 20 µg/ml i 10 µg/ml a deriváty adamantanu 500 ng/ml v koncentraci 0,1% DMSO pro další pokusy.

## 4.2 Infekce buněk inkubovaných s přírodními látkami

Glioblasty v koncentraci  $3 \times 10^5$  buněk/ml byly v objemu 0,3 ml nasazeny na panel a následující den ošetřeny ve variantách dle Tab. II. Bylo potřeba připravit pracovní roztoky o vybraných koncentracích, tedy pro VIN 20  $\mu\text{g/ml}$  a 10  $\mu\text{g/ml}$ , AD-2-OX a TK-DION AD 500  $\text{ng/ml}$  v 0,1% roztoku DMSO v IMDM médiu. Jako kontrola byl připraven roztok 0,1% DMSO v IMDM médiu.

Pro infekci virem KE, kmenem Neudoerfl, bylo použito množství viru v koncentraci 1 MOI. U viniferinu byla nejprve vyzkoušena koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ , kdy celý pokus byl proveden třikrát stejně jako pro deriváty adamantanu. Následně byl proveden obdobný pokus s vyšší koncentrací viniferinu, a to koncentrací 20  $\mu\text{g/ml}$  při 1 MOI a 0,1 MOI.

## 4.3 Plaková titrace odebraných vzorků

Po odebrání vzorků ze všech třech jednotlivých pokusů byla s odebranými médii provedena plaková titrace. Při prvním pokusu bylo pro plakovou titraci nasazeno  $4 \times 10^5$  PS buněk/ml, avšak po pěti dnech inkubace a při následném barvení nebyly plaky zcela výrazné a bylo patrné, že buňky nebyly rovnoměrně rozvrstveny, dokonce v některých místech silně přerostly do více vrstev. Proto bylo pro další pokusy při plakové titraci nasazováno 300  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze s koncentrací  $3 \times 10^5$  buněk/ml.

Po obarvení a následném osušení panelů byly spočítány plaky a následně byla dopočítána koncentrace virionových částic v PFU/ml pomocí vzorce. Pokud bylo možné spočítat plaky ve více jamkách, ve výpočtu byl tento fakt zohledněn a jako výsledná koncentrace se bralo nejméně ředěná jamka s počitatelnými plakami. Tímto způsobem byly spočítány všechny vzorky ve všech pokusech. Výsledky pro první pokus VIN (10  $\mu\text{g/ml}$ ) jsou uvedeny v Tab. VII, pro AD-2-OX (500  $\text{ng/ml}$ ) a pro TK-DION AD (500  $\text{ng/ml}$ ) v Tab. VIII.

**Tabulka VII:** Titr viru v PFU/ml při prvním pokusu s VIN (10 µg/ml).

VIN 1. pokus	PFU/ml	průměr
var. I/1	$7,58 \times 10^4$	$6,40 \times 10^4$
var. I/2	$6,57 \times 10^4$	
var. I/3	$5,05 \times 10^4$	
var. II/1	$1,01 \times 10^5$	$9,43 \times 10^4$
var. II/2	$1,26 \times 10^5$	
var. II/3	$5,56 \times 10^4$	
var. III/1	$6,57 \times 10^4$	$4,71 \times 10^4$
var. III/2	$5,05 \times 10^4$	
var. III/3	$2,53 \times 10^4$	

**Tabulka VIII:** Titr viru v PFU/ml pro AD-2-OX a TK-DION AD.

AD-2- OX. 1. pokus	PFU/ml	průměr	TK- DION AD 1. pokus	PFU/ml	průměr
var. I/1	$6,57 \times 10^4$	$5,70 \times 10^4$	var. I/1	$9,01 \times 10^4$	$1,05 \times 10^5$
var. I/2	$3,53 \times 10^4$		var. I/2	$8,59 \times 10^4$	
var. I/3	$7,01 \times 10^4$		var. I/3	$1,40 \times 10^5$	
var. II/1	$1,30 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5$	var. II/1	$1,26 \times 10^5$	$6,46 \times 10^5$
var. II/2	$1,06 \times 10^5$		var. II/2	$6,51 \times 10^5$	
var. II/3	$1,15 \times 10^5$		var. II/3	$1,16 \times 10^6$	
var. III/1	$1,10 \times 10^5$	$1,04 \times 10^5$	var. III/1	$3,33 \times 10^4$	$4,98 \times 10^4$
var. III/2	$8,59 \times 10^4$		var. III/2	$6,06 \times 10^4$	
var. III/3	$1,16 \times 10^4$		var. III/3	$5,56 \times 10^4$	

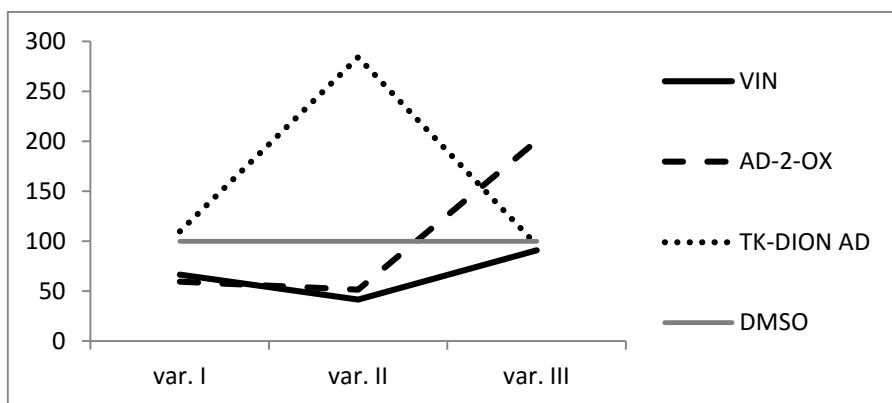
Všechny výsledky byly porovnány s kontrolou s DMSO. Hodnoty titru viru pro kontrolu jsou zaznamenány v Tab. IX. DMSO bylo bráno jako kontrola, vůči níž se vztahuje poměr koncentrace viru v PFU/ml jednotlivých průměrů látek. Tyto průměry a následný poměr vyjádřený v procentech byl zaznamenán do Tab. X a grafu na Obr. 11.

**Tabulka IX:** Titr viru v PFU/ml pro 0,1% DMSO.

DMSO 1. pokus	PFU/ml	průměr
var. I/1	$9,01 \times 10^4$	$9,59 \times 10^4$
var. I/2	$1,30 \times 10^5$	
var. I/3	$6,67 \times 10^4$	
var. II/1	$2,78 \times 10^5$	$2,27 \times 10^5$
var. II/2	$1,51 \times 10^5$	
var. II/3	$2,52 \times 10^6$	
var. III/1	$6,11 \times 10^4$	$5,19 \times 10^4$
var. III/2	$5,00 \times 10^4$	
var. III/3	$4,44 \times 10^4$	

**Tabulka X:** Procentuální podíl titrů viru při inkubaci s jednotlivými látkami vůči DMSO kontrole.

látka	varianta I PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta II PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta III PFU/ml	podíl k DMSO[%]
viniferin	$6,40 \times 10^4$	66,71	$9,43 \times 10^4$	41,48	$4,71 \times 10^4$	90,91
AD-2-OX	$5,70 \times 10^4$	59,46	$1,17 \times 10^5$	51,52	$1,04 \times 10^5$	200,65
TK-DION AD	$1,05 \times 10^5$	109,87	$6,46 \times 10^5$	284,32	$4,98 \times 10^4$	96,10
DMSO	$9,59 \times 10^4$	100	$2,27 \times 10^5$	100	$5,19 \times 10^4$	100



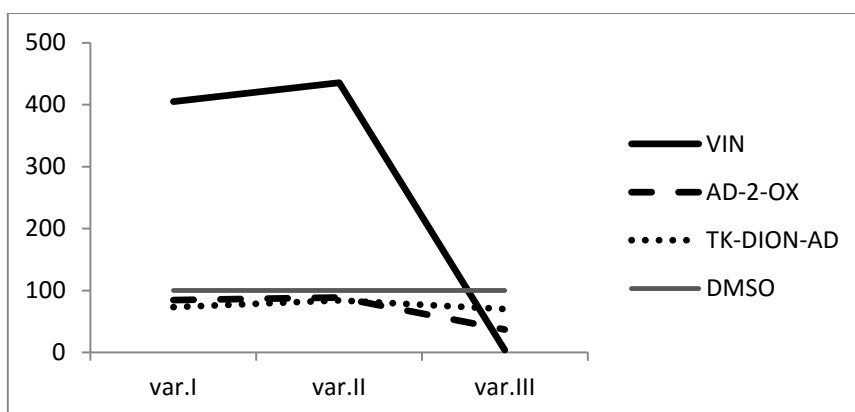
**Obrázek 11:** Graf vlivu jednotlivých přírodních látek na titr viru KE v porovnání s kontrolou DMSO při prvním pokusu.

Z výsledků je patrné, že žádná vybraná přírodní látka nemá výraznější inhibiční vliv na replikaci VKE. Naopak u varianty II TK-DION AD se jeví tato látka jako podporující

replikaci VKE. Pro ověření, zda jednotlivé látky mají daný vliv na množení viru KE, byly všechny pokusy od infekce s odebráním vzorků i plakové titrace provedeny ve dvou dalších opakováních. V Tab. XI jsou zaznamenány průměry koncentrací PFU/ml z jednotlivých variant pro všechny látky s přepočtem na podíl ke kontrole DMSO. Výsledky z těchto tabulek pak byly zaznamenány do grafů na Obr. 12.

**Tabulka XI:** Hodnoty titrů viru u buněk inkubovaných se sledovanými látkami vzhledem k DMSO kontrole při druhém opakování.

látko 2. pokus	varianta I PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta II PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta III PFU/ml	podíl k DMSO[%]
viniferin	$1,11 \times 10^7$	405,11	$1,01 \times 10^7$	435,34	$9,26 \times 10^4$	3,94
AD-2-OX	$2,32 \times 10^6$	84,67	$2,06 \times 10^6$	88,79	$8,66 \times 10^5$	36,85
TK-DION AD	$2,00 \times 10^6$	72,99	$1,95 \times 10^6$	84,05	$1,65 \times 10^6$	70,21
DMSO	$2,74 \times 10^6$	100	$2,32 \times 10^6$	100	$2,35 \times 10^6$	100



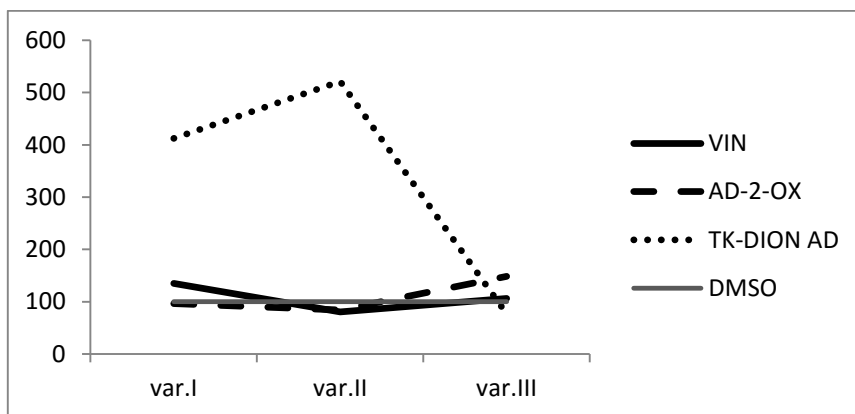
**Obrázek 12:** Graf vlivu jednotlivých přírodních látek na titr viru KE v porovnání s kontrolou DMSO při druhém pokusu.

Z výsledků a obrázku lze vyčíst opačný efekt než při prvním pokusu. Proto bylo rozhodnuto provést třetí opakování. Z druhého opakování pokusu se jeví, že VIN u varianty III by mohl mít inhibiční efekt a naopak při variantách I a II se zdá, že VIN podporuje replikaci viru KE. U AD-2-OX a TK-DION AD při druhém pokusu nebyl prokázán žádný účinek. V Tab. XII jsou zaznamenány výsledky koncentrací v PFU/ml třetího opakování pokusu, které byly následně převedeny do grafu na Obr. 13.



**Tabulka XII:** Hodnoty titrů viru u buněk inkubovaných se sledovanými látkami vzhledem k DMSO kontrole při třetím opakování.

látka 3. pokus	varianta I PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta II PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta III PFU/ml	podíl k DMSO[%]
viniferin	$1,18 \times 10^7$	134,86	$6,90 \times 10^6$	80,33	$5,56 \times 10^6$	106,51
AD-2-OX	$8,42 \times 10^6$	96,23	$7,24 \times 10^6$	84,28	$7,74 \times 10^5$	148,26
TK-DION AD	$1,13 \times 10^7$	412,41	$1,21 \times 10^7$	521,55	$1,80 \times 10^6$	76,60
DMSO	$8,75 \times 10^6$	100	$8,59 \times 10^6$	100	$5,22 \times 10^6$	100

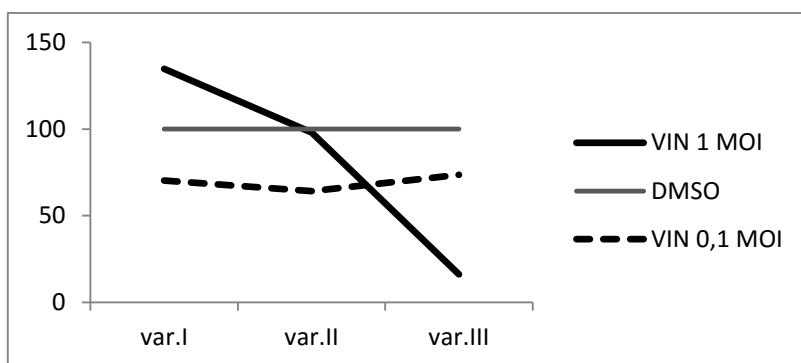


**Obrázek 13:** Graf vlivu jednotlivých přírodních látek na titr viru KE v porovnání s kontrolou DMSO při třetím pokusu.

Po srovnání výsledků z jednotlivých pokusů byly patrné velké rozdíly mezi jednotlivými pokusy, ať se jedná o počet virionů (PFU) ve vzorcích, ale především ve výsledných grafech se velmi liší druhý pokus od ostatních dvou. V prvním a třetím pokusu byla vždy stejná varianta nejméně účinná či naopak nejúčinnější, zatímco u druhého pokusu jsou hodnoty jiné. Vzhledem k tomu, že viniferin se jevil jako jediná potenciálně účinná látka, pokus byl zopakován pouze s viniferinem v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Při tomto opakování byly použity hodnoty MOI 1 i 0,1. V Tab. XIII lze vyčíst průměrné koncentrace viru v PFU/ml a jejich poměr k DMSO při 1 MOI a 0,1 MOI. Následně byly tyto hodnoty zaneseny do grafu na Obr. 14.

**Tabulka XIII:** Závislost koncentrací viru na kontrole v pokusu s viniferinem při 1 MOI a 0,1 MOI.

1 MOI	varianta I PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta II PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta III PFU/ml	podíl k DMSO[%]
viniferin	$1,18 \times 10^7$	134,86	$8,42 \times 10^6$	98,02	$8,40 \times 10^5$	16,09
DMSO	$8,75 \times 10^6$	100	$8,59 \times 10^6$	100	$5,22 \times 10^6$	100
0,1 MOI	varianta I PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta II PFU/ml	podíl k DMSO[%]	varianta III PFU/ml	podíl k DMSO[%]
viniferin	$1,35 \times 10^6$	70,31	$1,25 \times 10^6$	64,10	$8,90 \times 10^5$	73,55
DMSO	$1,92 \times 10^6$	100	$1,95 \times 10^6$	100	$1,21 \times 10^6$	100



**Obrázek 14:** Vliv viniferinu na titr viru KE při jednotlivých variantách infekce při 1 MOI a 0,1 MOI.

Ze všech výsledků je patrné, že adamantany neprokazují inhibiční vliv na množení viru KE, ba naopak v některých případech ho pravděpodobně spíše podporují. U viniferinu s koncentrací 10  $\mu\text{g/ml}$  po srovnání pokusů také není patrný vliv na vir KE. Pokus s viniferinem o koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  byl proveden pouze jednou, ale z výsledků lze vyčíst mírný inhibiční účinek viniferinu, pokud jsou buňky nejprve ošetřeny viniferinem a následující den infikovány (profylaktický účinek).

#### 4.4 Ověření účinku přírodních látek na standardní kmeny bakterií

Po inkubaci bakterií se studovanými přírodními látkami bylo zkoumáno zakalení jednotlivých jamek. U všech jamek byla patrná podobná intenzita zakalení jako v případě neošetřených bakterií (pozitivní kontrola; PK). Kontrola s ampicilinem (negativní kontrola; NK) byla bez zakalení, naprosto čirá podobně, jako čisté CASO médium. Následně byly změřeny hodnoty absorbance při 600 nm (OD 600). V Tab. XIV jsou zaznamenány hodnoty absorbancí pro jednotlivé látky u bakterie *E. coli*. Dále pak v Tab. XV a Tab. XVI jsou naměřené absorbance pro bakterie *S. epidermidis* a *S. aureus*. Z hodnot lze vyčíst, že jednotlivé kmeny bakterií rostly bez jakýchkoliv problémů, ba dokonce byly přerostlé. Z hodnot pro kontrolu s DMSO můžeme určit, že DMSO nijak neovlivňuje výsledky pokusů.

**Tabulka XIV:** Naměřené hodnoty absorbancí z OD 600 pro *E. coli*.

<i>E. coli</i>	20 μg/ml	10 μg/ml	5 μg/ml	2,5 μg/ml	1,25 μg/ml
VIN/1	0,817	1,197	1,145	1,043	0,966
VIN/2	1,111	1,108	0,994	1,049	1,044
VIN/3	1,180	1,080	1,014	1,020	1,091
AD-2- OX/1	0,935	1,068	1,111	1,054	1,011
AD-2- OX/2	0,994	1,150	1,173	1,071	1,143
AD-2- OX/3	0,865	1,196	1,237	1,157	1,254
TK-DION AD/1	0,891	1,051	0,926	0,919	0,761
TK-DION AD/2	0,922	1,352	1,221	0,935	1,045
TK-DION AD/3	1,217	1,192	1,465	1,313	0,988
<i>E.coli</i>	0,1% DMSO	<i>E. coli</i> (PK)	NK	médium	
A	1,313	1,338	0,095	0,098	

**Tab. XV:** Naměřené hodnoty absorbancí pro *S. epidermidis*.

<i>S. epidermidis</i>	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
VIN/1	1,420	1,530	1,545	1,465	1,247
VIN/2	1,706	1,725	1,712	1,629	1,657
VIN/3	1,531	1,556	1,675	1,515	1,667
AD-2-OX/1	1,355	1,374	1,634	1,624	1,495
AD-2-OX/2	1,231	1,626	1,635	1,537	1,403
AD-2-OX/3	1,466	1,639	1,626	1,652	1,728
TK-DION AD /1	1,444	1,512	1,511	1,563	1,152
TK-DION AD/2	1,662	1,628	1,617	1,675	1,660
TK-DION AD/3	1,676	1,681	1,668	1,721	1,726
<i>S. epidermidis</i>	0,1% DMSO	PK	NK	médium	
A	1,381	1,611	0,180	0,239	

**Tab. XVI:** Naměřené hodnoty absorbancí pro *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
VIN/1	1,281	1,260	1,240	1,255	1,069
VIN/2	1,505	1,573	1,490	1,385	1,309
VIN/3	1,556	1,516	1,415	1,391	1,325
AD-2-OX/1	1,315	1,265	1,213	1,297	1,246
AD-2-OX/2	1,341	1,281	1,263	1,277	1,277
AD-2-OX/3	1,369	1,331	1,348	1,373	1,324
TK-DION AD /1	1,090	1,091	1,043	1,072	0,898
TK-DION AD/2	1,223	1,326	1,236	1,218	0,973
TK-DION AD/3	1,277	1,291	1,330	1,297	1,282
<i>S. aureus</i>	0,1% DMSO	PK	NK	médium	
A	1,254	1,400	0,096	0,183	

Z naměřených hodnot absorbancí lze vyčíst, že jednotlivé látky nemají velký vliv na jednotlivé kmeny standardních bakterií, a to z porovnání pozitivních kontrol vůči jednotlivým vzorkům. Přesné určení počtu CFU/ml bylo proto provedené pouze u vzorků s koncentracemi studovaných látek 20 µg/ml a 10 µg/ml, a to vždy jednou, nikoliv v triplicátu. Jednotlivé vzorky byly milionkrát naředěny a takto zředěný vzorek byl nanesen na plotny v objemu 100 µl. Další den byly narostlé kolonie spočítány a přepočteny na původní objem a ředění. V Tab. XVII jsou zaznamenány příslušné počty kolonií jednotlivých bakterií a jejich přepočty na CFU/ml pro nejvyšší koncentraci a PK. Kontroly s ampicilinem byly bez narostlých kolonií, tudíž v nich nebyly přítomny po ošetření tímto antibiotikem žádné bakterie. Je patrné, že počty CFU/ml nebyly nijak ovlivněné přidanými přírodními látkami.

**Tabulka XVII:** Počet CFU/ml jednotlivých kmenů standardních bakterií v inkubaci s vybranými přírodními látkami.

	VIN [20 µg/ml]	AD-2-OX [20 µg/ml]	TK-DION AD [20 µg/ml]	PK
kolonie <i>E.coli</i>	205	263	212	325
<i>E. coli</i> [CFU/ml]	$2,05 \times 10^9$	$2,63 \times 10^9$	$2,12 \times 10^9$	$3,25 \times 10^9$
kolonie <i>S. epidermidis</i>	197	169	166	225
<i>S. epidermidis</i> [CFU/ml]	$1,97 \times 10^9$	$1,69 \times 10^9$	$1,66 \times 10^9$	$2,25 \times 10^9$
kolonie <i>S. aureus</i>	414	311	295	360
<i>S. aureus</i> [CFU/ml]	$4,14 \times 10^9$	$3,11 \times 10^9$	$2,95 \times 10^9$	$3,60 \times 10^9$

#### 4.5 Ověření účinku viniferinu na *B. burgdorferi* s. l.

Při prvním pokusu s ověřováním účinku vybraných přírodních látek na *B. burgdorferi* s. l. se vyskytl problém již po 4 dnech, kdy byly jednotlivé jamky vyschlé a také bylo kontaminováno použité BSK-II médium. Proto při druhém pokusu byl panel uzavřen pomocí parafilmu a inkubován při 34°C a počítání spirochét proběhlo až po týdnů inkubace, a to nanesením na sklíčko a spočítáním pod mikroskopem s temným polem jednoho zorného pole. Poté byl výsledný počet vynásoben koeficientem  $3,9 \times 10^5$  a byl získán počet borrelií/ml. Koncentrace borrelií/ml zobrazuje Tab. XVIII, a to při nejvyšší použité koncentraci viniferinu a také hodnoty pro pozitivní kontrolu s čistým médiem.

**Tabulka XVIII:** Koncentrace borrelií při pokusu s viniferinem.

	počet b/ml s VIN	pozitivní kontrola
<i>B. burgdorferi</i> s. s. (B31)	$1,37 \times 10^8$	$4,38 \times 10^8$
<i>B. afzelii</i> (CB43)	$7,8 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
<i>B. garinii</i> (PBi)	$8,58 \times 10^7$	$2,34 \times 10^8$
<i>B. finlandensis</i> (SV1)	$4,68 \times 10^8$	nepočítatelně

V Tabulce XVIII. jsou uvedeny koncentrace jednotlivých kmenů borrelií na 1 ml. Z výsledků je patrné, že u kmenů B31 a PBi by určitý inhibiční účinek mohl být, počet borelií byl ale snížen pouze třikrát.

Z toho důvodu a také kvůli ověření vlivu DMSO na spirochéty byl proveden třetí pokus, kde místo kmenu SV1 byl použit kmen *B. burgdorferi* s.s. (297), který je možno obarvit pomocí PI a následně pozorovat živé a mrtvé spirochéty. Naneštěstí však po týdnů inkubace byla zjištěna kontaminace média, kvůli níž spirochéty ve velkém množství nepřežily ani se nenamnožily. V nejbližší době bude tedy pokus opět opakován.

## 5 DISKUZE

V této práci byly zkoumány možné účinky rostlinné biochemické látky z vína – viniferinu a dalších přírodních látek, derivátů adamantanu, proti VKE a vybraných kmenům bakterií. Antivirotické účinky vybraných látek byly zkoumány na buněčné linii glioblastů, která byla vybrána jako zástupce neurálních buněk, které bývají napadány VKE. Dalším důvodem byla jejich citlivost na VKE při *in vitro* zkoumání a jejich vhodné využití pro zkoumání neuropatogeneze VKE (Růžek a kol., 2009). Nejdříve bylo potřebné určit vhodnou koncentraci vybraných látek i jejich rozpouštědla DMSO, aby nebyly výsledky ovlivněné případným odumíráním buněk po aplikaci těchto látek. Pro určení cytopatického efektu studovaných látek a DMSO na použité buňky byl použit průtokový cytometr, který byl pro ověření živých a mrtvých glioblastomových buněk použit i v jiných pokusech (Ruijun a kol., 2014). Jako nejvýše tolerované koncentrace se ukázaly pro viniferin 20 µg/ml, 10 µg/ml a pro deriváty adamantanu 500 ng/ml a roztok 0,1% DMSO. Tyto koncentrace pak byly použity pro pokusy s infekcí VKE. Oproti tomu v pokusu inhibičních účinku HIV-1 integrázy byl viniferin 10 µM (cca 450 µg/ml) pro deriváty adamantanu 1,6 µM (cca 200 µg/ml) (Pflieger a kol., 2013; Printsevskaya a kol., 2005).

Infekce byla provedena ve třech různých variantách, a to z důvodu ověření, zda jsou vybrané přírodní látky schopné nějakým způsobem zabránit šíření a množení viru u již infikovaných buněk či ochránit zdravé buňky před infekcí. Neuroprotektivní charakter byl již dříve prokázán u polyfenolů ve víně, a to před neurodegenerativními nemocemi (Basli a kol., 2012). Konkrétně tedy byly zvoleny varianty – infekce následovaná přidáním studované látky; aplikace studované látky současně s infekcí; a ošetření buněk látkou a následná infekce. Obdobné varianty infekce byly použity i v pokusu ověření antivirotických účinku flavonoidů (jmenovitě quercitinu, naringinu, katechinu a dalších) proti viru *Herpes simplex*, viru dětské obrny a viru *Parainfluenza* (Kaul a kol., 1985). Doposud však nebyl proveden pokus s ověřením účinku viniferinu a derivátů adamantanu na replikaci VKE.

Při prvním pokusu jednotlivé látky po ověření pomocí plakové titrace nevykazovaly žádný významný antivirotický efekt a v některých případech vykazovaly spíše pro virus podpurný účinek. Při druhém opakování však došlo k problémům s přilnutím buněk k povrchu jamek, buňky se již po infekci odlupovaly od povrchu, z toho důvodu se pak pravděpodobně objevily velké rozdíly ve výsledcích při plakové titraci. Při třetím opakování pak výsledky byly srovnatelné s prvním pokusem. U viniferinu v koncentraci 10 µg/ml se

jeví jako neúčinnější varianta č. II, tedy infekce a látka podané současně. Avšak výsledky oproti kontrole nebyly nijak výrazné, proto se nedá předpokládat antivirotický účinek pro tuto koncentraci viniferinu.

Jelikož se dříve adamantan používal jako antivirotikum proti chřipce typu A a deriváty adamantanu inhibují některé *Flaviviry* jako např. Dengue virus, tak bylo předpokládáno, že by inhibiční účinek mohly deriváty adamantanu mít i proti VKE (Tríska, 2012; Luzhkov a kol., 2013). V našem případě se však u studovaných derivátů adamantanu neprojevil žádný pro buňky prospěšné účinky, ba naopak u TK-DION AD se jeví, že varianta č. II spíše podporuje množství titru viru ve vzorcích.

Po těchto zjištěních bylo rozhodnuto, že by bylo vhodné vyzkoušet ještě vyšší koncentraci viniferinu 20  $\mu\text{g/ml}$  při koncentracích VKE 1 MOI a 0,1 MOI. Po plakové titraci a zjištění množství titru viru ve vzorcích nebyl zjištěn významný inhibiční účinek na replikaci VKE. Zvláštností však byl výsledek při koncentraci 1 MOI u varianty III, kdy byl titr viru o jeden řád nižší než kontrola, avšak u koncentrace 0,1 MOI takový výsledek nenastal. Celkově tedy nebyl prokázán žádný antivirotický vliv u vybraných přírodních látek.

Druhou částí práce bylo zjistit, zda vybrané přírodní látky mají baktericidní účinky na vybrané standardní kmeny bakterií a spirochét *B. burgdorferi* s. l. Nejprve však bylo potřeba tuto metodu optimalizovat. Při růstu standardních kmenů bakterií musel být brán ohled na jejich prvotní lag fázi, kdy si bakterie zvykají na prostředí a začínají růst, následně i na jejich růst, aby připravená bakteriální suspenze nebyla příliš přerostlá a bakterie nezačaly z nedostatku živin umírat (Rolfe a kol., 2012). Jako další faktor pro určení vhodného času pro dostatečné namnožení bakterií byla brána jejich generační doba, tedy doba potřebná k vytvoření nové jedné generace bakterií, kdy u *E. coli* je tato doba okolo 20 minut, u *S. epidermidis* a *S. aureus* přibližně půl hodiny (Bremer, 1982; Gottenbos a kol., 2000; Domingue a kol., 1996). Z těchto důvodů byly bakterie ponechány růst přibližně 2 hodiny. Následně byl proveden pokus a druhý den změřeno OD 600. Pomocí OD 600 byla určena absorbance, která slouží k přibližnému určení, zda je bakteriální suspenze koncentrovaná či ne. Tato metoda se běžně používá k určení koncentrace bakterií (Chung a kol., 1989). Z předchozích zkoumání bylo zjištěno, že  $\epsilon$ -viniferin inhiboval růst biofilmu *E. coli* O157:H7 (Rabin a kol., 2015) a také spolu s  $\alpha$ -viniferinem mají bakteriostatické účinky na methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) (Basri a kol., 2012).



Následně po vysazení bakteriální suspenze na CASO plotny a jejich inkubování po dobu 24 hodin byly jednotlivé kolonie spočítány. Z výsledků vyplývá, že vybrané přírodní látky nemají baktericidní účinek na vybrané standardní kmeny bakterií. Prvním z důvodů jsou již hodnoty absorbancí, které se přibližují 1. Pokud by látky měly takovýto účinek, hodnoty absorbancí by byly výrazně nižší a na plotnách by následná koncentrace byla nižší než původní 100 CFU/50  $\mu$ l, tedy 2000 CFU/ml. V žádném případě se však nižší koncentrace nevyskytla, ba dokonce před vysazením na plotny bylo třeba bakteriální suspenzi 10<sup>6</sup>x zředit, aby bylo možné kolonie následující den spočítat. Rozdíl oproti publikovaným výsledkům účinku viniferinů na bakterie lze vysvětlit na jednu stranu nejasně definovaným vzorkem (zastoupení jednotlivých viniferinů ve vzorku) i stářím vzorku. Z tohoto důvodu bude pokus znovu zopakován s čerstvě purifikovaným vzorkem viniferinů.

Jako antibakteriální přírodní rostlinnou látku proti spirochétám *B. burgdorferi* s. l. dle dosavadních experimentů lze považovat extrakt z listů stévie sladké (*Stevia Rebaudiana*), který snižoval koncentraci spirochét podobně jako vybraná antibiotika (Theophilus a kol., 2015). Z dosavadních výsledků určení viniferinu jako antibakteriální látky však podobný účinek nebyl pozorován. Při pokusu byl zjištěn minimální účinek proti kmenu *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*, který měl být při dalším pokusu ověřen. Naneštěstí při ověření došlo ke kontaminaci BSK II média, a proto bude pokus zopakován v nejbližší době i s ověřením vlivu DMSO na spirochéty. Dle výsledků z druhého pokusu však lze předpokládat, že DMSO nijak neovlivňuje růst spirochét, a to z důvodu shodnosti počtu borelií u vzorku a pozitivní kontroly.

## 6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala ověřením potenciálních antimikrobiálních účinků rostlinné látky viniferinu a přírodních látek – adamantan-2-oximu a 1,3,5,7-tetrakarboxy-2,6-dion adamantanu. Vliv těchto látek na replikaci viru klíšťové encefalitidy byl studován u buněčné linie glioblastů v různých variantách, které by prokázaly určitý inhibiční vliv na replikaci viru. Následnou plakovou titrací bylo zjištěno, že žádná z látek nemá antivirotický účinek na vir klíšťové encefalitidy.

Druhou částí práce bylo ověření antibakteriálních účinků proti standardním kmenům bakterií a také proti klíšťaty přenášenými spirochétami *B. burgdorferi* s.l. U standardních kmenů nebyl po inkubaci s vybranými přírodními látkami pozorován baktericidní účinek. U ověření účinku viniferinu proti spirochétám také nebyl prozatím prokázán jeho významný antibakteriální účinek.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDALLAH, E. M. Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011, **1**(6), 16-20. ISSN 2231-3354.

ALA'ALDEEN, D. A. a K. HIRAMATSU. *Staphylococcus aureus: molecular and clinical aspects*. Chichester, U.K.: Horwood Pub., c2004. ISBN 18-985-6396-9.

ALBRECHT T., M. FONS, I. BOLDOGH, A. S. RABSON. Effect on cells. In: BARON, Samuel. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 09-631-1721-1.

ANASTASIADI, M., H. PRATSINIS, D. KLETSAS, A.-L. SKALTSOUNIS a S. A. HAROUTOUNIAN. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology*. 2012, **48**(1), 316-322.

ANDERSSON, D. I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, **6**(5), 452–456.

BARON, S.. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 09-631-1721-1.

BASLI, A., S. SOULET, N. CHAHER, J.-M. MÉRILLON, M. CHIBANE, J.-P. MONTI a T. RICHARD. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012, **2012**, 1-14.

BASRI, D. F., C. K. LUOI, A. M. AZMI a J. LATIP. Evaluation of the combined effects of stilbenoid from *Shorea gibbosa* and vancomycin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pharmaceuticals*. 2012, **5**(9), 1032-1043.

BASRI, D. F., L. W. XIAN, N. I. A. SHUKOR a J. LATIP. Bacteriostatic antimicrobial combination: Antagonistic interaction between eEpsilon-viniferin and vancomycin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 2014, **2014**, 1-8.

BEDNÁŘ, M., A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901-5214-7.

BENĚŠ, J. a L. MACHALA. Dobrý sluha, ale zlý pán: aneb Poučení z epidemie *Escherichia coli* EHEC O104:H4. *Vesmír*. 2011, **90**(9), 484-487.

BERTRAM, G. a M.D. KATZUNG. *Základní & klinická farmakologie*. 1. University of California, San Francisco: H&H, 1994, 733-. ISBN 80-85787-35-0.

BILLARD, C., J. C. IZARD, V. ROMAN, C. KERN, C. MATHIOT, F. MENTZ a J. P. KOLB. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*. 2002, **43**(10), 1991-2002.

BOBBARALA., V. *Antimicrobial agents*. Rijeka: InTech, 2012, 432 s. ISBN 978-953-5107-231.

BREMER, H. Variation of generation times in *Escherichia coli* populations: Its cause and implications. *Journal of General Microbiology*. 1982, **128**(12), 2865-2876.

BURGDORFER, W., A. G. BARBOUR, S. F. HAYES, J. L. BENACH, E. GRUNWALDT a J. P. DAVIS. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*. 1982, **216**(4552), 1317-1319.

BURNS, J., P. T. GRADNER, J. O'NEIL, S. CRAWFORD, I. MORECROFT a D. B. MCPHAIL. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(2), 220-230.

BURNS, J., T. YOKOTA, H. ASHIHARA, M. E. J. Lean LEAN a A. CROZIER. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(11), 3337–3340.

CASADEVALL, A. a L. PIROFSKI. Microbiology: Ditch the term pathogen. *Nature*. 2014, **516**, 165–166.

CASJENS, S. R., C. M. FRASER-LIGGETT, E. F. MONGODIN, W.-G. QIU, J. J. DUNN, B. J. LUFT a S. E. SCHUTZER. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of Bacteriology*. 2011, **193**(6), 1489–1490.

COWAN, M. M.. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(4), 564–582. ISSN 0893-8512.

ČOLOVIĆ, M. B., D. Z. KRSTIĆ, T. D. LAZAREVIĆ-PAŠTI, A. M. BONDŽIĆ a V. M. VASIĆ. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*. 2013, **11**(3), 315–335.

DE CARVALHO, I. L., J. E. FONSECA, J. G. MARQUES, A. ULLMANN, A. HOJGAARD, N. ZEIDNER a M. S. NÚNCIO. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clinical Rheumatology*. 2008, **27**(12), 1587-1591.

DICKER, M. *Impact of the grapevine-shoot extract vineatrol@30 and its constituents on human topoisomerases and DNA integrity*. Universität Wien, 2012. Masterarbeit.

DIZA, E., A. PAPA, E. VEZYRI, S. TSOUNIS, I. MILONAS a A. ANTONIADIS. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerging Infectious Diseases*. 2004, **10**(9), 1692–1693.

DJOUKENG, J. D., S. POLLI, P. LARIGNON a E. ABOU-MANSOUR. Identification of phytoalexins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*. 2009, **124**(2), 303-308.

DOMINGUE, G., J. W. COSTERTON a M. R. BROWN. Bacterial doubling time modulates the effects of opsonisation and available iron upon interactions between *Staphylococcus aureus* and human neutrophils. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996, **16**(3-4), 223-228.

ECKER, M., S. L. ALLISON, T. MEIXNER a F. X. HEINZ. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*. 1999, **80**, 179–185.

FARNSWORTH, N. A. a D. D. SOEJARTO. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O., V. HEYWOOD a H. SYNGE. *The conservation of medicinal plants*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 25-51. ISBN 0-521-39206-3.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M., E. MARTÍNEZ-CARBALLO, B. CANCHO-GRANDE, J. L. SANTIAGO, M. C. MATÍNEZ a J. SIMAL-GÁNDARA. Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food chemistry*. 2012, **130**(1), 9-19.

FOSTER, B.C., J.T. ARNASON a C.J. BRIGGS. Natural health products and drug disposition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005, **45**, 203-226. ISSN 0362-1642.

GÓMEZ GALLEGO, M. A., E. GÓMEZ GARCIA-CARPINTERO, E. SÁNCHEZ-PALOMO, I. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ a M. A. GONZÁLEZ VIÑAS. Study of phenolic composition and sensory properties of red grape varieties in danger of extinction from the Spanish region of Castilla-La Mancha. *European Food Research and Technology*. 2011, **234**(2), 295-303.

GOTTENBOS, B., H. C. VAN DER MEI a H. J. BUSSCHER. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, **50**(2), 208-214.

GREŠÍKOVÁ, M. *Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1999. ISBN 80-224-0627-9.

GRIPPI, F., L. CROSTA, G. AIELLO, M. TOLOMEO, F. OLIVERI, N. GEBBIA a A. CURIONE. Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. *Food Chemistry*. 2008, **107**(1), 483–488.

GRITSUN, T. S., P. A. NUTTALL a E. A. GOULD. Tick-borne flaviviruses. *Advances in Virus Research*. 2003, **61**, 317–371.

GUBLER, D., G. KUNO, L. MARKHOFF. Flaviviruses. In: FIELDS, Bernard N, David M KNIPE a Peter M HOWLEY. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams, 2007. ISBN 07-817-6060-7.

GUENGERICH, F. Peter. Role of Cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Advances in Pharmacology*. 1997, **43**, 7–35.

HARTMANN, T. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(12), 4541–4546. ISSN 0027-8424.

HERNÂNI GERÓS, M, M. CHAVES a S. DELROT. *The biochemistry of the grape berry*. Sharjah, U.A.E: Bentham Science, 2012. ISBN 16-080-5360-1.

HIRANO, M., K. YOSHII, M. SAKAI, R. HASEBE, O. ICHII a H. KARIWA. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *Journal of General Virology*. 2014, **95**(4), 849-861.

HLOUCAL, L. Abortivní virové meningoencefalitidy. *Časopis Lekařů Českých*. 1949, **48**, 1390-1394.

HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. 1. Praha: Triton, 1999, 355-363. ISBN 80-85875-96-9.

CHUNG, C. T., S. L. NIEMELA a R. H. MILLER. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1989, **86**, 2172-2175.

IVANOVA, L. B., A. TOMOVA, D. GONZÁLEZ-ACUÑA, et al. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environmental Microbiology*. 2014, **16**(4), 1069-1080.

IVANOVA, V., M. STEFOVA, B. VOJNOSKI, Á. DÖRNYEI, I. MÁRK a V. DIMOVSKA a kol. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*. 2011, **44**(9), 2851-2860.

JEANDET, P., B. DELAUNOIS, A. AZIZ, D. DONNEZ, Y. VASSEROT, S. CORDELIER a E. COUROT. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, **2012**, 1-14.

JIN, Q., X. H. HAN, S. S. HONG, et al. Antioxidative oligostilbenes from *Caragana sinica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012, **22**(2), 973–976.

KAUL, T. N., E. MIDDLETON JR. a P. L. OGRA. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. 1985, **15**(1), 71-79.

KITANAKA, S., T. IKEZAWA, K. YASUKAWA, S. YAMANOUCHI, M. TAKIDO, H.K. SUNG a I.H. KIM. (+)-Alpha-viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1990,**38**, 432-435.

KOFF, WAYNE C., JOE L. ELM, JR. a SCOTT B. HALSTEAD. Inhibition of Dengue virus replication by amantadine hydrochloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **18**(1), 125-129.

LANDA, S. a V. MACHÁČEK. Sur l'adamantane, nouvel hydrocarbure extrait du naphte. *Collectection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1933, **5**, 1-5.

LANDRAULT, N., F. LARRONDE, J.-C. DELAUNAY, et al. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(7), 2046–2052.

LANGCAKE, P. a R. J. PRYCE. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*. 1976, **9**(1), 77–86.

LEE, J. Y., J.-H. KIM, S. S. KANG, C. S. BAE a S. H. CHOI. The effects of  $\alpha$ -Viniferin on adjuvant-induced arthritis in rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2004, **32**(4), 521-530.

LEE, S.H., N.H. SHIN, S.H. KANG, J.S. PARK, S.R. CHUNG, K.R. MIN a Y. KIM. Alpha-viniferin: a prostaglandin H2 synthase inhibitor from root of *Carex humilis*. *Planta Medica*. 1998, **64**, 204-207.

LIANG, Z., C. I. OWENS, G.-Y. ZHONG a I. CHENG. Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chemistry*. 2011, **129**(3), 940-950.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 2003, **111**(9), 1265–1273.

LUZHKOV, V., E. DECROLY, B. CANARD, B. SELISKO a J. ÅQVIST. Evaluation of adamantane derivatives as inhibitors of Dengue virus mRNA cap methyltransferase by docking and molecular dynamics simulations. *Molecular Informatics*. 2013, **32**(2), 155–164.

MADIGAN, M. T, J. M. MARTINKO, D. A. STAHL a D. P. CLARK. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012. ISBN 03-217-2675-8.

MÁLKOVÁ, D. a V. FRAŇKOVÁ. The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice. *Acta Virologica*. 1959, **3**, 210-214.

MANDL, C. W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*. 2005, **111**(2), 161-174.

- MANSFIELD, K. L., N. JOHNSON, L. P. PHIPPS, J. R. STEPHENSON, A. R. FOOKS a T. SOLOMON. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*. 2009, **90**(8), 1781-1794.
- MANSOORI, G. Ali. Diamondoid Molecules. *Advances in Chemical Physics*. 2007, **136**, 207-258.
- MARGOS, G., A. HOJGAARD, R. S. LANE, et al. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Diseases*. 2010, **1**(4), 151–158.
- MARGOS, G., S. A. VOLLMER, N. H. OGDEN a D. FISH. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011, **11**(7), 1545–1563.
- MIRZOYAN, R. S., T. S. GAN'SHINA, D. V. MASLENNIKOV, et al. Cerebrovascular and neuroprotective effects of adamantane derivative. *BioMed Research International*. 2014, **2014**, 1-8.
- O'BRIEN, A. D. a R. K. HOLMES. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiology Reviews*. 1987, **51**(2), 206–220.
- OLOWOSULU, A.K. a Y.K.E. IBRAHIM. Studies on the antimicrobial screening of aqueous extracts of five plants used in Folk medicine in Nigeria. *West African Journal of Biology Sc*. 2006, **3**(5), 21-26.
- OSHIMA, Y., K. NAMAHO, A. KAMIJOU, S. MATSUOKA, M. NAKANO, K. TERAOKA a Y. OHIZUMI. Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). *Experientia*. 1995, **51**, 63-66.
- PALUS, M., T. BÍLÝ, J. ELSTEROVÁ, H. LANGHANSOVÁ, J. SALÁT, M. VANCOVÁ a D. RŮŽEK. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*. 2014, **95**(11), 2411-2426.
- PEZET, R., C. PERRET, J. B. JEAN-DENIS, R. TABACCHI, K. GINDRO a O. VIRET.  $\Delta$ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(18), 5488–5492.
- PFLIEGER, A., P. W. TEGUO, Y. PAPASTAMOULIS, et al. Natural stilbenoids isolated from grapevine exhibiting inhibitory effects against HIV-1 integrase and Eukaryote MOS1 transposase *in vitro* activities. *PLoS One*. 2013, **8**(11), 1-13.
- PIVER, B., F. BERTHOUE, Y. DREANO a D. LUCAS. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sciences*. 2003, **73**(9), 1199-1213.



- PRASUN, C. a S. R. WAKODE. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of various mannich bases of isoindole-1-one derivatives. *International Journal of Science and Research*. 2015, **4**(1), 2624-2628. ISSN 2319-7064.
- PRELOG, V. a R. SEIWERTH. Über die Synthese des Adamantans. *Berichte*. 1941, **74**(10), 1644-1648.
- PRINTSEVSKAYA, S. S., S. E. SOLOVIEVA, E. N. OLSUFYEVA, E. P. MIRCHINK, E. B. ISAKOVA, E. DE CLERCQ, J. BALZARINI a M. N. PREOBRAZHENSKEYA. Structure-activity relationship studies of a series of antiviral and antibacterial aglycon derivatives of the glycopeptide antibiotics vancomycin, eremomycin, and dechloroeremomycin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005, **48**(11), 3885-3890.
- PRITT, B. S., P. S. MEAD, D. K. JOHNSON, et al. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, **16**, 1-9.
- PRIVAT, C., J. P. TELO, V. BERNARDES-GENISSON, A. VIEIRA, J.-P. SOUCHARD a F. NEPVEU. Antioxidant properties of trans- $\epsilon$ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2002, **50**(5), 1213–1217.
- RABIN, N., Y. ZHENG, C. OPOKU-TEMENG, Y. DU, E. BONSU a H. O. SINTIM. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*. 2015, **7**(5), 647–671.
- RAMEZANI, H. a G. A. MANSOORI. *Molecular building blocks for nanotechnology: from diamondoids to nanoscale materials and applications*. New York: Springer, 2007, s. 44-71. ISBN 9780387399379.
- RIJPKEMA, S. G., D. J. TAZELAAR, M. J. MOLKENBOER, G. T. NOORDHOEK, G. PLANTINGA, L. M. SCHOOLS a J. F. SCHELLEKENS. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical Microbiology and Infection*. 1997, **3**(1), 109-116.
- ROLFE, M. D., C. J. RICE, S. LUCCHINI, et al. Lag phase is a Distinct Growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient Metal accumulation. *Journal of Bacteriology*. 2012, **194**(3), 686–701.
- RUDENKO, N., M. GOLOVCHENKO, L. GRUBHOFFER a J. H. OLIVER JR. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Diseases*. 2011a, **2**(3), 123-128.

RUDENKO, N., M. GOLOVCHENKO, L. GRUBHOFFER a J. H. OLIVER, JR. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011b, **61**(2), 381-383.

RUIJUN, W., M. WENBIN, W. YUMIN, Z. RUIJIAN, H. PUWEIZHONG a L. YULIN. Inhibition of glioblastoma cell growth in vitro and in vivo by brucine, a component of Chinese medicine. *Oncology Research*. 2014, **22**(5-6), 275-281.

RUSKA, H., B. V. BORRIES a E. RUSKA. Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung. *Archiv für die gesamte Virusforschung*. 1939, **1**(1), 155-169.

RŮŽEK, D., M. VANCOVÁ, M. TESAŘOVÁ, A. AHANTARIG, J. KOPECKÝ a L. GRUBHOFFER. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *Journal of General Virology*. 2009, **90**, 1649–1658.

RŮŽEK, D., V. DANIELOVÁ, M. DANIEL, et al. *Klíšťová encefalitida*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-5305-8.

SAGA, T. a K. YAMAGUCHI. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan medical association journal*. 2009, **52**(2), 103-108.

SANDLE, T. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for quality assurance and quality control*. 1. Cambridge, Waltham, Kidlington: Woodhead publishing, 2016. ISBN 978-0-08-100044-1.

SEERAM, N. P., V. V. KULKARNI, S. PADHYE. Source and chemistry of resveratrol. In: AGGARWAL, B. B., S. SHISHODIA. *Resveratrol in Health and Disease*. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005. s. 17-32. ISBN 978-1-4200-2647-4.

SEYA, K., K. KANEMARU, C. SUGIMOTO, et al. Opposite effects of two resveratrol (trans-3,5,4-trihydroxystilbene) tetramers, vitisin A and hopeaphenol, on apoptosis of myocytes isolated from adult rat heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009, **328**(1), 90-98.

SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.

SCHLEIFER, K. H. a W. E. KLOOS. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin: I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1975, **25**(1), 50-61.

SCHNEIDER, H. Über epidemische akute "Meningitis serosa". *Wiener klinische Wochenschrift*. 1931, **44**, 350-352.

SCHWAB, J., C. HAMMERSCHMIDT, D. RICHTER, C. SKERKA, F.-R. MATUSCHKA, R. WALLICH, P. F. ZIPFEL a P. KRAICZY. *Borrelia valaisiana* resist complement-mediated killing independently of the recruitment of immune regulators and inactivation of complement components. *PLoS One*. 2013, **8**(1), 1-14.

SIM, J., H. W. JANG, M. SONG, J. H. KIM, S. H. LEE a S. LEE. Potent inhibitory effect of alpha-viniferin on human cytochrome P450. *Food and Chemical Toxicology*. 2014, **69**, 276–280.

SOURAL, I., N. VRCHOTOVÁ, J. TŘÍSKA, J. BALÍK, Š. HORNÍK, P. CUŘÍNOVÁ a J. SÝKORA. Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules*. 2015, **20**, 6093-6112.

STANEK, G. a F. STRLE. Lyme borreliosis: a European perspective on diagnosis and clinical management. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2009, **22**(5), 450-454.

STOCKWELL, C. *Nature's pharmacy: A history of plants and healing*. 1. London: Century Hutchinson Ltd, 1988. ISBN 0712618325.

STRUTHERS, J. K. a R. P. WESTRAN. *Clinical Bacteriology*. London: Manson Pub, 2003. ISBN 978-184-0765-632.

SUNG, S. H., S. Y. KANG, K.Y. LEE, M. J. PARK, J. H. KIM, J. H. PARK, Y. C. KIM a J. KIM. (+)- $\alpha$ -Viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002, **25**(1), 125—127.

ŠVAJDOVÁ, Z. *Resveratrol jako biologicky aktivní látka a jeho význam pro lidské zdraví*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2011.

THEOPHILUS, P. A. S., M. J. VICTORIA, K. M. SOCARRAS, K. R. FILUSH, K. GUPTA, D. F. LUECKE a E. SAPI. Effectiveness of *Stevia rebaudiana* whole leaf extract against the various morphological forms of *Borrelia burgdorferi* in vitro. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2015, **5**(4), 268–280.

THOMSON, W. A. a R. E. SCHULTES. *Medicines from the earth: a guide to healing plants*. Rev. and with new foreword. San Francisco: Distributed by Harper, 1983, 179 p. ISBN 09-123-8301-1.

TŘÍSKA, J. 80 let od objevu adamantanu. *Chemické Listy*. 2012, **106**, 991-1014.

UPADHYAY, A. S., K. VONDERSTEIN, A. PICHLMAIR, et al. Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell Microbiology*. 2014, **16**(6), 834-848.

VAN DAM, A. P. Diversity of Ixodes-borne *Borrelia* species – clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2002, **2**(4), 249-254.

VANETTEN, H. D., J. W. MANSFIELD, J. A. BAILEY a E. E. FARMER. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins”. *The Plant Cell*. 1994, **6**(9), 1191-1192.

VÍCHA, R. a M. POTÁČEK. Kde roste adamantan. *Chemické Listy*. 2004, **98**, 68-74.

VITRAC, X., A. BORNET, R. VANDERLINDE, J. VALLS, T. RICHARD, J.-C. DELAUNAY, J.-M. MÉRILLON a P.-L. TEISSÉDRE. Determination of Stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(14), 5664–5669.

VOGT, R. L. a L. DIPPOLD. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002. *Public Health Reports*. 2005, **120**(2), 174-178.

WENZEL, M. *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9.

WIBOWO, A., N. AHMAT, A. S. HAMZAH, A. S. SUFIAN, N. H. ISMAIL, R. AHMAD, F. M. JAAFAR a H. TAKAYAMA. Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. *Fitoterapia*. 2011, **82**(4), 676–681.

ZAITLIN, M. The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. KUNG, S.-D. a S.-F. YANG (eds.). *Discoveries in plant biology*. 1. River Edge, NJ: World Scientific, 1998, s. 105-110. ISBN 9810213131.

ZGHONDA, N., S. YOSHIDA, S. EZAKI, Y. OTAKE, C. MURAKAMI, A. MLIKI, A. GHORBEL a H. MIYAZAKI.  $\epsilon$ -viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2012, **76**(5), 954-960.

ZUO, G.-Y., X.-J. ZHANG, C.-X. YANG, J. HAN, G.-C. WANG a Z.-Q. BIAN. Evaluation of traditional Chinese medicinal plants for anti-MRSA activity with reference to the treatment record of infectious diseases. *Molecules*. 2012, **17**(3), 2955-2967. ISSN 1420-3049.