

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Antibakteriální aktivita konopných extraktů v různém  
stádiu zralosti**

**Diplomová práce**

**Bc. Jana Štěpánová**

**Výživa a potraviny**

**Prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Antibakteriální aktivita konopných extraktů v různém stádiu zralosti“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. dubna 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce, prof. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Malé, Ph.D., která mi velmi pomohla v praktické části práce a poskytla mi spoustu cenných informací pro psaní. Velký dík patří také mé rodině a přátelům, bez jejichž podpory by tato práce nevznikla a také mému partnerovi, který mě při psaní této práce velmi podporoval.

# Antibakteriální aktivita konopných extraktů v různém stádiu zralosti

## Souhrn

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium antibakteriální aktivity konopných extraktů v různém stádiu zralosti (1–13 týdnů stáří rostliny). Konkrétně se zabývala aktivitou proti patogenní bakterii *Staphylococcus aureus*. Teoretická část práce je zaměřena na problematiku *S. aureus*, jakožto jednoho z nejvýznamnějších patogenů se schopností rezistence proti antibiotické léčbě. Dále se práce zabývala také rostlinou *Cannabis sativa* L. a jejími účinky na lidské zdraví, především účinky antimikrobiálními. V této práci, byl také zdůrazněn celkový význam konopí ve výživě člověka jakožto zdroje esenciálních mastných kyselin, bílkovin či vlákniny. Praktická část práce byla prováděna pomocí standardizované mikrodiluční metody, kdy byla stanovována minimální inhibiční koncentrace (MIC) 13 extraktů. Hodnoty této koncentrace byly stanoveny jako modus nejnižších zaznamenaných koncentrací konopných extraktů vedoucích k 80% úbytku růstu bakterie *S. aureus* oproti kontrole. Testovány byly extrakty konopí setého v různém stádiu zralosti, a to konkrétně v průběhu 13 týdnů. Obsah kanabinoidů všech extraktů byl identifikován pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD), se zaměřením na kanabinoidy CBD, CBG, CBL, CBN a THC. Testování probíhalo s bakteriemi, které byly zastoupeny meticilin-senzitivním ATCC 29213 a meticilin-rezistentním ATCC 43300 druhem. Stanovené hodnoty MIC proti těmto patogenům se pohybovaly v rozmezí hodnot od 16 µg/ml do 256 µg/ml. Nejnižší hodnota byla naměřena u obou kmenů v sedmém týdnu sklizně. Hodnoty nevykázaly žádný významný rozdíl mezi druhy meticilin-senzitivními a meticilin-rezistentními. Lze konstatovat, že extrakty s obsahem kanabinoidů mají antibakteriální účinky proti grampozitivnímu patogenu *S. aureus* jak meticilin-senzitivního, tak meticilin-rezistentního. U obou kmenů byla nejnižší hodnota MIC naměřena v sedmém týdnu zralosti rostliny, to je tedy období optimální sklizně při využití konopí pro antibakteriální účely.

**Klíčová slova:** konopí, kanabinoidy, inhibice, bakterie, infekce



# Antibacterial activity of hemp extracts in various harvesting periods

## Summary

The presented thesis is focused on the study of antibacterial activity of cannabis extracts at various stages of maturity (1–13 weeks). Specifically, it deals with the activity against the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*. The theoretical part of the thesis deals with *S. aureus* as one of the most important pathogens with the ability to resist antibiotic treatment. The thesis also deals with the plant *Cannabis sativa* L. and its effects on human health, especially antimicrobial effects. In this work, the overall importance of cannabis in human nutrition, for example as a source of essential fatty acids, protein or fibre, is also highlighted. The practical part of the work was done by using a standardized microdilution method, where the minimum inhibitory concentration (MIC) of 13 extracts was determined. The values of this concentration were determined as the modus of the lowest recorded concentrations of cannabis extracts leading to an 80% reduction in the growth of *S. aureus* compared to the control. The cannabis extracts were tested at different stages of maturity, specifically over a 13-week period. The cannabinoid content of all extracts was identified by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), focusing on the cannabinoids CBD, CBG, CBL, CBN and THC. Testing was performed with bacteria represented by methicillin-sensitive ATCC 29213 and methicillin-resistant ATCC 43300 species. The MICs determined against these pathogens ranged from 16 µg/ml to 256 µg/ml. The lowest value was measured for both strains in the seventh week of harvest. The values showed no significant difference between methicillin-susceptible and methicillin-resistant species. It can be concluded that extracts containing cannabinoids have antibacterial effects against both methicillin-sensitive and methicillin-resistant Gram-positive pathogen *S. aureus*. For both strains, the lowest MIC value was measured in the seventh week of plant maturity, which is the optimal harvest period for the use of cannabis for antibacterial purposes.

**Keywords:** cannabis, cannabinoids, inhibition, bacteria, infection

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Úvod .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>                          | <b>9</b>  |
| <b>2.1 Hypotéza .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2.2 Cíl práce.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3 Literární rešerše.....</b>                                       | <b>10</b> |
| <b>3.1 Mikrobiota kůže .....</b>                                      | <b>10</b> |
| <b>3.2 Staphylococcus spp. ....</b>                                   | <b>12</b> |
| 3.2.1 Staphylococcus aureus.....                                      | 12        |
| 3.2.2 Staphylococcus saprophyticus .....                              | 13        |
| 3.2.3 Staphylococcus epidermidis .....                                | 14        |
| <b>3.3 Infekce způsobené bakteriemi rodu Staphylococcus spp. ....</b> | <b>14</b> |
| 3.3.1 Prevalence výskytu infekcí .....                                | 16        |
| <b>3.4 Bakteriální rezistence k antibiotikům .....</b>                | <b>18</b> |
| 3.4.1 Meticilin – rezistentní Staphylococcus aureus .....             | 20        |
| <b>3.5 Antibakteriální aktivita přírodních látek .....</b>            | <b>21</b> |
| <b>3.6 Cannabis sativa L.....</b>                                     | <b>21</b> |
| 3.6.1 Biologicky aktivní látky konopí .....                           | 22        |
| 3.6.1.1 Fenolické sloučeniny .....                                    | 22        |
| 3.6.1.2 Kanabinoidy .....   | 23        |
| 3.6.1.3 Terpeny.....  | 25        |
| 3.6.2 Konopné extrakty.....   | 25        |
| 3.6.2.1 Metody extrakce .....   | 26        |
| 3.6.3 Cannabis sativa L. ve výživě člověka.....                       | 27        |
| <b>4 Materiál a metody .....</b>                                      | <b>30</b> |
| <b>4.1 Teoretická část.....</b>                                       | <b>30</b> |
| <b>4.2 Praktická část .....</b>                                       | <b>30</b> |
| 4.2.1 Materiál použitý v praktické části diplomové práce.....         | 30        |
| 4.2.1.1 Bakteriální kmeny a kultivační média .....                    | 30        |
| 4.2.1.2 Konopné extrakty .....  | 30        |
| 4.2.2 Metody použití v praktické části diplomové práce.....           | 31        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.2.1   | Extrakce biologicky aktivních látek z Cannabis sativa L.....   | 31        |
| 4.2.2.2   | Biologicky aktivní látky v použitých extraktech.....           | 31        |
| 4.2.2.3   | Testování antibakteriálních účinků konopných extraktů.....     | 31        |
| 4.2.2.4   | Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....                | 32        |
| <b>5</b>  | <b>Výsledky .....</b>  | <b>33</b> |
| 5.1       | Vysoce účinná kapalinová chromatografie s diodovým polem ..... | 33        |
| 5.2       | Minimální inhibiční koncentrace konopných extraktů .....       | 35        |
| <b>6</b>  | <b>Diskuze .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>7</b>  | <b>Závěr.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>8</b>  | <b>Literatura.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>9</b>  | <b>Seznam grafů, obrázků a tabulek.....</b>                    | <b>52</b> |
| <b>10</b> | <b>Samostatné přílohy.....</b>                                 | <b>I</b>  |

# 1 Úvod

Antibiotika mají v léčbě bakteriálních onemocnění dlouhou tradici. Celosvětový problém však způsobuje jejich velké nadužívání, které přispívá k šíření bakteriální rezistence. V posledních letech se rezistentní infekce staly hrozbou pro zdraví společnosti a také globální zdravotní výzvou (Anes et al. 2015). Tento problém je třeba řešit, jelikož rezistence k antibiotikům znamená zásadní komplikaci v léčbě celé řady bakteriálních onemocnění, přičemž v některých případech mohou infekce rezistentními mikroorganismy končit až smrtí. Pro redukci nadužívání antibiotik v oblasti zemědělství vyšlo v roce 2006 v platnost nařízení zakazující používání antibiotik jako stimulatorů růstu ve výživě hospodářských zvířat (EU 2003).

Absolutní vyloučení antibiotik z léčby možné není, nicméně je snahou celé řady výzkumných týmů nalézt alternativy, tedy látky s antibakteriálními účinky, které mohou používání antibiotik redukovat. Velký prostor pro uplatnění mají látky přírodního charakteru, jelikož celá řada z nich vykazuje antibakteriální účinky. Praktické využití těchto látek, případně jejich kombinace, mohou pomoci redukovat kontaminaci ekosystému antibiotiky.

Velmi slibnou variantou v této oblasti se zdají být extrakty konopí setého (*Cannabis sativa* L.). Z látek v nich obsažených, majících antibakteriální účinky lze uvést například kanabinoidy, jejichž přirozeným zdrojem je právě rostlina konopí, ze které se tyto látky získávají různými metodami extrakce. Tyto metody jsou v této práci stručně popsány. Konopí je pro své antimikrobiální a léčivé účinky známo již několik století a jeho potenciál využití v oblasti medicíny je velký. Bylo navrženo několik možností antibakteriálních mechanismů účinku, obecně však lze říci, že sekundární metabolity rostlin mají vlastnosti, které mohou poškodit bakteriální membrány tím, že inhibují tvorbu biofilmu nebo supresí faktorů virulence, jako jsou enzymy a toxiny (Frassinetti et al. 2020).

Přínos této rostliny pro zdraví člověka není dán pouze jejími antimikrobiálními vlastnostmi, ale také velmi zajímavým nutričním složením, zejména u semen. Semena konopí jsou bohatým zdrojem mastných kyselin, fenolických sloučenin, nebo vlákniny, která je schopna zvýšit sytost, kontrolovat obezitu a předcházet dalším onemocněním (Farinon et al. 2020; Tucker 2017).

Praktická část této diplomové práce je věnována stanovení antimikrobiální aktivity konopných extraktů v různém stádiu zralosti vůči bakterii rodu *Staphylococcus*, konkrétně proti *Staphylococcus aureus*. Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou běžnou součástí mikrobioty kůže a sliznic člověka. Jsou to také původci závažných infekcí jak u lidí, tak u zvířat. Infekce zahrnují infekce kůže, měkkých tkání či letální pneumonii. Výsledky těchto stanovení mohou posloužit jako podklad pro další výzkum v této oblasti zaměřující se na studium antibakteriální aktivity látek přírodního charakteru.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Hypotéza**

Extrakty z rostliny konopí setého (*Cannabis sativa* L.) vykazují antibakteriální aktivitu, která souvisí s týdnem sklizně.

### **2.2 Cíl práce**

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit literární rešerši na téma působení antiseptických látek přírodního charakteru, konkrétně extraktů konopí setého (*Cannabis sativa* L.) vůči bakteriálním původcům infekcí člověka. Cílem experimentální části diplomové práce bylo stanovit minimální inhibiční koncentrace daných extraktů *Cannabis sativa* L. v různé fázi zralosti.

## 3 Literární rešerše

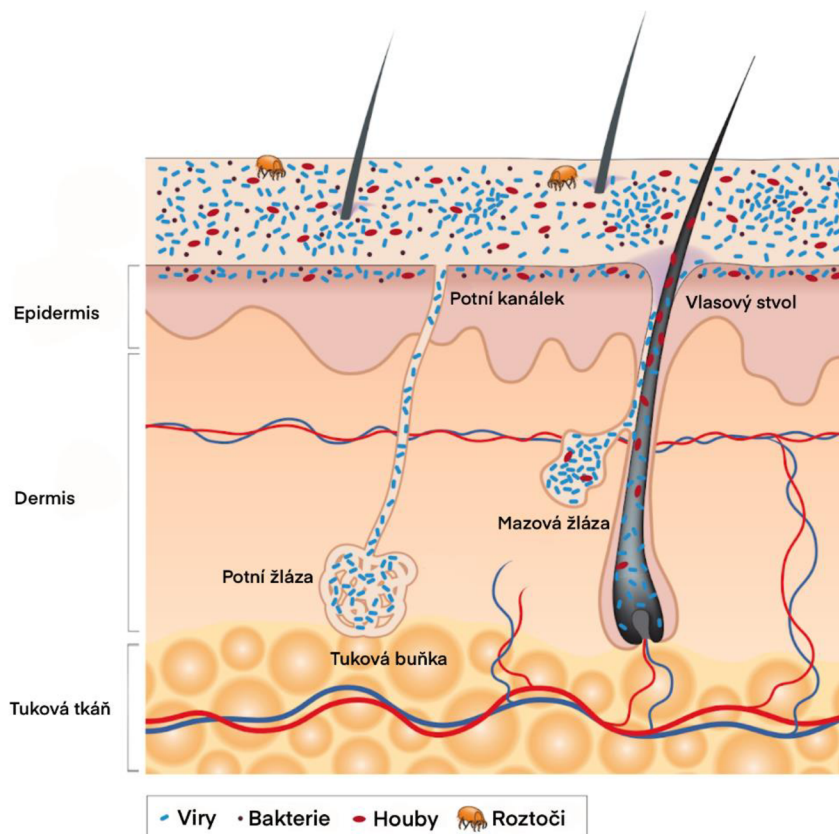
### 3.1 Mikrobiota kůže

Jedním z největších orgánů lidského těla je lidská kůže, která plní řadu funkcí. Jedná se o komplexní a dynamický ekosystém, který je obýván bakteriemi, archei, houbami a viry. Tyto mikroby souhrnně označujeme jako kožní mikrobiotu. S ohledem na počet mikrobiálních buněk, které se na pokožce nachází, je lidská kůže na čtvrtém místě v hodnocení nejvíce kolonizovaných míst lidského těla (Wilson 2008). Tato mikrobiota může potenciálně způsobovat řadu kožních onemocnění (např. akné, atopická dermatitida apod.), ale mnoha způsoby přispívá k ochranným funkcím lidské kůže, jelikož funguje jako mechanická a biologická bariéra proti chemickým, fyzikálním a patogenním hrozbám.

Mikroby jsou v lidském těle přítomny během celého života, často bývají označovány jako původci nemocí, postupně si ale společnost začíná uvědomovat, že jsou pro naši existenci nepostradatelné (Finlay & Finlay 2020). Celé lidské tělo je pokryto velkým množstvím mikroorganismů. Mikroorganismy komunikují s imunitním systémem organismu a informují jej o stavu povrchu kůže, a ten pak reaguje a vhodně odpovídá a chrání nás před patogeny (Finlay & Finlay 2020).

Anatomicky je kůže složená ze dvou různých částí, a to části zvané epidermis, která je složená převážně z keratinocytů a dermis, což je síť kolagenových a elastinových vláken, bohatých na fibroblasty, které poskytují pleti pevnost a elasticitu. Další součásti kůže jako jsou vlasy, folikuly, mazové žlázy a potní žlázy jsou umístěny v dermis. Oblasti kůže se velmi liší hustotou a rozmanitostí žláz a vlasových folikul a tím i prostředím pro růst bakterií, které jak fyzikálně, tak chemicky ovlivňují růst bakterií. Například druhy *Cutibacterium* (dříve *Propionibacterium*) (Scholz & Kilian 2016) a druhy *Staphylococcus* dominují mazovým oblastem (jako je obličej a trup), zatímco *Corynebacterium*, *Staphylococcus* a  $\beta$ -*Proteobacteria* se nacházejí ve vlhkých oblastech (jako jsou podpaží, lokty a kolena) (Grice et al. 2009). Příčný průřez kůže zobrazuje Obrázek 1.

Proces hromadění kožní mikrobioty na lidském těle začíná během porodu, kde kolonizace kůže závisí na způsobu porodu. Novorozenci narození vaginálně získávají bakterie, kolonizující pochvu, kdežto novorozenci narození císařským řezem, získávají mikroorganismy více spojené s kůží (Mueller et al. 2015).



Obrázek 1 Příčný průřez kůže s mikroorganismy a kožními deriváty (Grice & Segre 2011)

Největší restrukturalizace mikroflóry probíhá zejména během puberty, v období, kdy zvýšené hladiny hormonů stimulují mazové žlázy k produkci mazu, dochází zde tedy k podpoře expanze lipofilních mikroorganismů zastoupených rody *Propionibacterium* spp. a *Corynebacterium* spp. Naopak je snižována četnost *Firmicutes* (druhů *Staphylococcus* a *Streptococcus*) (Oh et al. 2012). V dospělosti již zůstává mikrobiální složení v průběhu času stabilní (Oh et al. 2016), což naznačuje, že mezi mikroby a hostitelem existují vzájemně prospěšné interakce.

V sekvenačních průzkumech zdravých dospělých jedinců (Oh et al. 2014; Grice & Segre 2011) bylo zjištěno, že složení přirozené kožní mikrobioty je primárně závislé na dané kožní lokalitě. Tyto průzkumy se zabývaly také změnami v poměru zastoupených bakteriálních taxonů ve vlhkém, suchém či mazovém mikroprostředí. V oblastech vyústění mazových žláz dominují lipofilní druhy *Propionibacterium*, zatímco druhy *Staphylococcus* a *Corynebacterium* jsou přednostněji vyskytovány v oblastech s vyšší vlhkostí, včetně ohybů loktů a nohou. Složení společenstev hub bylo na rozdíl od bakteriálních podobné na různých místech těla bez ohledu na fyziologii (Oh et al. 2014).

Složení mikrobioty lidského těla se může výrazně měnit během zánětu. Například patogen *S. aureus*, který kůži kolonizuje je často asymptomatický, zatímco *S. epidermidis* může onemocnění podporovat (Ramsey et al. 2016; Otto 2009).

Kůže funguje jako bariéra, omezující invazi a růst patogenních bakterií. Mezi kožní antimikrobiální obranné mechanismy patří její nízký obsah vlhkosti, produkce lysozymu, kyselost (pH 5). Většina oblastí kůže je suchá, což vytváří velmi nepříznivé prostředí pro rozmnožování bakterií. Kůže je chladnější, než je běžná tělesná teplota a také mírně kyselá, což znesnadňuje podmínky pro mikroorganismy, jelikož většina bakterií roste nejlépe při neutrální pH a teplotě okolo 37 °C (Chiller et al. 2001). Dalším obranným mechanismem je odlupování mrtvých keratinocytů, které fyzicky odstraňují kolonie bakterií.

### 3.2 *Staphylococcus* spp.

Prvními badateli, kteří popsali hroznovité bakterie v hnisu byli v osmdesátých letech 19. století skotský chirurg Alexander Ogston (1880) a přírodovědec Louis Pasteur (1880). Ogston v roce 1882 poprvé použil označení „*staphylococcus*“ – hrozníčkovité koky. Německý lékař Anton Julius Friedrich Rosenbach (1884) popsal druh *S. aureus*.

Rod *Staphylococcus* patří mezi grampozitivní nepohyblivé a nesporulující kulovité bakterie (Genc et al. 2008). Jednotlivé koky mají velikost v průměru 0,5–1 µm. Tvar shluků připomínající hrozny (staphylé v řečtině znamená hrozny), je typickým uspořádáním pro tuto skupinu mikroorganismů. Mohou se ale také objevit samostatně, v párech, tetradách či krátkých řetězcích (Beneš 2009). Jsou fakultativně anaerobní, mohou se ovšem objevit i výjimky (Votava et al. 2003). Tento rod poměrně dobře odolává nepříznivým vlivům vnějšího prostředí, rostou i při halofilním prostředí, jsou odolní i vysychání. Tyto vlastnosti mohou být projevem adaptace na zaschlý pot (Murray et al. 2003).

Zástupci rodu *Staphylococcus* mohou být původci závažných infekcí jak u lidí, tak i u zvířat. Tento rod čítá kolem 53 druhů a poddruhů (Petráš 2010). Celý rod je možné rozdělit na dvě hlavní skupiny, dle schopnosti enzymu koagulázy, koagulovat plazmu. První skupina je koaguláza-pozitivní stafylokoky, druhá skupina negativní (Votava 2003; Beneš 2009).

Zástupce *S. aureus*, *S. lugdunensis* nebo *S. intermedius* jsou řazeni mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky. Hlavním a nejčastějším patogenem člověka z této skupiny je *S. aureus*.

Mezi koaguláza-negativní stafylokoky patří *S. epidermidis*, *S. hominis* či *S. saprophyticus*. Jedná se o komenzální bakterie, které tvoří podstatnou část běžného mikrobiomu kůže a sliznic člověka. Lze je také nalézt v potravinách či jiném prostředí.

#### 3.2.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* může vyvolat řadu infekčních onemocnění, jako jsou například infekce kůže, měkkých tkání, endokarditida, osteomyelitida a pneumonie. Jedná se o zcela běžnou bakterii, která se často zcela neškodně zdržuje na kůži nebo v nosní dutině zdravého člověka. Při porušení kůže či oslabení imunitního systému však může *S. aureus* způsobovat menší kožní infekce až dokonce život ohrožující stavy. Buňky *S. aureus* mohou kontaminovat i neživé prostředí, je známo, že na neživých površích jsou buňky schopné přežít týdny, dokonce



měsíce (Wagenvoort et al. 2000). Přibližně 20 % lidské populace patří mezi dlouhodobé nosiče *S. aureus*, většina z nich nevykazuje žádné klinické příznaky (Humphreys 2012).

*S. aureus* je významným kolonizátorem kůže, nosních dutin, dále je také možné jej nalézt v gastrointestinálním traktu a hltanu (Wertheim et al. 2005).

*S. aureus* je řazen do rodu *Staphylococcus*, čeleď *Staphylococcaceae*, třída *Bacilli*, kmen *Firmicutes*. Na Gramovo barvení je pozitivní, velikost jeho částic je ~0,8 µm v průměru. Jeho uspořádání pod mikroskopem je obrazec připomínající řetězec hroznů. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterii, řadí se mezi termofilní bakterie tzn., že jeho optimální teplota pro rozmnožování a růst je 37 °C, ideální hodnota pH je 7,4 (Gardete & Tomasz 2014; Edwards & Massey 2011). *S. aureus* netvoří ani spory ani bičíky, ale vytváří pouzdra. Zároveň může produkovat zlatožlutý pigment a je schopný rozkládat manitol (Tayeb-Fligelman et al. 2017).

*S. aureus* je především jedním z hlavních nemocničních a komunitních infekcí a může způsobovat mnoho infekčních onemocnění, jako je například infekce kůže, měkkých tkání, endokarditida, osteomyelitida, bakteriémie a letální pneumonie (Humphreys 2012). Poprvé byl *S. aureus* objeven v roce 1880 chirurgem Alexanderem Ogstonem ve skotském Aberdeenu u pacientů s vředy.

Dle citlivosti na antibiotika lze *S. aureus* rozdělit na methicilin-senzitivní *S. aureus* (MSSA) a methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA). V důsledku evoluce bakterií, a především díky nadužívání antibiotik se začaly rezistence *S. aureus* postupně zvyšovat, míra infekce MRSA světově narůstá a klinická léčba je stále obtížnější, neboť některé kmeny si vyvinuly nebo získaly rezistenci vůči více antibiotikům, včetně vankomycinu (Tenover et al. 2004).

### 3.2.2 *Staphylococcus saprophyticus*

*Staphylococcus saprophyticus* je gram-pozitivní, koaguláza-negativní nehemolytický kok, který je častou příčinou především infekcí močových cest, méně často je pak zodpovědný za komplikace včetně akutní pyelonefritidy, uretritidy, epididymitidy a prostatitidy (Argemi et al. 2019). Je součástí běžně se vyskytující lidské mikrobioty, která kolonizuje perineum, konečník, močovou trubici, děložní hrdlo a gastrointestinální trakt. *S. saprophyticus* je po *Escherichia Coli* druhým nejčastějším původcem infekce močových cest. U žen ve věku 16 až 25 let způsobuje až 42 % všech infekcí (Ehlers & Merrill 2019).

*S. saprophyticus* je obvykle citlivý na antibiotika běžně předepisovaná pacientům s infekcí močového měchýře, s výjimkou kyseliny nalidixové. Bylo pozorováno, že významně více pacientů infikovaných *S. saprophyticus* trpí dysurií, častým močením a bolestí zad než pacienti infikováni *E. coli* (Jelldehen et al. 1996).

### 3.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* je zástupcem běžně se vyskytujícího mikroorganismu lidské epiteliální mikroflóry, jedná se o jeden z nejčastějších nozokomiálních patogenů. Nozokomiální nákazy jsou onemocnění exogenního či endogenního původu, které vznikají v souvislosti s hospitalizací pacientů ve zdravotnickém zařízení. Nejčastější nozokomiální nákazy jsou infekce respiračního traktu, infekce močových cest, krevního řečiště (sepsy) a ranné chirurgické infekce (bezpečnost personálu).

Ačkoli *S. epidermidis* byl dříve považován za neškodný komenzální mikroorganismus na lidské kůži, nyní je důležitým oportunním patogenem. Spolu se *S. aureus* se řadí mezi nejvýznamnější původce nozokomiálních infekcí. Ačkoli infekce způsobené *S. epidermidis* se vyskytují jen zřídka v život ohrožujících onemocněních, je jejich četnost velmi vysoká a jsou obtížně léčitelné (Otto 2009).

*S. epidermidis* je nejčastějším druhem izolovaným z lidského epitelu. Lze ho nalézt v podpaží, na hlavě a také na chodidlech. Díky analýze genomu bylo zjištěno, že tento druh je vybaven geny, které mu poskytují ochranu před těžkými podmínkami (Zhang et al. 2003). Například pro zvládání extrémních koncentrací soli a osmotického tlaku. Patří mezi koaguláza-negativní bakterie, tudíž na rozdíl od *S. aureus* neobsahuje enzym koagulázu.

*S. epidermidis* je původce infekcí pocházejících ze zdravotnických pomůcek jako jsou intravenózní katetry. Tyto infekce způsobují bakterie, které se vyskytují přímo na kůži pacienta, nebo zdravotnického personálu. U tohoto mikroorganismu jsou přítomny specifické geny rezistence vůči antibiotickým látkám. *S. epidermidis* je rezistentní k meticilinu, který patří mezi antibiotika používaná proti stafylokokovým infekcím, a to dokonce více, než *S. aureus* (40–60 %) (Diekema et al. 2001). Kromě rezistence k meticilinu, získaly kmeny *S. epidermidis* také rezistenci k několika dalším antibiotikům, včetně rifamycinu, fluorochinolonů, tetracyklinu a sulfonamidům (Rogers et al. 2009).

Většina genů rezistence k antibiotikům je kódována v plazmidech. Navzdory rozšířené rezistenci k meticilinu a dalším antibiotikům je 80 % katétrů infikovaných *S. epidermidis* stále léčitelných antibiotiky, jako je vankomycin, bez nutnosti odstranění katétru (Raad et al. 2007). Nadměrné užívání antibiotik odráží četnost výskytu rezistence *S. epidermidis* na antibiotika. Důležité je však zmínit, že všudypřítomnost tohoto mikroorganismu z něj činí optimální nosič a rezervoár genů rezistence vůči antibiotikům. Tyto geny lze přenést na *S. aureus*, čímž se zvyšuje patogenní úspěch a odolnost tohoto patogenu vůči antibiotikům (Otto 2009).

## 3.3 Infekce způsobené bakteriemi rodu *Staphylococcus* spp.

Chronickou ránu prodělá během svého života 1–2 % populace v rozvojových zemích. Pacienty s chronickými ranami jsou zpravidla lidé ve věku nad 60 let. Definice chronické rány není zcela jednoznačně stanovena. Většina autorů považuje za chronickou ránu tu, která se nezhojí do 4–6 týdnů (Syngh et al. 2004). Další definice uvádí, že se jedná o rány, které

nevykazují po 2–4 týdnech optimální terapie zmenšení plochy o 20 až 40 %. Chirurgické učebnice definují chronické rány jako ty, které se nezhojí do 6 měsíců (Brunicardi 2004).

Nejčastějším problémem chronických ran je infekce, která snižuje pravděpodobnost zahojení rány a může se významně podílet i na mortalitě daného pacienta. Výskyt bakterií v ranách tedy představuje riziko kontaminace, kolonizace a následné infekce rány. Zdrojem bakterií kontaminujících ránu jsou jak okolní bakterie kolonizující kůži pacienta, tak i bakterie z okolního prostředí. Definice kolonizace je: „přítomnost množících se bakterií bez zřetelné reakce hostitele“ (Siddiqui & Bernstein 2010). Kolonizaci rány může posílit nebo naopak ztížit ranné hojení v závislosti na bakteriální zátěži. Bakteriální zátěž považující za překážku hojení rány je ta, která přesahuje  $10^5$  mikroorganismů na gram tkáně, ačkoli tato hranice je pouze orientační. Závisí také např. na stavu imunitního systému hostitele, nebo na typu rány.

Chronické rány mají komplexní kolonizační složení, které se v průběhu času mění. Informace o zastoupení organismů způsobujících infekce ran se mezi studii značně liší. Nicméně mezi organismy nejčastěji izolované z těžkých ran se řadí *S. aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kolonizace těmito organismy vyžaduje pečlivou léčbu, protože jejich schopnost získat rezistenci vůči antibiotikům je velmi vysoká (Albaugh 2013). Rány se stávají rizikovým faktorem pro kolonizaci MRSA a další multirezistentní organismy.

Profil chronických žilních onemocnění dolních končetin tzv. vředů, ukázal, že nejčastějšími bakteriemi jsou *S. aureus* (93,5 %), *Enterococcus faecalis* (71,7 %), *P. aeruginosa* (52,2 %). Čím déle zůstává vřed nezhojený, tím více roste pravděpodobnost, že se zde rozvine více aerobních organismů (průměrně 4,3 druhu), ale také významná anaerobní populace (průměrně 2,0 druhu) (Bowler & Davies 1999). Na léčbu chronických infekčních ran se často používají systémová antibiotika. Dle švédské studie, která tuto problematiku zkoumala, nebylo možné učinit jednoznačné závěry, zda antibiotická léčba urychlila proces hojení rány (Tammelin et al. 1998). Bez prokázaného přínosu může nesprávné užívání systémových antibiotik nést s sebou zbytečná rizika. Například zbytečnou zátěž organismu, nebo rozvoj rezistentních kmenů na antibiotické látky. Dle nedávného Cochranova přehledu antibiotik pro léčbu chronického žilního vředu, se ukazuje, že současné vědecké důkazy nepodporují využívání systémových antibiotik k léčbě žilních onemocnění dolních končetin (O'Meara et al. 2008).

Infekce *Staphylococcus* spp. jsou běžné především v rozvojových zemích. Riziko infekce zvyšuje míru hospitalizace pacientů, jelikož infekce získané v nemocničních zařízeních jsou spojeny s vyšší úmrtností, delší dobou hospitalizace a tím i zvýšenými náklady na zdravotní péči (Zervos et al. 2012). Bakterie *Staphylococcus* jsou jedněmi z nejrozšířenějších u zvířat i lidí. Proto také bakterie z tohoto rodu, které jsou rezistentní na meticilin jsou považovány za jednu z největších hrozeb pro zdraví lidí a zvířat (Catry et al. 2010). Meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA), který je označován za nejdůležitější druh stafylokoka vyskytujícího se u lidí. Existují i další druhy, které způsobují závažné infekce (Rogers et al. 2009). Tyto druhy jsou nejčastěji zastoupeny koaguláza-negativními stafylokoky, například *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* a mnoha dalšími (Takeuchi et al. 2005).

*S. haemolyticus* patřící mezi koaguláza-negativní stafylokoky, je druhým nejčastěji izolovaným druhem z lidských hemokultur a má nejvyšší úroveň antimikrobiální rezistence. Tento druh může způsobovat septikémii, peritonitidu a také infekce močových cest (Takuechi et al. 2005). Studie ukazují, že meticilin-rezistentní *S. haemolyticus* je jedním z nejčastěji izolovaných druhů stafylokoků mezi novorozenci na jednotkách intenzivní péče (Periera et al. 2014).

U stafylokokových infekcí je míra poškození tkáně zásadním ukazatelem, jelikož umožňuje šíření bakterií a získávání živin pro jejich expanzi. Tento proces je kromě jiných enzymů a toxinů způsoben proteázami (Travis et al. 1995). Další expanze v hostiteli je nadále usnadňována modifikací bakteriálního povrchu opět za přispění proteáz, které jsou schopny odstranit tkáňově adhezivní molekuly (McAleese et al. 2001). Další účinky jsou zprostředkovávány pomocí kininů od bolesti a edému až po šok a septikémii. Tento jev je velmi významný pro translokaci bakterií z místa infekce do oběhu (Meada & Yamamoto 1996). Rovněž současně probíhající degradace imunoglobulinů působí na mikroorganismy jako obrana proti reakci imunitního systému daného hostitele (Arvidson 2000), čemuž napomáhá i interakce s koagulačními drahami a také fibrinolýzy.

Virulence bakterií kmenu *Staphylococcus* je přímo či nepřímo dána jejich proteázami. Enzymy, které mohou in vitro interagovat s tkání hostitele a jeho obranným mechanismem, případně také mohou způsobovat škodlivé účinky na hostitele a zvyšovat šance bakterií na přežití. Je také známá interakce proteáz a dalších faktorů virulence, což dále stimuluje patogenní aktivitu (Dubin 2002).

Porušení integrity kůže, které je následně vstupní branou infekce, je velmi často spojeno s výskytem popálenin. Narušení kůže pak může mít za následek infekci, ztrátu tekutin, ale také oslabení imunity (Wysocki 2002).

Povrch popálené rány je prostředí, které je velmi bohaté na proteiny, sestávající z nekrotické tkáně, což poskytuje přirozenou niku pro mikrobiální kolonizaci a proliferaci (Erol et al. 2004). Organismy kolonizující popáleniny mohou pocházet přímo z pacientova endogenního či gastrointestinálního biomu, ale mohou být také zavlečeny na povrch kůže prostřednictvím kontaktu s povrchy okolního prostředí, od pracovníků zdravotnictví či ze vzduchu (Weber & McManus 2004). Popálenou ránu začnou jako první kolonizovat gram-pozitivní bakterie (*S. aureus*, koaguláza-negativní *stafylokoky*). *S. aureus* je jeden z nejčastějších patogenů vyskytujících se v popáleninách, jedná se o lidského komenzála, ale také jednu z příčin infekcí od lehkých až po život ohrožujících onemocnění.

### 3.3.1 Prevalence výskytu infekcí

Druhou celosvětově nejvýznamnější příčinou úmrtí jsou infekční nemoci. *S. aureus* je běžný lidský patogen, navíc, jak již bylo zmíněno, lze jej rozdělit dle citlivosti na antibiotika na meticilin-senzitivní (MSSA) a meticilin-rezistentní (MRSA). V důsledku evoluce bakterií

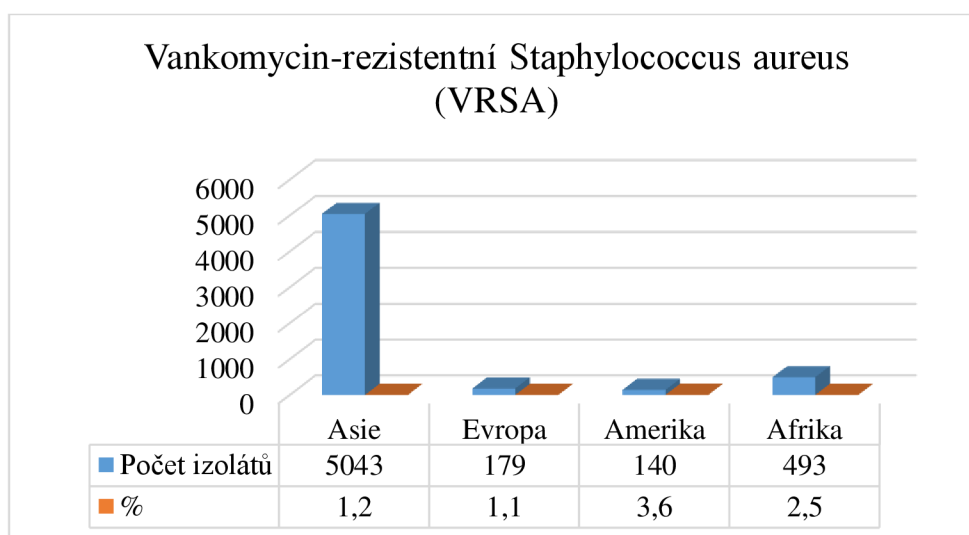
a také již zmíněného zneužívání antibiotik se léková rezistence *S. aureus* postupně zvyšuje. MRSA je odolný vůči mnoha druhům antibiotik.

Prevalence výskytu MRSA se ve světě liší. V Evropě se v roce 2014 procento MRSA pohybovalo od 0,9 % v Nizozemsku, do 56 % v Rumunsku s populačně vyváženým průměrem. V jižních zemích ve srovnání se severními zeměmi je vyšší podíl MRSA. 7 z 29 zemí Evropské unie stále uvádí 25 % nebo více MRSA, přestože dochází ke snižování (European Centre for Disease Prevention and Control 2015). 13 až 74 % celosvětových infekcí *S. aureus* je MRSA, což uvádí přehled 15 studií (Kock et al. 2010).

Prvním objeveným glykopeptidovým antibiotikem, které představuje stále jednu ze základních terapií je vankomycin (Bamigboye et al. 2018). V roce 2002 však byl z USA hlášen první případ rezistentního *S. aureus* vůči vankomycinu (Golrick 2002). In vitro studie naznačují, že rezistence na vankomycin, může být způsobena sníženou permeabilitou a také zvýšenou tloušťkou buněčné stěny, čímž se snižuje dostupnost léku pro patogen. Další typ rezistence je způsoben geny rezistence vůči vankomycinu obsaženými v plazmidu (vanA, vanB, vanD, vanE, vanF a vanG), které mohly být přeneseny z enterokokových druhů (Francia & Clewell 2002).

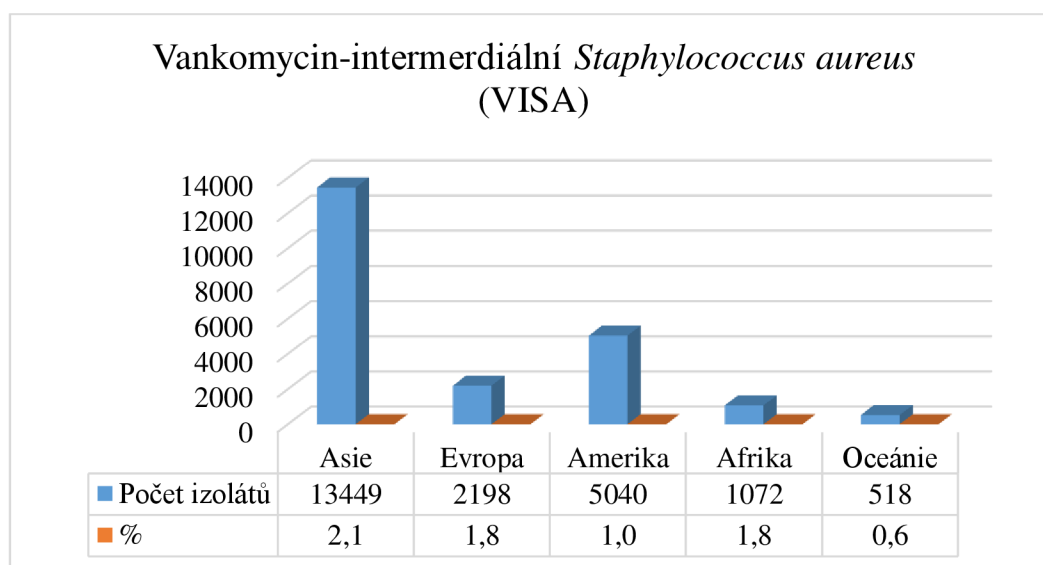
Vankomycin-rezistentní *S. aureus* (VRSA), vankomycin-intermediální *S. aureus* (VISA) a heterogenní VISA (hVISA) jsou skupiny, které odolávají léčbě pomocí antibiotické látky vankomycin. Prevalence VRSA byla 1,2 % (95% IS 0,7-1,8) mezi 5043 izoláty *S. aureus* v Asii, 1,1 % (95% IS 0,0-2,7) mezi 179 izoláty v Evropě, 3,6 % (95% IS 0,5-6,6) mezi 140 izoláty v Americe a 2,5 % (95% IS 0,1-4,8) mezi 493 izoláty v Africe. Z Oceánie nebyl hlášen žádný případ VRSA. Prevalenci zobrazuje Graf 1.

Graf 1 Prevalence výskytu VRSA



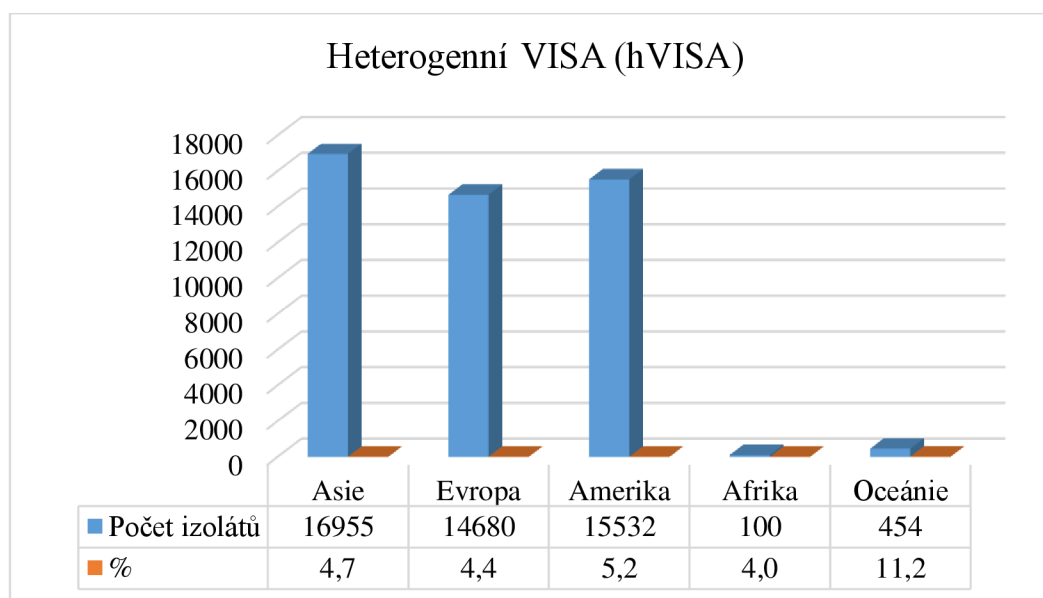
Výsledky tohoto přehledu ukázaly, že prevalence izolátů VISA byla 2,1 % (95% IS 1,6-2,6) mezi 13 449 izoláty *S. aureus*, 1,8 % (95% IS 1,6-2,6) mezi 2198 izoláty, 1,0 % (95 % IS 0,5-1,4) mezi 5040 izoláty, 1,8 % (95 % IS 0,1-3,4) mezi 1072 izolátů a 0,6 % (95% IS 0,0-1,3) mezi 518 izoláty z Asie, Evropy, Ameriky, Afriky a Oceánie (viz Graf 2).

Graf 2 Prevalence výskytu VISA



Kromě toho byla prevalence hVISA v Asii, Evropě, Americe, Africe a Oceánii. Činila 4,7 % (95% IS 3,9-5,4) mezi 16 955 izoláty *S. aureus*, 4,4 % (95% IS 3,2-5,5) mezi 14 680 izoláty, 5,2 % mezi izoláty *S. aureus* (95% IS 4,3-6,1) mezi 15 532 izoláty, 4,0 % (95% IS 0,2-7,8) mezi 100 izoláty a 11,2 % (95% IS 8,3-14,1) mezi 454 izoláty (viz Graf 3) (Shariati et al. 2020).

Graf 3 Prevalence výskytu hVISA



### 3.4 Bakteriální rezistence k antibiotikům

V roce 1928 byl Alexanderem Flemिंगem objeven penicilin a od té doby jsou antibiotika považována za klíčové léčivo pro veřejné zdraví zachraňující životy lidí na celém světě. Antibiotika jsou schopná zabít bakterie, jsou tedy baktericidní. Svět bez antibiotik si nyní lze

jen těžko představit. Do roku 1960 byla identifikována a připravena většina antibiotik, která dnes známe, a to antibiotika na bázi sulfonamidů, aminoglykosidů, cefalosporinů, tetracyklinů, makrolidů a chinolinů. V posledních letech však narůstá schopnost odolnosti bakterií vůči působení většiny těchto běžně předepisovaných antibiotických látek (Kumar & Chordia 2017). Zvyšující se rezistence bakterií vede k tomu, že pacienti umírají na bakteriální infekce, které byly dříve léčitelné. V důsledku toho je potřeba snížit nadužívání antibiotik a také hledat jiné mechanismy léčby patogenity, jako jsou například nové generace antibiotik, či přírodní antibakteriální látky.

V posledních letech se rezistentní infekce staly hrozbou pro zdraví společnosti a také globální zdravotní výzvou (Anes et al. 2015). Pochopení mechanismu bakteriální rezistence, které zahrnují aktivní vylučování antibiotik z buňky (eflux), inaktivaci antibiotik, či tvorbu biofilmu, nám pomohou tuto situaci vyřešit a najít adekvátní terapeutika. Různé výzkumné týmy studují účinky přírodních antimikrobiálních látek na rezistentní bakterie, tyto lze použít buď samostatně, či jako doplňkové terapie.

Mezi nejproblematictější multirezistentní bakteriální druhy patří *P. aeruginosa*, *E. coli*, enterokoky rezistentní na vankomycin a MRSA (Miller et al. 2005). Antibiotická rezistence může být přirozená (primární), ta je následně dělena na vnitřní a indukovanou, či získaná (sekundární). Přirozená rezistence vzniká spontánní genovou mutací, kdežto získaná vzniká prostřednictvím bakteriofágů, plazmidů či transpozonů. Bakteriální rezistence k různým typům antibiotik se může přenášet v rámci stejných nebo i různých druhů bakterií (Biswas et al. 2008).

Molekulární podstatou rezistence je například získání genu rezistence, který je přenosnou genetickou cestou zprostředkovan plazmidy, traspozony a itergrony. Z těchto jmenovaných jsou nejdůležitější plazmidy, které jsou velmi účinným prostředkem pro horizontální přenos genů, jenž se nazývá konjugace (Khameneh et al. 2016). Takto zprostředkovaná rezistence je u bakterií často pozorována, například jako plazmidem zprostředkovaná chinolonová rezistence či plazmidem kódovaná  $\beta$ -laktamáza (Hooper 2001). Dalším příkladem je také rezistence na vankomycinu u enterokoků, jenž jsou rezistentní na více antibiotik, která je přenášena horizontálně mezi enterokokovými populacemi po celém světě. Dalším možným mechanismem je rezistence na antibiotika způsobená enzymem, produkovaných bakterií, který modifikuje antibiotika.

Již zmíněná ochrana bakterií před antibiotiky je dána také schopností jejich aktivního vylučování z buňky, jedná se o tzv. efluxní děj, jenž je zprostředkováván efluxními pumpami, což jsou skupiny transportních proteinů, podílejících se na odčerpávání farmaka či toxických látek zevnitř buňky do vnějšího prostředí, čímž klesá intracelulární koncentrace farmaka a bakteriální buňky dále přežívají (Weber & Piddock 2003). S tímto dějem bývá spojena multirezistentní farmaková rezistence.

Možnost ochrany mikroorganismů před antibiotiky je i pomocí tvorby biofilmu. Biofilm, je společenstvo mikroorganismů, které je vázáno k určitému povrchu a je kryté polysacharidy,

kteře jsou buňkami vylučovány. Tyto polysacharidy jsou schopné chránit mikroorganismus v jejich středu proti antimikrobiálním činidlům (Richards & Melander 2009).

### 3.4.1 Meticilin – rezistentní *Staphylococcus aureus*

Objev penicilinu je přisuzován Alexanderu Flemingovi ve 40. letech 20. století, kdy se stal průkopníkem éry antibiotik pro léčbu infekcí (Bennett & Chung 2001). V této době byla infekční onemocnění způsobovaná bakterií *S. aureus* dobře kontrolována. S rozšířením penicilinu se však v 50. letech se objevil první *S. aureus* rezistentní na penicilin (Pichereau & Rose 2010). *S. aureus* rezistentní na penicilin může produkovat penicilinázu, která má schopnost hydrolyzovat  $\beta$ -laktamový kruh penicilinu, což právě vede k rezistenci vůči penicilinu. Později byl vyvinut polosyntetický penicilin, který je odolný vůči penicilináze s názvem meticilin. Tento meticilin je odolný vůči hydrolyze  $\beta$ -laktamázy (Khoshnood et al. 2019; Rayner & Munckhof 2005). Nedlouho po tomto objevu, ale byla britským vědcem Jevonsem oznámena izolace kmene MRSA, tato rezistence byla vyvolána genem kódujícím protein vázající penicilin 2a nebo 2' (PBP2a nebo PBP2') (*mecA*), který byl integrován do chromozomálního elementu (SCC*mec*) meticilin-senzitivního *S. aureus* (Schulte & Munson 2019). MRSA byl velmi rychle identifikován v mnoha částech světa a stal se tak nejčastěji se vyskytujícím patogenem s rezistencí (Lakhundi & Zhang 2018).

Vnitřní antibiotická rezistence *S. aureus* zahrnuje tři aspekty. Prvním z nich je propustnost vnější membrány. Pokud je snížena permeabilita buněčné membrány, je ovlivněn energetický metabolismus bakterií a tím je způsobena nižší absorpce léčiva (Anuj et al. 2019). Druhým aspektem je tzv. efluxní systém. Tento systém chrání buňky před antibiotiky a biocidy aktivním transportem sloučenin z cytoplazmy anebo perioplazmy a tím snižuje jejich akumulaci v místě působení (Lynch 2006). Posledním aspektem je nadměrná produkce  $\beta$ -laktamázy, což je enzym, který katalyzuje hydrolyzu různých  $\beta$ -laktamových antibiotik. Je kódován bakteriálními chromozomálními geny a je tedy přenosný (Lee & Park 2016).

Získaná, tedy sekundární antibiotická rezistence zahrnuje více aspektů, mezi ty nejdůležitější můžeme zahrnout odolnost *S. aureus* díky získaným mutacím, či odolnost zprostředkovanou biofilmem.

K léčbě bakteriálních infekčních onemocnění jsou využívány antibiotické látky, konkrétně v případě stafylokokových infekcí kůže, či infekcí měkkých tkání jsou využívána antibiotika z řad  $\beta$ -laktamů a tetracyklinů, nicméně je možné využití i dalších antibiotik, jmenovitě například makrolidy, aminoglykosidy nebo fluorochinolony (David & Daum 2017). Nadměrné využívání, spíše zneužívání antibiotik, vede ke vzniku multirezistentních kmenů bakterií, které se vyznačují tím, že jsou odolné vůči třem a více různým antimikrobiálním látkám.

Antibiotická rezistence může být přirozená (primární), ta je následně dělena na vnitřní a indukovanou, či získaná (sekundární). Přirozená rezistence vzniká spontánní genovou mutací, zatímco získaná vzniká prostřednictvím bakteriofágů, plazmidů či transpozonů. Bakteriální



rezistence k různým typům antibiotik se může přenášet v rámci stejných nebo i různých druhů bakterií (Biswas et al. 2008).

MRSA je multirezistentní, což znamená, že je rezistentní nejen vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, ale je také rezistentní vůči antimikrobiálním činidlům, jako jsou aminoglykosidy, chinolony a makrolidy (Vestergaard et al. 2019). Úmrtnost na systémové infekce dosahuje již k 50 % případů, z čehož se stal celosvětový problém v klinické a komunitní protiinfekční léčbě a je velmi obtížné je vyléčit (Vestergaard et al. 2019).

Přestože úmrtnost na infekce MRSA v posledních letech v některých evropských zemích klesla, MRSA stále představuje závažný problém pro veřejné zdraví na celém světě (Guo et al. 2020).

### **3.5 Antibakteriální aktivita přírodních látek**

Rezistentní patogenní organismy a jejich zvýšená četnost výskytu je motivací pro hledání alternativních prostředků pro jejich léčbu. Jednou z možných alternativ je využití přírodních látek, jejichž léčivé účinky jsou známy již od pradávna. Biologicky aktivní látky, zastoupené například sekundárními metabolity v rostlinách, mají široké spektrum účinků, mimo jiné i účinky antimikrobiální. Sekundární metabolity rostlin zahrnují taniny, terpenoidy, alkaloidy, flavonoidy a jiné (Cowan 1999).

### **3.6 *Cannabis sativa* L.**

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je jednoletá dvouděložná bylina patřící do čeledi *Cannabaceae*. Konopí má velmi dlouhou historii v oblasti léčebného využití, je využíváno již 5 000 let pro léčebné, ale i rekreační účely. Pochází ze střední a severovýchodní Asie, následně se však rozšířilo do celého světa (Elsohly & Slade 2005). V současnosti komerční využití konopí zahrnuje textilní, potravinářský či kosmetický průmysl (Leronard et al. 2021). Kromě aplikací v těchto odvětvích je konopí atraktivní také k aplikaci ve stavebnictví. Konopná lýková vlákna byla popsána jako antibakteriální a jsou pro tyto vlastnosti lákavá na využití v chirurgických zařízeních nebo jako funkcionalizované textilie (Andre et al. 2016). Tato jejich vlastnost souvisí s chemickým složením vláken konopného lýka: byly identifikovány volné i esterifikované steroly a triterpeny, mezi nimi  $\beta$ -sitosterol a  $\beta$ -amyrin (Gutiérrez & del Río 2005). Tyto sloučeniny jsou známy pro své antibakteriální vlastnosti (Ibrahim 2012). Jako zemědělská plodina je dobře odolné proti suchu a škůdcům, má dobře vyvinutý kořenový systém a také zabraňuje erozi půdy (Andre et al. 2016).

Psychotropní varianta konopí neboli marihuana je jednou z nejčastěji užívaných nelegálních drog. Její chemické složení zahrnuje kanabinoidy. Jedná se o skupinu sekundárních metabolitů, z nichž několik je odpovědných za psychotropní účinky, kvůli čemuž je tak často vyhledáváno jako droga.

*C. sativa* L. obsahuje přírodní látky, které mají velké množství terapeutických účinků, zahrnujících účinky protizánětlivé, analgetické, nebo také antikarcinogenní či antibakteriální (Andre et al. 2016). Rozlišují se dva typy konopí, prvním z nich je typ drogy *C. sativa* subsp. *Indica*, která může obsahovat až 20 % psychoaktivní sloučeniny D9-tetrahydrokanabinolu (THC), a druhý průmyslový typ *C. sativa* subsp. *sativa* vyznačující se nízkým obsahem THC. Průmyslové konopí se využívá jako zdroj semen, vlákniny, anebo také oleje lisovaného ze semen (Frassinetti et al. 2020).

### 3.6.1 Biologicky aktivní látky konopí

Antimikrobiální účinek konopí je zaznamenán již ve staré medicíně od konce 19. století, první studie se však objevily až v 50. letech 20. století. Od té doby bylo již z rostliny *C. sativa* L. izolováno více než 565 sloučenin, z nichž 120 odpovídá kanabinoidům (ElSohly et al. 2017). Ostatní fytochemikálie konopí zahrnují primární metabolity jako jsou aminokyseliny, mastné kyseliny, steroidy, nebo také sekundární metabolity zastoupené terpenoidy, flavonoidy, stilbenoidy, lignany a alkaloidy (Flores-Sanchez 2008). Mezi další chemické složky, které jsou identifikované v konopí patří uhlovodíky, cukry, dusíkaté sloučeniny, ketony, aldehydy, pigmenty, alkoholy. Proto je těžko rozeznatelné, co z této směsi chemických sloučenin tvoří hlavní složku antimikrobiálních účinků. Z nutričně významných sloučenin obsažených v konopí, je potřeba zmínit také tokoferoly a složení mastných kyselin, kterým se práce bude věnovat dále v kapitole *Cannabis sativa* L. ve výživě člověka.

Konopí má dlouhou historii užívání jako léčivo k léčbě různých onemocnění, včetně astmatu, epilepsie, únavy, glaukomu, nespavosti, nevolnosti, bolesti a také revmatismu (Zuardi 2006).

#### 3.6.1.1 Fenolické sloučeniny

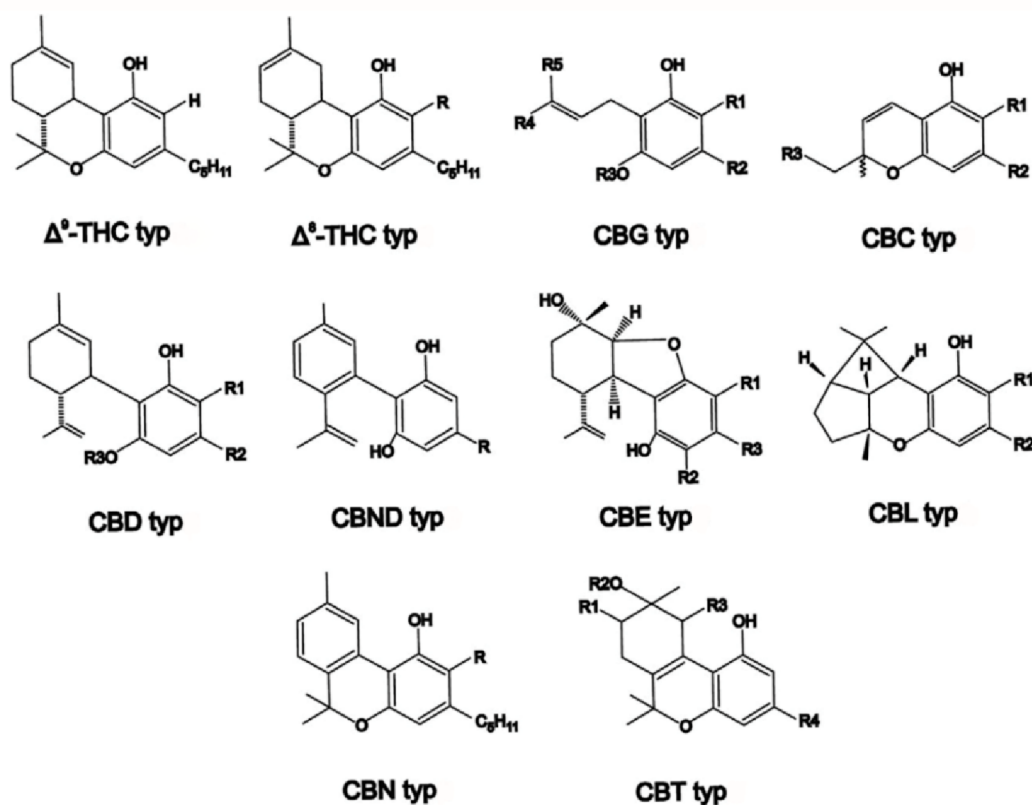
Jedna z nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů v rostlinné říši je tvořena fenolovými sloučeninami, známými též jako flavonoidy, fenylpropanoidy. Flavonoidy jsou pro své účinky, které podporují zdraví lidí i zvířat, velmi uznávané. Mají široké spektrum účinků jako je například aktivace či inhibice enzymů lipoxygenázy a cyklooxygenázy (Schewe et al. 2002), nebo detoxikace karcinogenů (Moon et al. 2006).

Obsahují zástupce různých struktur fenolových kyselin (kyselina benzoová, hydroxyskořicová), flavonoidy jako jsou flavonoly, flavony, stilbeny a lignany (Andre et al. 2010). Flavonoidů identifikovaných v konopí, patřících do podtříd flavonů a flavonolů, je přibližně 20. Patří mezi ně O-glykosidové verze aglykonů apigenin, luteolin, kaempferol a kvercetin, také cannflavin A, a cannflavin B, což jsou methylované isoprenoidní flavony, které jsou pro konopí jedinečné (Ross et al. 2005). Ve svém výzkumu Barrett a kolektiv (1985) uvádějí, že cannflavin A a B jsou schopny inhibovat produkci prostaglandinu E2 revmatoidních synoviálních buněk, což je pravděpodobně způsobeno právě schopností inhibice cyklooxygenázy a lipoxygenázy. Flavonoidy jsou také známe pro své silné antioxidační látky.

### 3.6.1.2 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou terpenofenolické sloučeniny, které jsou pro konopí specifické. Hromadí se v sekreční dutině žlázových trichomů, které se z velké části vyskytují v samičích květech a také v nadzemních částech rostlin. V jiných částech včetně semen, kořenů a pylu bylo detekováno malé množství kanabinoidů (Andre et al. 2016). Obsahy těchto látek závisí na chemotypu „drug type“ či „fibre type“. Koncentrace těchto látek závisí jak na již zmíněném chemotypu, tak na věku, odrůdě, podmínkách růstu (úroveň světla, vlhkost, výživa), době sklizně a podmínkách skladování (Khan et al. 2014).

Kanabinoidy lze rozdělit do 10 hlavních strukturálních typů, které zobrazuje Obrázek 2.  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC),  $\Delta^8$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^8$ -THC), kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), kanabinodiol (CBND), kanabielsoin (CBE), kanabicyklol (CBL), kanabinol (CBN), kanabitriol (CBT) a různé další typy (ElSohly et al. 2017). CBN a CBC jsou nejhorněji zastoupené fyto-kanabinoidy v konopí.



Obrázek 2 Základní strukturální typy kanabinoidů (Schofs et al. 2021)

U druhu *C. sativa* L. je na základě obsahu kanabinoidů rozlišováno pět chemotypů. Rozdělení je v rámci různých koncentrací hlavních kanabinoidů ( $\Delta^9$ -THC, CBD, CBG). 1. chemotyp rostliny „drug type“ (narkotika) mají vysoký obsah psychotropního  $\Delta^9$ -THC, 2. chemotyp léčebné konopí s obsahem  $\Delta^9$ -THC ku CBD je 1:1, 3. chemotyp „fibre type“, kde je převládající složka CBD, 4. chemotyp „fibre type“ obsahuje jako hlavní kanabinoid CBG, 5. chemotyp „fibre type“ neobsahuje téměř žádné kanabinoidy (Aizpurua-Olaizola et al. 2016).

Rostliny „fibre type“ obsahují především CBG, CBD, a kyselinu kanabidiolovou (CBDA) a kyselinu kanabigerolovou (CBGA).

Kanabinoidy jsou u lidí vázány na kanabinoidní receptory CB1 a CB2, díky čemuž jsou distribuovány po celém těle, včetně imunitních buněk. Hlavní intoxikační a také nejvíce studovaný kanabinoid je  $\Delta^9$ -THC, který je částečně agonistický vůči receptoru CB1. Další složkou, která je důležitá, ale již není omamná je CBD. Většina kanabinoidů je v lidském těle metabolizována cytochromem P450 (Karas et al. 2020).

První studie kvantifikace antimikrobiální aktivity kanabinoidů *C. sativa* ( $\Delta^9$ -THC a CBD) zjistila bakteriostatickou a bakterocidní aktivitu v rozmezí 1–5  $\mu\text{g/ml}$  pro *S. aureus* a *Streptococcus* spp., ale nezjistili žádnou vykazující aktivitu proti gram-negativním bakteriím (VanKlingeren & Ten Ham 1976).

Mezi nejznámější zástupce kanabinoidů lze zařadit především THC zneužívané jako droga, které je známé především díky svým psychotropním účinkům. Dalšími významnými zástupci jsou CBD, nejvíce využívané pro své léčivé účinky jako farmakum. Dále pak například CBN a CBG a CBC.

### **THC**

$\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol, zkráceně  $\Delta^9$ -THC. Jedná se o hlavní psychoaktivní složku *C. sativa*. Expozice THC je běžně spojována s psychoaktivními účinky konopí, hypolokomocí, hypotermií či analgezií. Mimo tyto účinky má ale také účinky neuroprotektivní, nebo protizánětlivé (Alves et al. 2020).

### **CBD**

Kanabidiol (CBD) je hlavní část „vědeckého“ konopí., kterému je věnována velká pozornost. Na rozdíl od THC nevykazuje psychotropní účinky. Je vědecky prokázáno, že CBD je silný antioxidant, který se spolu s endokanabinoidním systémem v těle podílí na prevenci volných radikálů (Atalay et al. 2020). U této látky, byla prokázána schopnost zmírnit křeče, podráždění, napětí, kašel, nevolnost a také schopnost inhibice růstu většiny rakovinových buněk (Rajput & Kumar 2018).

### **CBN**

Další biologicky účinnou látkou obsaženou v konopí je kanabinol (CBN), tato složka je pozorována u *C. sativa* a *C. indica*. Jedná se o produkt metabolismu rozkladu THC.

### **CBG**

CBG, jako další ze zástupců kanabinoidů, má velký potenciál využití, hned po CBD. Vyskytuje se v konopí v mnohem menší míře než výše zmíněné CBD, avšak vykazuje velmi rozmanité způsoby biologických aktivit. Jeho účinky jsou protizánětlivé, antifungální či účinky neuromodulační. Je také schopný zabráňovat proliferaci buněk (Cabrera et al. 2021). Vzniká během neenzymatické dekarboxylace kyseliny kanabigerolové.

## CBC

CBC byl poprvé izolován v roce 1966. Přímým prekurzorem CBC je CBG, kdy CBC převládá v juvenilní fázi a poté v době zralosti klesá. Obsah CBC je závislý na odrůdě. Vysoký podíl v juvenilní fázi je jak u chemotypů s převahou CBD, tak i u chemotypů s převahou THC. CBC prokazuje protizánětlivé účinky a také vlastnosti antifungální, antibakteriální a antiproliferační účinky v nádorových buňkách (Zagožen et al. 2021).

### 3.6.1.3 Terpeny

V rostlině konopí, je obsaženo přes 200 terpenů. Terpeny jsou poměrně těžké sloučeniny s izoprenovou strukturou, zatímco terpenoidy jsou organické chemikálie sice podobné terpenům, ale obsahují ve svém složení jako další prvek kyslík (Chandra et al. 2017). Terpeny jsou dále děleny do pěti tříd na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny a další sloučeniny terpenoidního původu.

Terpeny jsou primární aktivní složkou éterických olejů, jsou zodpovědné za vůni a chuť různých variant konopí, a jejich farmakologická aktivita je uplatňována prostřednictvím interakce s buněčnými strukturami (buněčné membrány, iontové kanály, enzymy) (Russo & Taming 2011). Distribuce a obsah terpenů v rostlině se liší na základě parametrů zahrnujících proces získávání silice nebo zralost rostliny (Brenneisen 2007).

Mezi hlavní konopné éterické oleje patří myrcen, alfa-pinen,  $\beta$ -pinen, limonen a  $\alpha$ -humulen (Novak et al. 2001). Důležitá je i nízká koncentrace kanabionidů obsažená v získaných éterických olejích, jelikož působí synergicky. Dle studie všechny testované éterické oleje vykazovaly dobrý antimikrobiální účinek především proti gram-pozitivním patogenům zastoupenými rody *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Nejúčinněji působil extrahovaný alfa-pinen z *C. sativa* L., který měl dobré výsledky proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím (Nissen et al. 2010).

Jedná se o lipofilní sloučeniny, které snadno prochází membránami, a to především hematoencefalitickou bariérou (Fukumoto et al. 2006). D-limonen vykazuje protirakovinné a imunostimulační vlastnosti u lidí.  $\beta$ -myrcen, terpen běžně se vyskytující u chmelu (*Humulus lupulus*), je znám pro své silné protizánětlivé a analgetické vlastnosti (Andre et al. 2016).

### 3.6.2 Konopné extrakty

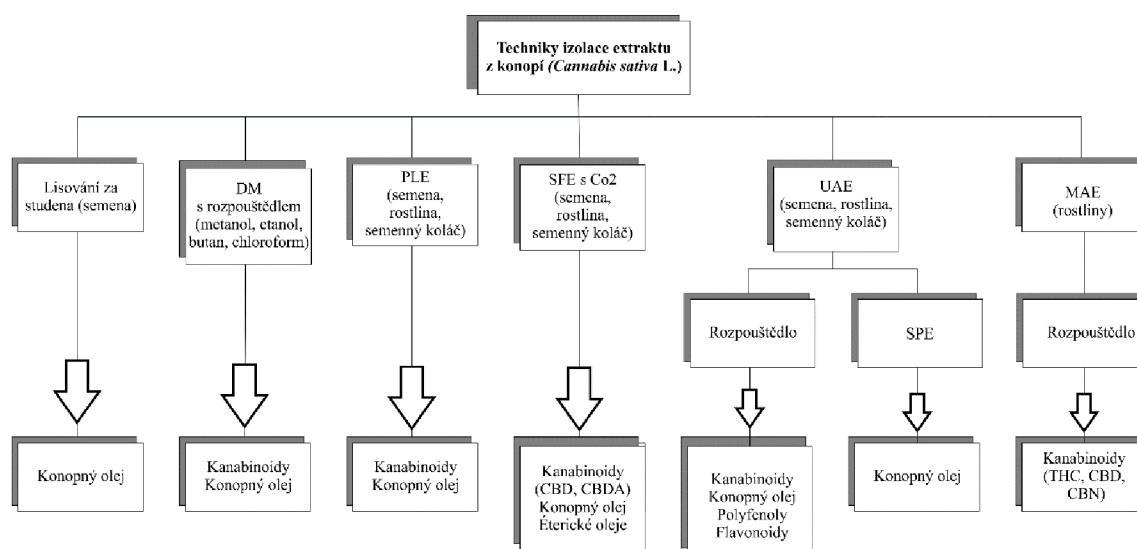
Oblastí značného zájmu jsou izolace bioaktivních sloučenin z konopí a jejich přeměna na produkty, které mohou být využitelné v různých druzích aplikací od výživových doplňků po antimikrobiální látky. Pokud má být dosaženo pozitivního terapeutického výsledku, je potřeba, aby množství léčiva bylo dodáváno v optimální koncentraci, která bude nad prahovou hodnotou účinnosti, zároveň však pod prahovou hodnotou toxicity. Terapeutický úspěch nezávisí pouze na dané koncentraci, důležitou roli hraje také imunomodulační aktivita molekul (Schofs et al. 2021).

Kanabinoidy mohou být izolovány z různých částí rostlin, včetně listů, květů, stonků, kořenů a semen. Dle toho, z jaké části jsou látky izolovány, se liší jejich zastoupení v extraktu. Nejvíce THC je akumulováno v listech rostliny, ostatní nepсихоaktivní kanabinoidy především v oleji semen. Semena jsou mimo jiné vysoce ceněna pro své nutriční hodnoty. Obsahují 19–38 % olejů, 20–38 % bílkovin, 27–36 % vlákniny a 4–6 % minerálních látek. Další nutričně významné látky jsou zde zastoupeny tokoferoly, karotenoidy a některými fenolickými sloučeninami (Kriese et al. 2004).

### 3.6.2.1 Metody extrakce

Důležitý pro terapeutické využití je extrakt, jehož vlastnosti a účinnost jsou závislé na metodě jeho získávání. Metody používané pro izolaci extraktů *C. sativa* jsou různé. Tradiční techniky zahrnují lisování za studena a extrakci rozpouštědlem, nyní se však objevují modernější, často účinnější metody. Například v současnosti využívaná metoda extrakce tlakovou kapalinou (SFE) nepotřebuje dále filtraci, méně rozpouštědla a kratší dobu zpracování. Metody využívající ultrazvukové extrakce (UAE), mají vyšší výtěžky (Fathordoobady et al. 2019). Další metody jsou metody mikrovlnné extrakce (MAE), extrakce pod tlakem (PLE) a superkritické extrakce. Každá z těchto metod vyžaduje plánování a přípravu zahrnující volbu vhodných podmínek, jako je typ rozpouštědla, tlak, teplota a doba extrakce (Brusottia et al. 2014). Metody extrakce používané pro různé části konopí a látky používané k extrakci zobrazuje Obrázek 3.

Biologicky aktivní kanabinoidy jsou extrémně nestabilní sloučeniny, které snadno podléhají degradaci za běžně využívaných podmínek zpracování a skladování (Fathordoobady et al. 2019).



Obrázek 3 Metody extrakce látek z *Cannabis sativa* L.: DM: dynamická macerace, PLE: extrakce kapalinou pod tlakem, SFE: superkritická fluidní extrakce, UAE: ultrazvuková

extrakce, MAE: mikrovlnná extrakce, THC: tetrahydrokanabinol, CBN: kanabinol, CBD: kanabidiol (Fathordoobady et al. 2019)

#### EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM

Využívá se Soxhletův extraktor, destilační metoda, nebo metoda dynamické macerace. Dynamická macerace zahrnuje jednoduché rozpouštění složek v organických rozpouštědlech. Nejčastěji používanými pro extrakci kanabinoidů jsou: methanol, ethanol, butan, chloroform. Kromě rozpouštědla se zohledňuje i velikost části, teplota a rychlost extrakce (Atabani et al. 2013). Nejčastěji preferované jsou ethanolové extrakty.

#### ULTRAZVUKOVÁ EXTRAKCE

Jedná se o metodu využívající ultrazvukových vln k urychlení extrakce tím, že se rozbíjí buněčné stěny, zvýší přenos rozpouštědla, čímž dojde ke zvýšení výtěžnosti a rychlosti extrakce (Fathordoobady et al. 2019).

#### MIKROVLNNÁ EXTRAKCE

Další možnou využitelnou metodou extrakce biologicky aktivních látek z *C. sativa* je metoda mikrovlnné extrakce. Tato metoda je považována za ekologickou z toho důvodu, že snižuje používání organických rozpouštědel. Další její velká výhoda je vysoká výtěžnost, ve srovnání s referenčními extrakčními metodami poskytuje tato metoda s nejmenším množstvím rozpouštědla a v nejkratším možném času nejvyšší množství celkových kanabinoidů získaných ze vzorku (Brighentia et al. 2017).

#### EXTRAKCE POD TLAKEM

Tato metoda extrakce pod tlakem je díky snadné aplikaci a účinnosti hodnocena pozitivně. Navíc výsledky ukazují, že účinnost této extrakce je až 99,3 %, což je zjištěno díky dosažení výtažku extrakce 19,8 mg kanabidiolu na 1 gram suchého konopí. Tato metoda se provádí za nízkého tlaku, teploty 100 °C a během 60 minut (Serna-Loaiza et al. 2020).

#### SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE

Superkritická fluidní extrakce je spolu s technologií mikrovlnné extrakce řazena mezi neekologičtější s ohledem na použitá rozpouštědla. Tato technologie se používá pro extrakci esenciálních olejů a biologicky aktivních látek. Hlavním použitým rozpouštědlem je v tomto případě oxid uhličitý, levné a bezpečné rozpouštědlo (Karğılı & Aytac 2021).

### 3.6.3 *Cannabis sativa* L. ve výživě člověka

V posledních letech vzrůstá zájem o semeno rostliny konopí i z nutričního hlediska. Dříve byla semena považována spíše za odpadní produkt, využitelný zejména jako krmivo pro zvířata. S ohledem na rostoucí uznání jeho zdravotních přínosů, se produkce semen zvýšila a má na trhu velký potenciál. Technicky se jedná spíše o plod, nažku, stejně jako u obilnin (Naraine et al. 2020).

Ve výživě se používá konopí technické (průmyslové). Primární rozdíl mezi konopím léčebným a technickým je v hodnotě obsaženého THC. Rozdíl v množství vytvořené psychotropní látky ovlivňuje jak genetika, tak i vliv prostředí. V lékařském konopí je THC zastoupeno z více než 10 %, zatímco vzorky technického konopí obsahují maximálně 0,3 % této látky (Russo 2007). V České republice je konopí regulováno zákonem o návykových látkách (167/1998 Sb.) a vyhláškou o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití (236/2015 Sb.). Dle tohoto zákona se může obsah účinných látek v léčebném konopí pohybovat od 0,3 % do 21 % u THC a od 0,1 % do 19 % u CBD (SÚKL).

Nyní je semínko technického konopí prohlašováno za jeden z nutričně nejúplnějších potravinových zdrojů. Může být konzumováno přímo (semena celá, loupaná) nebo jako zpracovaný produkt, kdy se jedná například o oleje, mouky či proteinové přípravky. Nutriční složení konopných semen je značně variabilní v závislosti na genotypu rostliny a vnějších podmínkách pěstování. Dá se však říci, že typicky obsahuje 25–35 % lipidů s dokonale vyváženým složením mastných kyselin, 20–25 % bílkovin bohatých na esenciální aminokyseliny, 20–30 % sacharidů, tvořených především nerozpustnou vlákninou a dále pak vitamíny a minerální látky (Farinon et al. 2020). Semeno je také bohaté na přírodní antioxidanty a další biologicky aktivní látky.

Konopí patří do skupiny olejnin, je tedy zřejmé, že semena obsahují velké množství oleje. Lisováním je možné ze semen získat 23–28 % oleje, extrakcí poté 30–32 %. Konopný olej se vyznačuje vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které se dělí na n-3 a n-6 mastné kyseliny (MK), a nízkým množstvím nasycených mastných kyselin (SFA). Mezi esenciální MK jsou řazeny kyseliny náležící do skupin n-3 (kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová, kyselina  $\alpha$ -linolenová), a n-6 (kyselina linolová, kyselina arachidonová), tedy kyseliny s dvojnou vazbou na pozici 3 a 6 (tzv. n-3 a n-6 PUFA) (Cholewski et al. 2018).

Linolenovou (n-3) a linolovou (n-6) kyselinu neumí lidské tělo syntetizovat, proto jsou považovány za esenciální MK. Je nutné je tedy získávat z potravin. Optimální příjem n-6 a n-3 MK vhodný pro lidské zdraví se běžně pohybuje v poměru mezi 2:1 a 3:1. Z tohoto hlediska je vlastně konopný olej ideální ve svém složení PUFA pro lidskou stravu (Callaway 2004). Konopný olej obsahuje okolo 55 % hm. kyseliny linolové a cca. 20 % hm. kyseliny  $\alpha$ -linolenové.

A-linolenová kyselina je známá pro své prospěšné účinky na lidské zdraví. Má protizánětlivé účinky, dále také vykazuje účinek proti hypertenzi či snižuje hladinu cholesterolu v krvi (Erasmus 1999). N-3 a n-6 MK jsou nezbytné pro mnoho fyziologických procesů zahrnujících udržování struktury membrán a syntézu prostaglandinů (Crescente et al. 2018). Klinické studie také ukazují, že PUFA a esenciální MK mají schopnost hojit rány a také zvyšovat imunitu (Harbige et al. 2000).



Zjištěné složení konopných bílkovin ukazuje, že v semenu jsou obsaženy všechny esenciální aminokyseliny, které člověk potřebuje. Nejhojněji je zastoupena glutamová kyselina, následována argininem. Obsah esenciálních bílkovin obsažených v semenu rostliny *C. sativa* zobrazuje

*Tabulka 1* (Oseyko et al. 2019).

*Tabulka 1 Obsah esenciálních aminokyselin obsažených v semenu rostliny C. sativa (Oseyko et al. 2019)*

| Valin | Leucin | Izoleucin | Fenylalanin | Tryptofan | Lyzin | Methionin | Threonin |
|-------|--------|-----------|-------------|-----------|-------|-----------|----------|
| 0,68  | 1,53   | 0,62      | 1,02        | 0,2       | 1,28  | 0,50      | 0,85     |

Dietní vláknina je definována jako část rostlinného materiálu ve stravě, která je odolná vůči enzymatickému štěpení během trávení. Zahrnuje celulózu a necelulóзовé polysacharidy jako je pektin, gumy, sliz, dále pak nesacharidovou složku lignin (Dhingra et al. 2011). Jak již bylo řečeno výše, obsah sacharidů v konopném semínku se pohybuje v rozmezí 20–30 %. Mattila a kolektiv (2018) zjistili, že vláknina konopného semene činila  $33,8 \pm 1,9$  g/100 g semen, což představuje 98 % celkových sacharidů. To znamená, že většina sacharidů obsažených v konopném semeni obsahuje vlákninu, zbylý podíl tvoří škrob, jedná se tedy o velmi dobrý zdroj potravinářské vlákniny.

Kromě již zmíněných látek konopný olej obsahuje také tokoferoly, které mohou snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a věkem podmíněné molekulární degenerace (Leger 2000). Konkrétně se jedná o  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol a  $\delta$ -tokoferol. Tyto analogy vitamínu E, který je známý jako lipofilní vitamín (rozpuštěný v tucích) a také jako přírodní antioxidant, se schopností chránit buňky před oxidačním stresem a účinky volných radikálů, a tak zpomalovat stárnutí buněk (Kriese et al. 2004). V největším množství je přítomný  $\gamma$ -tokoferol, v průměrné koncentraci 28,23 mg/100 g konopného oleje (Chen et al. 2010).  $\gamma$ -tokoferol vykazuje oproti  $\alpha$ -tokoferolu biologickou aktivitu, která je potenciálně schopná chránit organismus před chronickými onemocněními, například před záněty (Saldeen & Saldeen 2005).

Konopná semínka mimo nutričně významné látky, obsahují také látky antinutriční. Jedná se o biologické sloučeniny, které snižují biologickou dostupnost živin. Obecně se do této skupiny řadí například saponiny, fytová kyselina a alkaloidy. Mezi antinutričními látkami v semenech jsou nejvýznamněji zastoupeny inhibitory trypsinu ovlivňujících využití bílkovin a fytová kyselina, která negativně ovlivňuje dostupnost minerálních látek (Farinon et al. 2020).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Teoretická část

Teoretická část této práce je zpracována jako systematický přehled literatury, který zahrnuje základní informace o mikrobiotě lidské kůže, informace o bakteriích rodu *Staphylococcus*, včetně základních infekcí, které tento rod způsobuje. Práce také pojednává o bakteriální rezistenci k antibiotickým přípravkům, shrnuje základní informace o rostlině *C. sativa* L. a jejích biologicky aktivních látkách. Vyhledávání relevantních zdrojů probíhalo primárně v databázích Google Scholar, Web of Science, SCOPUS, Springer Link apod. K vyhledávání zdrojů byla především využívána tato klíčová slova: konopí, inhibice, bakterie, infekce (v anglickém jazyce: cannabis, inhibition, bacteria, infection).

### 4.2 Praktická část

#### 4.2.1 Materiál použitý v praktické části diplomové práce

##### 4.2.1.1 Bakteriální kmeny a kultivační média

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace byly v experimentu používány extrakty *C. sativa* L. v různé fázi zralosti. Testovány byly dva standardní kmeny bakterie *S. aureus*, konkrétně ATCC 29213 – meticilin-senzitivní kmen a ATCC 43300 – meticilin-rezistentní kmen nakoupen od firmy ATCC (American Type Culture Collection).

Ke kultivaci testovaných kmenů bylo použito tekuté médium Mueller Hinton Broth (MHB) od firmy Oxoid (Velká Británie), jehož složení uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2 Složení média Mueller Hinton Broth (Oxoid, Velká Británie)

| Složení                           | g/l   |
|-----------------------------------|-------|
| Dehydrovaný nálev z hovězího masa | 300,0 |
| Kaseinový hydrolyzát              | 17,5  |
| Škrob                             | 1,5   |

##### 4.2.1.2 Konopné extrakty

Pro testování antibakteriální aktivity byly použity extrakty z rostliny konopí setého (*C. sativa* L.) odrůdy „McLove“ klasifikovaného jako chemotyp 1, v různé fázi zralosti, a tedy s různým poměrem a obsahem biologicky aktivních látek. Toto konopí bylo vypěstováno a vyextrahováno na Katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin (KAVR) ČZU. Pěstování konopí probíhalo pomocí tzv. recirkulačního cyklu, což znamená, že čerstvý živný roztok byl dáván každý týden a po tuto dobu také recirkulován bez přidání dalších živin. Denně probíhala pouze úprava pH na hodnotu 5,9.

## **4.2.2 Metody použití v praktické části diplomové práce**

### **4.2.2.1 Extrakce biologicky aktivních látek z *Cannabis sativa* L.**

Biologicky aktivní látky z rostliny *C. sativa* L. bylo nutné extrahovat. Dodavatelem těchto extraktů byla, jak již bylo zmíněno výše, KAVR ČZU, kde bylo konopí vypěstováno a byla zde provedena i následná extrakce. Usušený rostlinný materiál (především květy, do 4. týdne spolu s listy) byl rozdrcen a vyluhován v alkoholu, konkrétně 96% etanolu. Macerace probíhala za pokojové teploty a stálého míchání při 300 ot./min. po dobu 1 hodiny. Směs byla přefiltrována ve vakuu a rostlinný materiál byl opět smíchán s dalším rozpouštědlem. Tento krok byl 2x opakován a následně byly filtráty smíchány dohromady. Poté byl vzorek ještě jednou zfiltrován přes nylonové injekční filtry (0,22 μm) do lahvíček. Konečný roztok byl do doby testování uskladněn při teplotě -80 °C.

### **4.2.2.2 Biologicky aktivní látky v použitých extraktech**

Obsahy a koncentrace biologicky aktivních látek, v tomto případě kanabinoidů, byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD). Kalibrace přístroje byla provedena externě použitím standardů kyseliny tetrahydrokanabinolové (THCA) 0,3–100 mg/l a ostatní kanabinoidy 0,3–10 mg/l (Sigma-Aldrich, Česká republika). Analýza dat proběhla pomocí OpenLAB CDS, ChemStation Edition, Rev. C.01.5.

Na základě výsledků těchto analýz byly zjištěny biologicky aktivní látky, které v konopných extraktech byly nejvíce dominantní. Konkrétně se jedná o CBD, CBDA, CBC, Δ9-THC, Δ8-THC, CBGA, CBG, THCA, kyselinu kanabidivarinovou (CBDVA), kyselinu tetrahydrokanabivarinovou (THCVA), kyselinu kanabinolovou (CBNA) a kyselinu kanabichromenovou (CBCA).

### **4.2.2.3 Testování antibakteriálních účinků konopných extraktů**

Určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) konopných extraktů *in vitro* bylo provedeno pomocí mikrodiluční metody s živným médiem v 96-jamkové mikrotitrační destičce. V této destičce byla vytvořena sestupná ředící řada zásobního roztoku extraktů konopí s počáteční koncentrací 512 μg/ml. Ředění zobrazuje Obrázek 4.

Inokulum bakterie *S. aureus* se standardizovalo na koncentraci  $1 \times 10^6$  KTJ/ml měřením v nefelometru na základě McFarlandovy zákalové stupnice a naočkováno do všech žlutě označených jamek v mikrotitrační destičce (viz Obrázek 4). Tyto destičky byly dále inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

|          | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (ug/ml) |     |     |     |     |    | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (ug/ml) |     |     |     |     |    |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|
|          | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6  | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12 |
| <b>A</b> | PK  | 512 | 512 | 512 | 512 | NK | PK  | 512 | 512 | 512 | 512 | NK |
| <b>B</b> | PK  | 256 | 256 | 256 | 256 | NK | PK  | 256 | 256 | 256 | 256 | NK |
| <b>C</b> | PK  | 128 | 128 | 128 | 128 | NK | PK  | 128 | 128 | 128 | 128 | NK |
| <b>D</b> | PK  | 64  | 64  | 64  | 64  | NK | PK  | 64  | 64  | 64  | 64  | NK |
| <b>E</b> | PK  | 32  | 32  | 32  | 32  | NK | PK  | 32  | 32  | 32  | 32  | NK |
| <b>F</b> | PK  | 16  | 16  | 16  | 16  | NK | PK  | 16  | 16  | 16  | 16  | NK |
| <b>G</b> | PK  | 8   | 8   | 8   | 8   | NK | PK  | 8   | 8   | 8   | 8   | NK |
| <b>H</b> | PK  | 4   | 4   | 4   | 4   | NK | PK  | 4   | 4   | 4   | 4   | NK |

Obrázek 4 Design mikrotitrační destičky

PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola

#### 4.2.2.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Vyhodnocení nárůstu testovaných bakterií *S. aureus*, se provádělo měřením zákalu v jednotlivých jamkách mikrotitračních destiček prostřednictvím přístroje Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm. Hodnocení MIC jednotlivých extraktů bylo bráno jako nejnižší koncentrace omezující růst testovaných druhů bakterií v jamkách destiček, které způsobily o  $\geq 80\%$  úbytek růstu těchto bakterií oproti pozitivní kontrole. Všechna měření se prováděla ve třech experimentech na sobě zcela nezávislých, tzv. triplikátech. Výslednou MIC byl modus získaných hodnot daných extraktů.

## 5 Výsledky

Provedením výše popsaného experimentu mikrodiluční metody v tekutém médiu byly získány údaje o MIC konopných extraktů vůči dvěma standardním kmenům bakterie *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 43300).

### 5.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie s diodovým polem

Složení extraktů bylo identifikováno porovnáním retenčních časů analyzovaných kanabinoidů se standardy.

Nejvyšší koncentrace z obsažených kanabinoidů dosahoval THCA, u kterého se koncentrace pomalu navyšovala až do 4. týdne. Od 5. týdne začala koncentrace narůstat rychleji, jelikož se do analýzy začaly zahrnovat i květy rostliny, ve kterých je tento kanabinoid hojně zastoupen. Nejvyšší koncentrace THCA bylo dosaženo v 8. týdnu – 15,724 %. Naopak u CBLA, CBL a THCV byly v každém týdnu naměřeny nulové hodnoty. Nejvyšších hodnot zastoupení v součtu všech kanabinoidů bylo dosaženo 8. týden, nejvyšší zaznamenaný skokový nárůst proběhl mezi 4. a 5. týdnem. Zastoupení kanabinoidů v různém týdnu experimentu zobrazuje Tabulka 3. Grafy obsahu jednotlivých kanabinoidů ve vzorcích konopných extraktů v průběhu 1–13. týdne zobrazuje Příloha I. Obsah všech kanabinoidů ve vzorcích viz Příloha II.

Tabulka 3 Zastoupení kanabinoidů v různém týdnu experimentu

|            | <b>CBDVA</b> | <b>CBDV</b> | <b>CBDA</b> | <b>CBGA</b> | <b>CBG</b> | <b>CBD</b> | <b>THCV</b> | <b>THCVA</b> | <b>CBNA</b> | <b>CBN</b> | <b>9-THC</b> | <b>8-THC</b> | <b>THCA</b> | <b>CBL</b> | <b>CBCA</b> | <b>CBC</b> | <b>CBLA</b> | <b>Součet kanabinoidů</b> |
|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|--------------|-------------|------------|--------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|---------------------------|
| <b>A1</b>  | 0,003        | 0,000       | 0,016       | 0,054       | 0,043      | 0,000      | 0,000       | 0,013        | 0,002       | 0,000      | 0,077        | 0,035        | 2,858       | 0,000      | 0,744       | 0,002      | 0,000       | <b>3,847</b>              |
| <b>A2</b>  | 0,002        | 0,000       | 0,012       | 0,084       | 0,025      | 0,000      | 0,000       | 0,013        | 0,002       | 0,000      | 0,075        | 0,000        | 2,262       | 0,000      | 0,448       | 0,005      | 0,000       | <b>2,928</b>              |
| <b>A3</b>  | 0,005        | 0,000       | 0,014       | 0,087       | 0,065      | 0,000      | 0,000       | 0,012        | 0,007       | 0,000      | 0,099        | 0,010        | 2,316       | 0,000      | 0,443       | 0,008      | 0,000       | <b>3,066</b>              |
| <b>A4</b>  | 0,005        | 0,000       | 0,014       | 0,112       | 0,036      | 0,007      | 0,000       | 0,012        | 0,006       | 0,000      | 0,177        | 0,011        | 2,317       | 0,000      | 0,622       | 0,022      | 0,000       | <b>3,341</b>              |
| <b>A5</b>  | 0,008        | 0,000       | 0,036       | 0,591       | 0,208      | 0,000      | 0,000       | 0,044        | 0,014       | 0,000      | 0,158        | 0,000        | 7,933       | 0,000      | 0,889       | 0,000      | 0,023       | <b>9,904</b>              |
| <b>A6</b>  | 0,023        | 0,000       | 0,069       | 0,396       | 0,529      | 0,081      | 0,000       | 0,042        | 0,018       | 0,000      | 0,059        | 0,000        | 9,412       | 0,000      | 0,368       | 0,000      | 0,000       | <b>10,997</b>             |
| <b>A7</b>  | 0,008        | 0,073       | 0,086       | 0,505       | 0,247      | 0,008      | 0,000       | 0,053        | 0,026       | 0,000      | 0,078        | 0,072        | 12,369      | 0,000      | 0,317       | 0,000      | 0,000       | <b>13,842</b>             |
| <b>A8</b>  | 0,008        | 0,098       | 0,138       | 0,474       | 0,272      | 0,036      | 0,000       | 0,055        | 0,033       | 0,000      | 0,121        | 0,099        | 14,002      | 0,000      | 0,301       | 0,000      | 0,054       | <b>15,691</b>             |
| <b>A9</b>  | 0,022        | 0,000       | 0,135       | 0,334       | 0,408      | 0,000      | 0,000       | 0,054        | 0,043       | 0,000      | 0,109        | 0,084        | 14,021      | 0,000      | 0,253       | 0,000      | 0,034       | <b>15,497</b>             |
| <b>A10</b> | 0,046        | 0,084       | 0,177       | 0,283       | 0,810      | 0,041      | 0,000       | 0,060        | 0,063       | 0,002      | 0,169        | 0,194        | 15,704      | 0,000      | 0,239       | 0,000      | 0,067       | <b>17,939</b>             |
| <b>A11</b> | 0,012        | 0,000       | 0,052       | 0,418       | 0,000      | 0,000      | 0,000       | 0,066        | 0,051       | 0,000      | 0,382        | 0,039        | 18,163      | 0,000      | 0,332       | 0,000      | 0,000       | <b>19,515</b>             |
| <b>A12</b> | 0,008        | 0,000       | 0,196       | 0,342       | 0,201      | 0,027      | 0,000       | 0,058        | 0,054       | 0,006      | 0,309        | 0,112        | 16,045      | 0,000      | 0,317       | 0,000      | 0,071       | <b>17,746</b>             |
| <b>A13</b> | 0,015        | 0,000       | 0,134       | 0,353       | 0,207      | 0,012      | 0,000       | 0,056        | 0,050       | 0,002      | 0,211        | 0,089        | 15,403      | 0,000      | 0,289       | 0,000      | 0,000       | <b>16,821</b>             |

A1-A13: týdny sklizně

## 5.2 Minimální inhibiční koncentrace konopných extraktů

Z hodnot zákalu naměřených v jednotlivých jamkách mikrotitračních destiček byly, po inkubaci při 37 °C a 24 hodinách, vzaty hodnoty modus MIC použitých konopných extraktů vůči *S. aureus* ATCC 29213 a ATCC 43400. Příklad toho, jak vypadají výstupová data přístroje Tecan zobrazuje Obrázek 5.

|          | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 (µg/ml) |       |       |       |       |       | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (µg/ml) |       |       |       |       |       |
|----------|---|-------|-------|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
|          | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7   | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| <b>A</b> | 0,191   | 0,264 | 0,271 | 0,268 | 0,269 | 0,178 | 0,186   | 0,267 | 0,264 | 0,271 | 0,268 | 0,176 |
| <b>B</b> | 0,186   | 0,211 | 0,213 | 0,212 | 0,220 | 0,166 | 0,179   | 0,211 | 0,213 | 0,213 | 0,208 | 0,163 |
| <b>C</b> | 0,186   | 0,200 | 0,200 | 0,200 | 0,206 | 0,184 | 0,189   | 0,199 | 0,199 | 0,198 | 0,200 | 0,175 |
| <b>D</b> | 0,184   | 0,187 | 0,189 | 0,193 | 0,193 | 0,190 | 0,196   | 0,190 | 0,189 | 0,193 | 0,190 | 0,174 |
| <b>E</b> | 0,184   | 0,188 | 0,194 | 0,188 | 0,190 | 0,172 | 0,182   | 0,189 | 0,191 | 0,186 | 0,189 | 0,169 |
| <b>F</b> | 0,189   | 0,192 | 0,193 | 0,189 | 0,190 | 0,175 | 0,189   | 0,186 | 0,189 | 0,189 | 0,190 | 0,176 |
| <b>G</b> | 0,185   | 0,189 | 0,191 | 0,189 | 0,187 | 0,177 | 0,188   | 0,193 | 0,186 | 0,189 | 0,187 | 0,189 |
| <b>H</b> | 0,184   | 0,188 | 0,188 | 0,190 | 0,187 | 0,173 | 0,190   | 0,192 | 0,191 | 0,187 | 0,201 | 0,183 |
|          | PK  |       |       |       |       | NK    | PK  |       |       |       |       | NK    |

Obrázek 5 Příklad výstupu dat z přístroje Tecan

MIC provedeného experimentu pro oba použité kmeny *S. aureus* byly zpracovány do dvou souhrnných tabulek (Tabulka 4 a Tabulka 5).

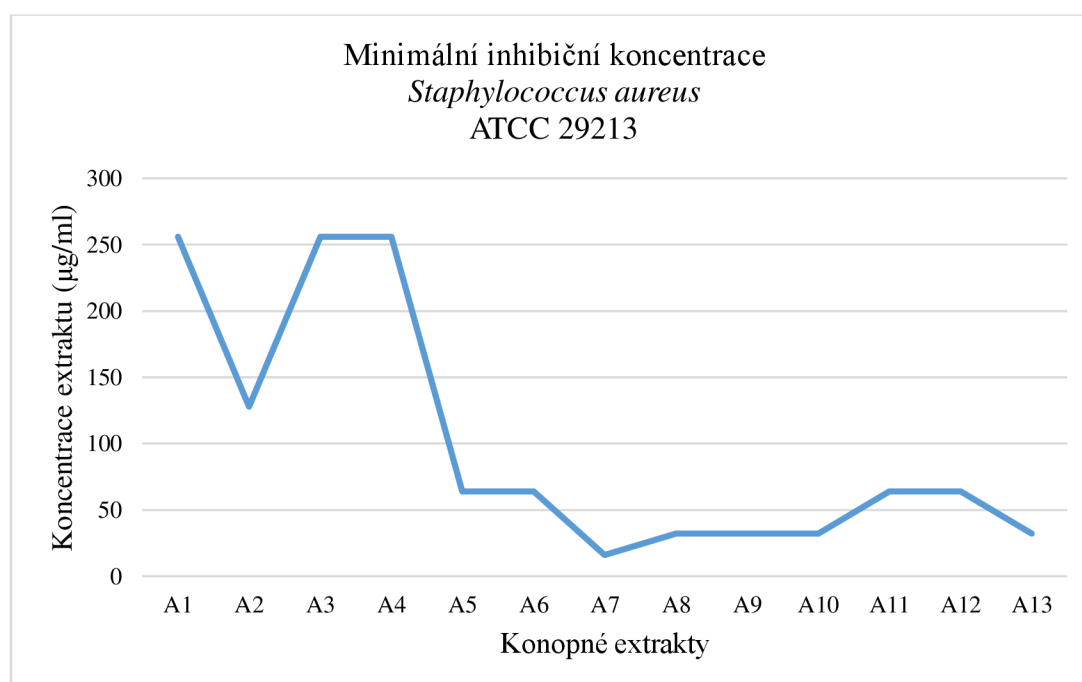
Inhibiční koncentrace konopných extraktů se u vzorků pohybovala od 256 µg/ml do 16 µg/ml. Nejnižší naměřená inhibiční koncentrace konopných extraktů, 16 µg/ml, byla shodná u obou testovaných kmenů ATCC 29213, ATCC 43300. Došlo k ní u extraktu získaného 7. týden. Obecně se dá říci, že během prvních 4 týdnů byla MIC vyšší, během 5. týdne došlo k nárůstu antimikrobiální aktivity konopných extraktů, která se projevila snížením MIC. Mezi 5. až 13. týdnem se střídaly hodnoty MIC 64 µg/ml a 32 µg/ml.

Tabulka 4 MIC *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 |            |            |            |            |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| destička/MIC                            | A1         | A2         | A3         | A4         | A5        | A6        | A7        | A8        | A9        | A10       | A11       | A12       | A13       |
| 1                                       | 256        | 128        | 512        | 256        | 64        | 32        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        |
| 2                                       | 256        | 128        | 256        | 256        | 64        | 32        | 16        | 64        | 32        | 32        | 64        | 64        | 32        |
| 3                                       | 128        | 128        | 256        | 256        | 64        | 32        | 16        | 32        | 64        | 64        | 64        | 32        | 64        |
| 4                                       | 256        | 128        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 64        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        |
| 5                                       | 256        | 128        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 64        | 32        | 32        | 64        | 64        | 64        |
| 6                                       | 256        | 128        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        |
| 7                                       | 128        | 128        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 64        | 32        |
| 8                                       | 128        | 256        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 64        | 32        |
| 9                                       | 128        | 256        | 256        | 256        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        | 32        |
| <b>MODUS</b>                            | <b>256</b> | <b>128</b> | <b>256</b> | <b>256</b> | <b>64</b> | <b>64</b> | <b>16</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>64</b> | <b>64</b> | <b>32</b> |

A1-A13: týdny sklizně

Graf 4 MIC *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 v závislosti na použitém extraktu



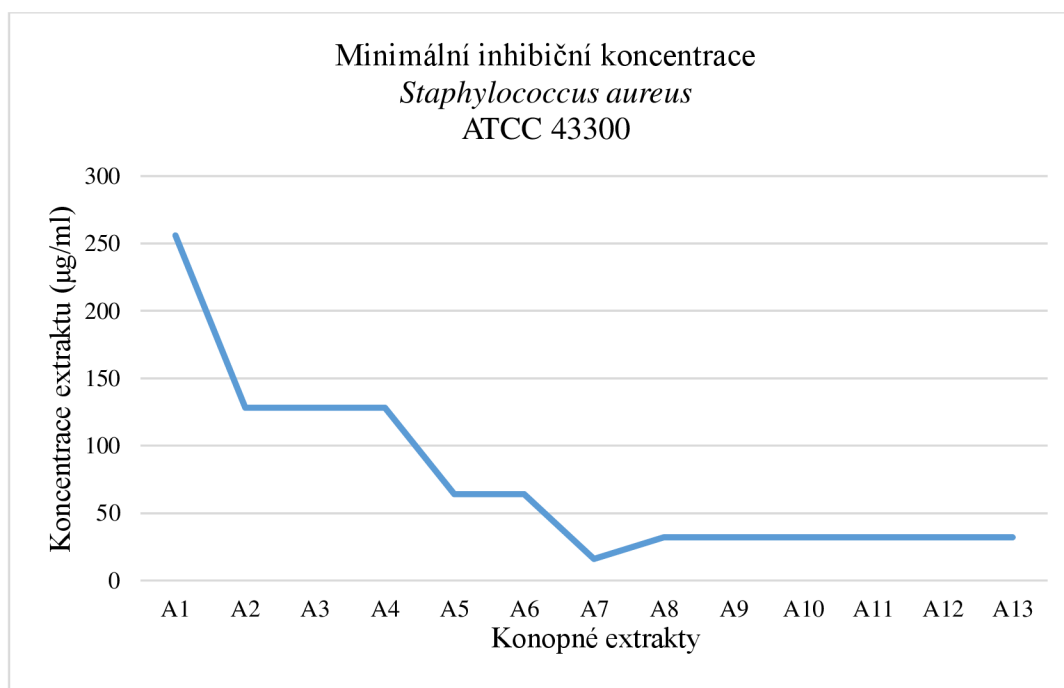


Tabulka 5 MIC *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 |            |            |            |            |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| destička/MIC                            | A1         | A2         | A3         | A4         | A5        | A6        | A7        | A8        | A9        | A10       | A11       | A12       | A13       |
| <b>1</b>                                | 128        | 128        | 512        | 128        | 64        | 32        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        |
| <b>2</b>                                | 256        | 128        | 256        | 128        | 64        | 32        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        |
| <b>3</b>                                | 256        | 128        | 256        | 128        | 64        | 32        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        |
| <b>4</b>                                | 256        | 128        | 128        | 128        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        | 32        |
| <b>5</b>                                | 128        | 128        | 128        | 128        | 128       | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        |
| <b>6</b>                                | 256        | 128        | 128        | 128        | 128       | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        |
| <b>7</b>                                | 256        | 128        | 128        | 128        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        | 32        |
| <b>8</b>                                | 256        | 128        | 128        | 128        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        | 32        |
| <b>9</b>                                | 256        | 256        | 128        | 128        | 64        | 64        | 16        | 32        | 32        | 32        | 64        | 32        | 32        |
| <b>MODUS</b>                            | <b>256</b> | <b>128</b> | <b>128</b> | <b>128</b> | <b>64</b> | <b>64</b> | <b>16</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>32</b> | <b>32</b> |

A1-A13: týdny sklizně

Graf 5 MIC *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 v závislosti na použitém extraktu



## 6 Diskuze

Veřejné obavy z rezistence bakterií vůči antibiotikům stále rostou, dle WHO (2016) se jedná o jednu z největších hrozeb pro lidskou populaci. *S. aureus* spolu s dalšími bakteriemi (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a další) disponuje mimořádnou schopností vyvinout si rezistenci vůči jakémukoli antibiotiku, kterému byl vystaven. Tento fakt je způsoben především schopností horizontálního genového přenosu rezistence tohoto patogenu, například z organismů v půdě (Nesme & Simonet 2015). Proto vzniká stále větší potřeba nacházet alternativní zdroje látek s antimikrobiálními účinky, a to především z rostlin. Kromě například mastných kyselin s antimikrobiální aktivitou anebo také propolisu, mohou být jednou z možností nabízejících se alternativ právě extrakty z rostliny *C. sativa* vyznačující se vysokým obsahem kanabinoidů a terpenů s antimikrobiální aktivitou. Mimo tyto biologicky aktivní látky obsahuje konopí také zástupce monoterpenů, seskviterpenů a flavonoidů, které jsou známé pro své antimikrobiální a imunosupresivní účinky (Flores-Sanchez 2008). Současná antibiotická léčba má již z důvodu nadužívání a evolučního přizpůsobení bakterií omezenou účinnost proti bakteriím s rezistencí a její dlouhodobé užívání může vést spíše k toxickému účinku na organismus. Proto výzkum a rozšířené využití antimikrobiální terapie rostlinného původu může být velkým pokrokem v léčbě bakteriálních onemocnění (Naveed et al. 2014). V případě experimentu, který je obsahem této diplomové práce jsou využívány ethanolové extrakty z konopí, obsahující kanabinoidy různého zastoupení v závislosti na fázích zralosti rostliny, ve kterých byly extrakty získávány.

V databázích a odborné literatuře existuje celá řada studií týkajících se antimikrobiální aktivity jednotlivých kanabinoidů vůči bakteriím, ať již rezistentních či senzitivních na antibiotickou léčbu. V odborné literatuře se nachází velké množství studií zabývajících se antimikrobiální aktivitou jednotlivých kanabinoidů (především THC, CBD a CBG), či antimikrobiální aktivitou konopných esenciálních olejů. Ve své studii Novak a kolektiv (2001) testovali antimikrobiální aktivitu pěti různých kultivarů *C. sativa* (Felina, Fedrina, SwissMix, Kompolti a Secuemi), které obsahovaly jako hlavní sloučeniny  $\alpha$ -pinen, myrcen, *trans*- $\beta$ -ocimen,  $\alpha$ -terpinolen, *trans*-karyofylen a  $\alpha$ -humulen. Testování probíhalo na Petriho miskách, principem metody byla kultivace bakterií na miskách a následná aplikace 15  $\mu$ l testovaného oleje s měřením inhibiční zóny. Výsledky tohoto testování prokázaly antimikrobiální aktivitu u bakterií *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* a *S. aureus*.

V současné době však prozatím neexistují žádné studie, které by se zabývaly antimikrobiální aktivitou konopných extraktů v různé fázi zralosti rostliny, jako je tomu v případě tohoto experimentu. Proto jsou tyto výsledky těžko srovnatelné s odbornou literaturou.

Existuje řada studií zabývajících se antimikrobiální aktivitou silic pocházejících z různých odrůd *C. sativa*. Kromě kanabinoidů, obsahují extrakty také monoterpeny, seskviterpeny a další látky podobné terpenoidům s antimikrobiální aktivitou sčítající se s aktivitou kanabinoidů. Studie Nisen a kolektiv (2010) se zaměřuje na čerstvě extrahované

silice ze tří odrůd konopí (Carmagnola, Finanova a Futura) a jejich inhibiční aktivitu na mikrobiální růst, která vykazuje slibné výsledky proti gram-pozitivním mikroorganismům, jako je například i *S. aureus*. Studie Pellegriny a kolektiv (2020) na antioxidační a antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů *C. sativa* odrůdy Futura 75 prokázala antimikrobiální aktivitu proti patogenním bakteriím, které jsou gram-pozitivní jako je například *S. aureus* v hodnotách MIC 1,25–5 µg/ml, což je mnohem nižší než v případě tohoto experimentu, kdy byly hodnoty MIC v rozmezí 16–256 µg/ml. Další studie provedena v roce 2013 (Russo & Reggiani) dospěla k závěru, že biologicky aktivní látky obsažené v konopí jsou ovlivněny odrůdou, podmínkami růstu a také obdobím sklizně. Což se projevuje i v experimentu této práce.

Minimální inhibiční koncentrace použitých extraktů konopí se pohybuje v rozmezí od 256 µg/ml po 16 µg/ml. Nejvyšší hodnota 256 µg/ml je naměřena v prvním týdnu, což je pravděpodobně dáno nedostatečným vzrůstem rostliny (běžně jsou pro výrobu extraktů z konopí preferovány dospělé samičí rostliny, protože je u nich nejvyšší produkce kanabinoidů (Thomas & Elsohly 2016)). Poté postupně až do 7. týdne koncentrace klesala s největším skokem v rozmezí 4. a 5. týdne, kdy se začaly do extrakce zahrnovat i květy rostlin, které obsahují žláznaté trichomy, ve kterých jsou kanabinoidy obsaženy v největším množství (Turner et al. 1981). Dle studie Yang a kolektiv (2020) se ukazuje, že celkové množství kanabinoidů, především THC, CBD a CBG významně vzrůstá, když nastává dozrávání květů, přičemž nejvyšší koncentrace je dosaženo během 6–7. týdne, což odpovídá analýze konopných extraktů v tomto experimentu.

Předpokladem je, že vzorky s nejvyšším obsahem kanabinoidů a tím pádem i látek s prokázanou antimikrobiální aktivitou, budou dosahovat nižších hodnot MIC. Toto se však nepotvrdilo, jelikož nejvyššího obsahu součtu všech kanabinoidů bylo dosaženo v extraktech odebraných v 8. týdnu, avšak nejnižší inhibiční koncentrace dosahovaly vzorky z konopí odebrané v 7. týdnu, kdy se jednalo o hodnotu 16 µg/ml. Zřejmě tedy nezávisí na kanabinoidech jako takových, ale jednotlivé kanabinoidy vykazují rozdílný inhibiční efekt a záleží tedy na jejich poměru v daném extraktu a v daném týdnu sklizně. Největší rozdíl mezi 7. a 8. týdnem je tvořený především v obsahu THC a CBD. Studie van Klingerena a kolektiv (1976) zjistila, že THC a CBD mají inhibiční aktivitu proti gram-pozitivnímu *S. aureus*, a to v řádu MIC 1–5 µg/ml. To odůvodňuje nejnižší MIC v 7. týdnu tohoto experimentu. Vůči THC a CBD jsou gram-negativní bakterie odolné.

Ve studii (Apendino et al. 2008) je zkoumáno 5 nejčastěji se vyskytujících kanabinoidů a to THC, CBD, CBG, CBC a CBN. Všechny tyto sloučeniny vykazují silnou antibakteriální aktivitu s hodnotami MIC 0,5–2 µg/ml proti kmenům *S. aureus*. Tyto aktivity jsou velmi příznivé ve srovnání se standardně využívanými antibiotiky. Studie z roku 2023 od Luz-Veiga a kolektiv ukazuje, že CBG má na rozdíl od CBC silnější antimikrobiální účinek, což je pravděpodobně vysvětlitelné tím, že struktura CBG a CBD je mírně odlišná. Konkrétně především alicyklický kruh v CBD, který ale v CBG tvoří alkylový řetězec (viz Obrázek 2). Tento strukturální rozdíl může vysvětlovat odlišnou interakci s bakteriálními membránovými receptory.

Výsledky experimentu nevykazují žádné výrazné rozdíly v citlivosti na antibakteriální látky přírodního původu mezi zástupci MRSA a MSSA během 1. týdne. Poté dochází u MRSA k dřívějšímu snížení minimální inhibice, avšak 7. týden je shodný jako týden s nejnižší požadovanou koncentrací extraktů k inhibici patogenu. Tato hodnota je 16 µg/ml pro oba zástupce. Což by mohlo být způsobeno možnou změnou v genotypu, díky které byla vyvolána rezistence.

Základem nynější léčby meticilin-rezistentního *S. aureus* jsou glykopeptidy, vankomycin a teikoplanin. Rezistence na meticilin se v rámci světa liší, například ve Velké Británii si MRSA zachovává citlivost na gentamycin či tetracykliny, zatímco kmeny MRSA v kontinentální Evropě tuto citlivost již nemají (Livermore 2000). Vankomycin, glykopeptidové antibiotikum, inhibující biosyntézu buněčné stěny je antibiotikem využívaným pro léčbu infekcí způsobených MRSA. Kmeny *S. aureus*, které vykazují zvýšenou rezistenci proti vankomycinu byly objeveny v 90. letech 20. století (MIC 4–8 µg/ml), v roce 2002 byly v USA hlášeny vankomycin rezistentní kmeny (MIC ≥ 16 µg/ml) (McGuinness et al. 2017). Tento příklad jasně ukazuje, že antibiotická rezistence se vyvíjí velmi rychle, možnost alternativních řešení, je tedy velmi důležitá.

Výsledky tohoto experimentu ukazují, že antimikrobiální aktivita extraktů může být využívána jako léčba rezistentních patogenů například *S. aureus*, jako tomu bylo v tomto případě. MIC konopných extraktů je ale stále poměrně vysoká, proto by bylo vhodné vést výzkumy na možnosti synergické podpory tohoto prostředku. Již nyní se zkoumá synergický účinek rostlinných extraktů a antibiotik na zvýšení účinnosti léčby a například studie Nascimento a kolektiv (2000) prokázala toto synergické spojení. Pokud by se konopné extrakty kombinovaly s dalšími přírodními látkami s antimikrobiální aktivitou, je pravděpodobné, že by došlo se snížení MIC a zároveň zvýšení účinnosti léčby.

Dle výsledků zatím provedených studií existují oprávněné důvody pro podporu potenciálního využívání léčebného konopí, pro jeho široké možnosti využití a širokou škálu zdraví prospěšných účinků. Ve studiích hodnotících bakterii *S. aureus* dochází k pozitivnímu jevu inhibice patogenu, což je slibné z pohledu možnosti léčby pomocí přírodních preparátů, ať již pouze pomocí kanabinoidů, či extraktů s dalšími účinnými látkami. Je ale zapotřebí dalšího výzkumu a také další úpravy legislativních zákonů jednotlivých zemí.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit literární rešerši na téma Antibakteriální aktivita konopných extraktů v různém stádiu zralosti konkrétně vůči dvěma standardním kmenům bakterie *S. aureus* (meticylin-senzitivní ATCC 29213 a meticylin-rezistentní ATCC 43300). Dále pak stanovit MIC těchto extraktů pomocí mikrodiluční metody. Cíl této diplomové práce byl splněn.

Teoretický úvod do problematiky byl poskytnut v první části této práce v podobě shromáždění plnohodnotných článků, ze kterých byl vytvořen systematický přehled literatury. Dále se práce zabírala problematikou bakterií rodu *Staphylococcus*, konkrétně pak bakteriemi *S. aureus*. Také obsahovala shrnutí poznatků o rostlině *C. sativa* L. a biologicky aktivních sloučeninách, které lze v této rostlině nalézt. Tyto sloučeniny mají vlastnosti, které lze považovat za velmi příznivé pro lidské zdraví. Ať už se jedná o účinky antimikrobiální, imunosupresivní, či nutriční hodnoty samotných konopných semen, které jsou bohaté na vlákninu, esenciální mastné kyseliny a aminokyseliny. Z hlediska své všestranné využitelnosti, ať již v podobě výtažků z rostlin určených pro zlepšení zdraví nebo také využitelnosti přímo jako potravina, má konopí velký potenciál.

Praktická část práce zaměřená na stanovení MIC 13 konopných extraktů proti kmenům *S. aureus* ATCC 29213 a ATCC 43300 potvrzuje, že konopné extrakty vykazují inhibiční účinky proti zástupcům těchto patogenů, a to v závislosti na stádiu zralosti rostliny. MIC se pohybovala v hodnotách od 16  $\mu\text{g/ml}$  do 256  $\mu\text{g/ml}$  v závislosti na fázi zralosti rostliny, ze které byl získán použitý extrakt. Výsledky byly získány pomocí standardizované mikrodiluční metody v 96-jamkové mikrotitrační destičce.

Hypotézu, která zněla takto: „Konopné extrakty vykazují antibakteriální účinky, závislé na druhu a kmenu bakterie, případně na stádiu zralosti rostliny“, lze vzhledem k výsledkům tohoto experimentu potvrdit v oblasti stádia zralosti rostliny.

## 8 Literatura

- Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E, Schibano D, Simsir Y, Navarro P, Usobiaga A. 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of natural products*, 79(2), 324-331.
- Albaugh KW, Biely SA, Cavorsi JP. 2013. The effect of a cellulose dressing and topical vancomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Gram-positive organisms in chronic wounds: a case series. *Ostomy Wound Manage*, 59(5), 34-43.
- Alves P, Amaral C, Teixeira N, Correia-da-Silva G. 2020. *Cannabis sativa*: Much more beyond Δ9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacological research*, 157, 104822.
- Andre CM, Larondelle Y, Evers D. 2010. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 2-12.
- Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. 2015. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 6, 587.
- Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. 2019. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano silver. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 127, 208–216.
- Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. 2019. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1215.
- Atabani AE, Silitonga AS, Ong HC, Mahlia TMI, Masjuki HH, Badruddin IA, Fayaz H. 2013. Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 18, 211-245.
- Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. 2019. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*, 9(1), 21.
- Bamigboye BT, Olowe OA, Taiwo SS. 2018. Phenotypic and molecular identification of vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Osogbo, Nigeria. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(1), 25-30.
- Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, Nabavi SM. 2017. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological research*, 196, 44-68.
- Barrett ML, Gordon D, Evans FJ. 1985. Isolation from *Cannabis sativa* L. of cannflavin—a novel inhibitor of prostaglandin production. *Biochemical pharmacology*, 34(11), 2019-2024.
- Beneš J. 2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.
- Bennett JW, Chung KT. 2001. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, 163–184.

- Biswas S, Raoult D, Rolain JM. 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(3), 207–220.
- Bowler PG, Davies BJ. 1999. The microbiology of acute and chronic wounds. *Wounds*;11:72-8.
- Brenneisen R. 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents, in *Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine*, ed. M. ElSohly (New York, NY: Humana Press), 17–49.
- Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Maran D, Benvenuti S. 2017. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L.(hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 228-236.
- Brunnicardi FC. 2004. *Schwartz's principles of surgery* 8th ed. New York: McGraw-Hill.
- Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. 2014. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 218-228.
- Cabrera CLR, Keir-Rudman S, Horniman N, Clarkson N, Page C. 2021. The anti-inflammatory effects of cannabidiol and cannabigerol alone, and in combination. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 69, 102047.
- Catry, B., et al. 2010. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiology & Infection*, 138(5), 626-644..
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crescente G, Piccolella S, Esposito A, Scognamiglio M, Fiorentino A, Pacifico S. 2018. Chemical composition and nutraceutical properties of hempseed: An ancient food with actual functional value. *Phytochemistry Reviews*, 17, 733-749.
- David MZ, Daum RS. 2017. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*, 325-383.
- Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. 2011. Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 255–266.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement\_2), S114-S132.
- Dubin G. 2002. Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. *Biological Chemistry*, 383(7-8).

- Edwards AM, Massey RC. 2011. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? *Trends in Microbiology*, 19(4), 184–190.
- Ehlers S, Merrill SA. 2018. *Staphylococcus saprophyticus*.
- ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. 2017. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. Phytocannabinoids: unraveling the complex chemistry and pharmacology of *Cannabis sativa*, 1-36.
- ElSohly MA, Slade D. 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, 78(5), 539-548.
- Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. 2004. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns*30: 357–361
- EU. 2003. Nařízení č. 1831/2003/CE o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. In: Úřední věstník Evropské unie L268. s. 29-43. <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&rid=1>>.
- Farinon B, Molinari R, Costantini L, Merendino N. 2020. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1935.
- Fathordoobady F, Singh A, Kitts DD, Pratap Singh A. 2019. Hemp (*Cannabis sativa* L.) extract: Anti-microbial properties, methods of extraction, and potential oral delivery. *Food Reviews International*, 35(7), 664-684.
- Francia, MV, Clewell DB. 2002. Transfer origins in the conjugative *Enterococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAM373: identification of the pAD1 nic site, a specific relaxase and a possible TraG-like protein. *Molecular microbiology*, 45(2), 375-395.
- Frassinetti S, Gabriele M, Moccia E, Longo V, Di Gioia D. 2020. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *Lwt*, 124, 109149.
- Gardete S, Tomasz A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2836–2840.
- Genç Y, Özkanca R, Bekdemir Y. 2008. Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 7, 1-6.
- Goldrick B. 2002. First Reported Case of VRSA in the United States: An alarming development in microbial resistance. *AJN The American Journal of Nursing*, 102(11), 17.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, Bouffards GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Segre JA. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *science*, 324(5931), 1190-1192.
- Grice EA, Segre JA. 2011. The skin microbiome. *Nature reviews microbiology*, 9(4), 244-253.



- Guo Y, Song G., Sun M, Wang J, Wang Y. 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00107
- Gutiérrez A, del Río JC. 2005. Chemical characterization of pitch deposits produced in the manufacturing of high-quality paper pulps from hemp fibers. *Bioresource technology*, 96(13), 1445-1450.
- Harbige LS, Layward L, Morris-Downes MM, Dumonde DC, Amor S. 2000. The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$  1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PGE2) production. *Clinical & Experimental Immunology*, 122(3), 445-452.
- Hooper DC. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 337.
- Humphreys H. 2012. *Staphylococcus aureus*: the enduring pathogen in surgery. *the surgeon*, 10(6), 357-360.
- Chakraborty A, Chowdhury BK, Bhattacharyya P. 1995. Clausenol and clausenine—two carbazole alkaloids from *Clausena anisata*. *Phytochemistry*, 40(1), 295-298.
- Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR. 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review. *Plants*, 6(2), 16.
- Chen T, He J, Zhang J, Zhang H, Qian P, Hao J, Li L. 2010. Analytical characterization of hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.) oil from eight regions in China. *J Diet Suppl* 7:117–129
- Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. 2001. Skin microflora and bacterial infections of the skin. In *Journal of Investigative dermatology Symposium proceedings* (Vol. 6, No. 3, pp. 170-174). Elsevier.
- Cholewski M, Tomczykowa M, Tomczyk M. 2018. A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids. *Nutrients*, 10(11), 1662.
- Ibrahim TA. 2012. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*, 17(10), 11315-11334.
- Jellheden B, Norrby RS, Sandberg T. 1996. Symptomatic urinary tract infection in women in primary health care: bacteriological, clinical and diagnostic aspects in relation to host response to infection. *Scandinavian journal of primary health care*, 14(2), 122-128.
- Karas JA, Wong LJ, Paulin OK, Mazeh AC, Hussein MH, Li J, Velkov T. 2020. The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics*, 9(7), 406.
- Karğılı U, Aytaç E. 2022. Supercritical fluid extraction of cannabinoids (THC and CBD) from four different strains of cannabis grown in different regions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 105410.

- Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. 2016. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, 95, 32–42.
- Khan BA, Warner P, Wang H. 2014. Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *BioResources*, 9(2), 3642-3659.
- Khoshnood S, Heidary M, Asadi A, Soleimani S, Motahar M, Savari M, et al. 2019. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1809–1818.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Hebarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte E, Friedrich AW. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*, 15(41).
- Kriese U, Schumann E, Weber WE, Beyer M, Brühl L. 2004. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica*, 137, 339-351.
- Kumar A, Chordia N. 2017. Bacterial resistance against antibiotics. *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer*, 171-192.
- Lakhundi S, Zhang K. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4).
- Lan Y, Zha F, Peckrul A, Hanson B, Johnson B, Rao J, Chen B. 2019. Genotype x environmental effects on yielding ability and seed chemical composition of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in North Dakota, USA. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(12), 1417-1425.
- Lee YD, Park JH. 2016. Phage conversion for  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from foods. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(2), 263-269.
- Leger CL. 2000. La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 7(3), 258-265.
- Leonard W, Zhang P, Ying D, Xiong Y, Fang Z. 2021. Extrusion improves the phenolic profile and biological activities of hempseed (*Cannabis sativa* L.) hull. *Food Chemistry*, 346, 128606.
- Luz-Veiga M, Amorim M, Pinto-Ribeiro I, Oliveira ALS, Silva S, Pimentel LL, Rodríguez-Alcalá LM, Madureira R, Pintafo M, Azevedo-Silva J, Fernandes J. 2023. Cannabidiol and Cannabigerol Exert Antimicrobial Activity without Compromising Skin Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2389.
- Lynch AS. 2006. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 949–956.
- Mattila P, Mäkinen S, Euroala M, Jalava T, Pihlava JM, Hellström J, Pihlanto A. 2018. Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant foods for human nutrition*, 73(2), 108-115.

- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. 2017. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 269.
- McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. 2017. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2), 269.
- Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, Tang MD, Phung TO, Spellberg MD. 2005. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *New England Journal of Medicine*, 352(14), 1445-1453.
- Moon YJ, Wang X, Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*, 20(2), 187-210.
- Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. The infant microbiome development: mom matters. *Trends in molecular medicine*, 21(2), 109-117.
- Murray PR, Ellen Jo. BARON. 2003. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press,. ISBN 15-558-1255-4.
- Naraine SG, Small E, Laursen AE, Campbell LG. 2020. A multivariate analysis of morphological divergence of “seeds”(achenes) among ruderal, fibre, oilseed, dioecious/monoecious and marijuana variants of *Cannabis sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(3), 703-714.
- Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31, 247-256.
- Naveed M, Khan TA, Ali I, Hassan A, Ali H, Ud Z, Din ZH, Tabassum S, Saqib AM, Rehman MU. 2014. In vitro antibacterial activity of *Cannabis sativa* leaf extracts to some selective pathogenicbacterial strains. *Int. J. Biosci.* 4, 65–70.
- Nesme J, Simonet P. 2015. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental microbiology*, 17(4), 913-930.
- Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, Monti A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5), 413–419.
- Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, Monti A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5), 413–419.
- Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz CM. 2001. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour and fragrance journal*, 16(4), 259-262.
- Ogston A. 1880. Über Abscesse. *Arch Klin Chir* 1880; 25: 588– 600.

- Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Kong HH, Segre JA. 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514(7520), 59-64.
- Oh J, Byrd AL, Park M, Kong HH, Segre JA, NISC Comparative Sequencing Program. 2016. Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell*, 165(4), 854-866.
- Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. 2012. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome medicine*, 4, 1-11.
- O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG, Martyn-St JM, Richardson R. 2014. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
- Oseyko M, Sova N, Lutsenko M, Kalyna V. 2019. Chemical aspects of the composition of industrial hemp seed products. *Ukrainian Food Journal*, 8(3), 544-559.
- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), 555-567.
- Pasteur L. 1880. De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes. *CR Acad Sci*, 90, 1033-1044.
- Pellegrini M, Palmieri S, Ricci A, Serio A, Paparella A, Lo Sterzo C. 2020. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. cv 'Futura 75' essential oil. *Natural Product Research*, 1-5.
- Pereira PMA, Binatti VB, Sued BPR, Ramos JN, Peixoto RS, Simões C, Pereira JAA. 2014. *Staphylococcus haemolyticus* disseminated among neonates with bacteremia in a neonatal intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 78(1), 85-92.
- Petráš P. 2010. Nový „český“ stafylokok, *Staphylococcus microti*. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, PRAHA)*. 19(1-2), 37-39.
- Pichereau S, Rose WE. 2010. Invasive community-associated MRSA infections: epidemiology and antimicrobial management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(18), 3009-3025. doi:10.1517/14656566.2010.511614
- Pollastro F, Minassi A, Fresu LG. 2018. Cannabis phenolics and their bioactivities. *Current medicinal chemistry*, 25(10), 1160-1185.
- Raad I, Hanna H, Maki D. 2007. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *The Lancet infectious diseases*, 7(10), 645-657.
- Rajput R, Kumar K. 2018. A review on *cannabis sativa*: its compounds and their effects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 53(2), 59-63.
- Ramsey MM, Freire MO, Gabriliska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. 2016. *Staphylococcus aureus* shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 1230.
- Rayner C, Munckhof WJ. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal medicine journal*, 35, S3-16.

- Richards JJ, Melander C. 2009. Small molecule approaches toward the non-microbicidal modulation of bacterial biofilm growth and maintenance. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 8(4), 295-314.
- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America*, 23(1), 73-98.
- Rolland V, Badger MR, Price GD. 2016. Redirecting the cyanobacterial bicarbonate transporters BicA and SbtA to the chloroplast envelope: soluble and membrane cargos need different chloroplast targeting signals in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 185.
- Rosenbach FJ. 1884. *Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*, Wiesbaden, JF Bergmanns Verlag, p.1–122.
- Ross SA, ElSohly MA, Sultana GN, Mehmedic Z, Hossain CF, Chandra S. 2005. Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(1), 45-48.
- Russo EB. 2007. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1614-1648.
- Russo EB. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344-1364.
- Russo R, Reggiani R. 2013. Variability in antinutritional compounds in hempseed meal of Italian and French varieties. *Plant*, 1(2), 25-29.
- Saldeen K, Saldeen T. 2005. Importance of tocopherols beyond  $\alpha$ -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25(10), 877-889.
- Serna-Loaiza S, Adamczyk J, Beisl S, Kornpointner C, Halbwirth H, Friedl A. 2020. Pressurized Liquid Extraction of Cannabinoids from Hemp Processing Residues: Evaluation of the Influencing Variables. *Processes*, 8(11), 1334.
- Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. 2020. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 10(1), 1-16.
- Sher A. 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants.
- Suresh B, Sriram S, Dhanaraj SA, Elango K, Chinnaswamy K. 1997. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of ethnopharmacology*, 55(2), 151-159.
- Schewe T, Kuhn H, Sies H. 2002. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *The Journal of nutrition*, 132(7), 1825-1829.
- Schofs L, Sparo MD, Sanchez Bruni SF. 2021. The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(2), e00761.

- Scholz CF, Kilian M. 2016. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4422-4432.
- Schulte RH, Munson E. 2019. *Staphylococcus aureus* Resistance Patterns in Wisconsin. *Clinical Medicine & Research*, 17(3-4), 72–81.
- Siddiqui AR, Bernstein JM. 2010. Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28(5), 519–526.
- Simopoulos AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
- Singh A, Halder S, Chumber S, Misra MC, Sharma LK, Srivastava A, Menon GR. 2004. Meta-analysis of randomized controlled trials on hydrocolloid occlusive dressing versus conventional gauze dressing in the healing of chronic wounds. *Asian journal of surgery*, 27(4), 326-332.
- Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Hiramatsu K. 2005. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7292-7308.
- Tammelin A, Lindholm C, Hambræus A. 1998. Chronic ulcers and antibiotic treatment. *Journal of wound care*, 7(9), 435-437.
- Tayeb-Fligelman E, Tabachnikov O, Moshe A, Goldshmidt-Tran O, Sawaya MR, Coquelle N, Colletier JP, Landau M. 2017. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM $\alpha$ 3 reveals a cross- $\alpha$  amyloid-like fibril. *Science*, 355(6327), 831–833.
- Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Petal JB, Bozdogan B. 2004 Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Ch48*: 275–280
- Thomas BF, Elsohly M. 2015. *The analytical chemistry of cannabis: Quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations*. Elsevier.
- Tucker LA. 2017. Consumption of nuts and seeds and telomere length in 5,582 men and women of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *The journal of nutrition, health & aging*, 21, 233-240.
- Turner JC, Hemphill JK, Mahlberg PG. 1981. Interrelationships of glandular trichomes and cannabinoid content. I. Developing pistillate bracts of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *Bulletin on narcotics*, 33(2), 59-69.
- Van Klingereren B, Ten Ham M. 1976. Antibacterial activity of  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42, 9-12.

- Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. 2019. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr.* 7:GPP3-0057-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018
- Votava M. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun,. ISBN 80-902896-6-5.
- Wagenvoort JH, Sluijsmans W, Penders RJ. 2000. Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. *J Hosp Infect*45: 231–234
- Wang L, Jin P, Wang J, Jiang, L, Shan T, Zheng Y. 2015. Methyl jasmonate primed defense responses against *Penicillium expansum* in sweet cherry fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 1464-1471.
- Webber MA, Piddock LJV. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(1), 9-11.
- Weber J, McManus A. 2004. Nursing Committee of the International Society for Burn Injuries. Infection control in burn patients. *Burns*30: A16–A24.
- Wertheim HF, Verveer J, Boelens HA, Van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC. 2005. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob Agents Ch*49: 1465–1467.
- Wysocki AB. 2002. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues*13: 382–397.
- Yang R, Berthold E, McCurdy CR, da Silva Benevenuto S, Brym ZT, Freeman JH. 2020. Development of Cannabinoids in Flowers of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) - a Pilot Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Zagožen M, Čerenak A, Kreft S. 2021. Cannabigerol and cannabichromene in *Cannabis sativa* L. *Acta Pharmaceutica*, 71(3), 355-364.
- Zervos MJ, Freeman K, Vo L, Haque N, Pokharna H, Raut M, Kim M. 2012. Epidemiology and outcomes of complicated skin and soft tissue infections in hospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*, 50(2), 238-245.
- Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, Qin ZQ, Miao YG, Wang WY, Chen RS, Shen Y, Chen Z, Yuan ZH, Zhao GP, Qu D, Danchin A, Wen YM. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular microbiology*, 49(6), 1577-1593.
- Zuardi AW. 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28, 153-157.

## 9 Seznam grafů, obrázků a tabulek

### Seznam grafů

|  |    |
|--|----|
| Graf 1 Prevalence výskytu VRSA .....   | 17 |
| Graf 2 Prevalence výskytu VISA .....   | 18 |
| Graf 3 Prevalence výskytu hVISA .....  | 18 |
| Graf 4 MIC <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 v závislosti na použitém extraktu ..... | 36 |
| Graf 5 MIC <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 v závislosti na použitém extraktu ..... | 37 |

### Seznam obrázků

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 1 Příčný průřez kůží s mikroorganismy a kožními deriváty (Grice & Segre 2011) ..   | 11 |
| Obrázek 2 Základní strukturní typy kanabinoidů (Schofs et al. 2021).....   | 23 |
| Obrázek 3 Metody extrakce látek z <i>Cannabis sativa</i> L.: DM: dynamická macerace, PLE: extrakce kapalinou pod tlakem, SFE: superkritická fluidní extrakce, UAE: ultrazvuková extrakce, MAE: mikrovlnná extrakce, THC: tetrahydrokanabinol, CBN: kanabinol, CBD: kanabidiol (Fathordoobady et al. 2019)..... | 26 |
| Obrázek 4 Design mikrotitrační destičky .....  | 32 |
| Obrázek 6 Příklad výstupu dat z přístroje Tecan.....   | 35 |

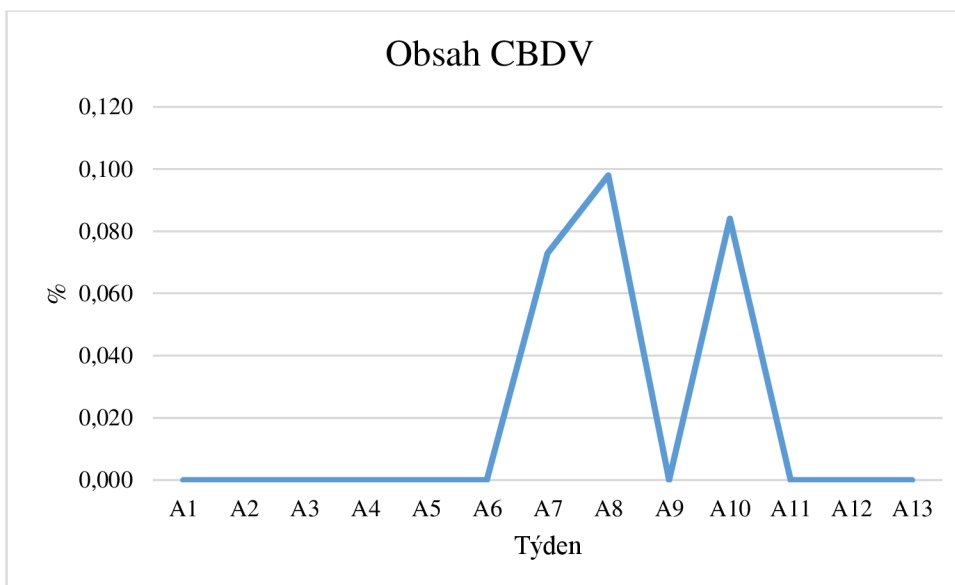
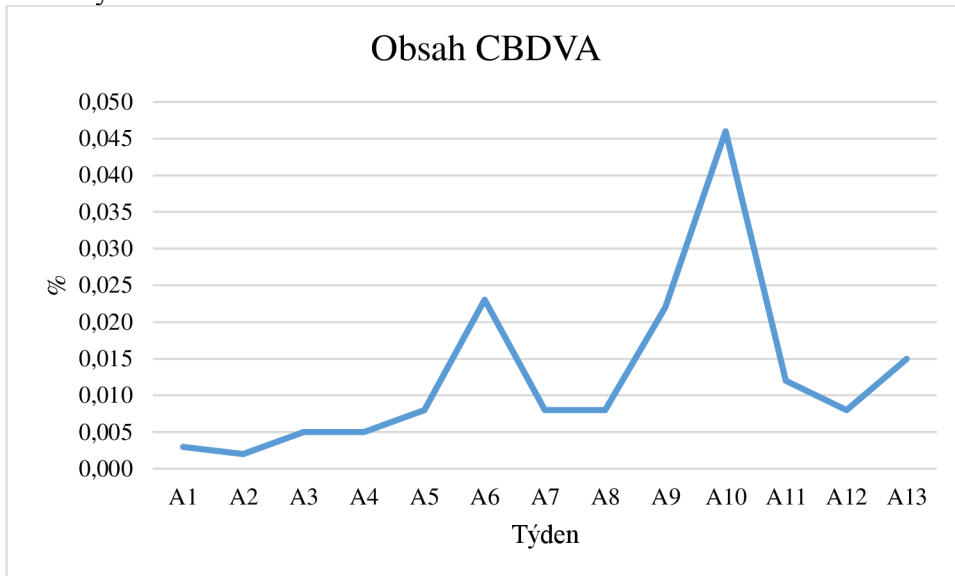
### Seznam tabulek

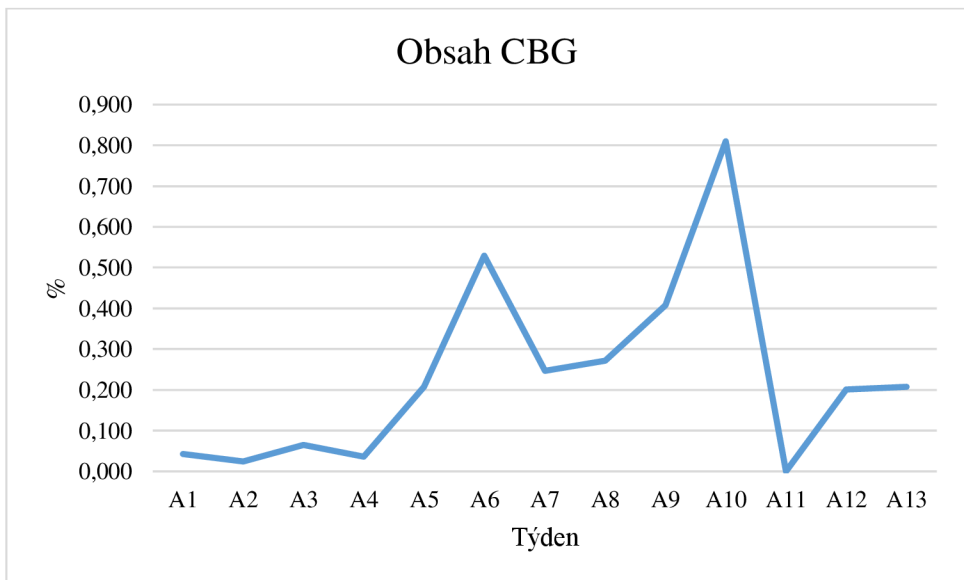
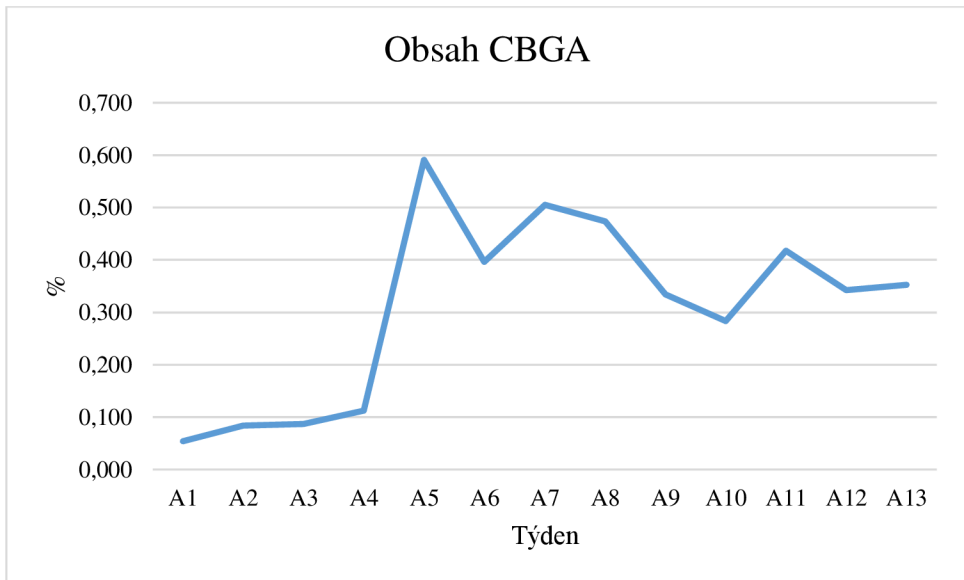
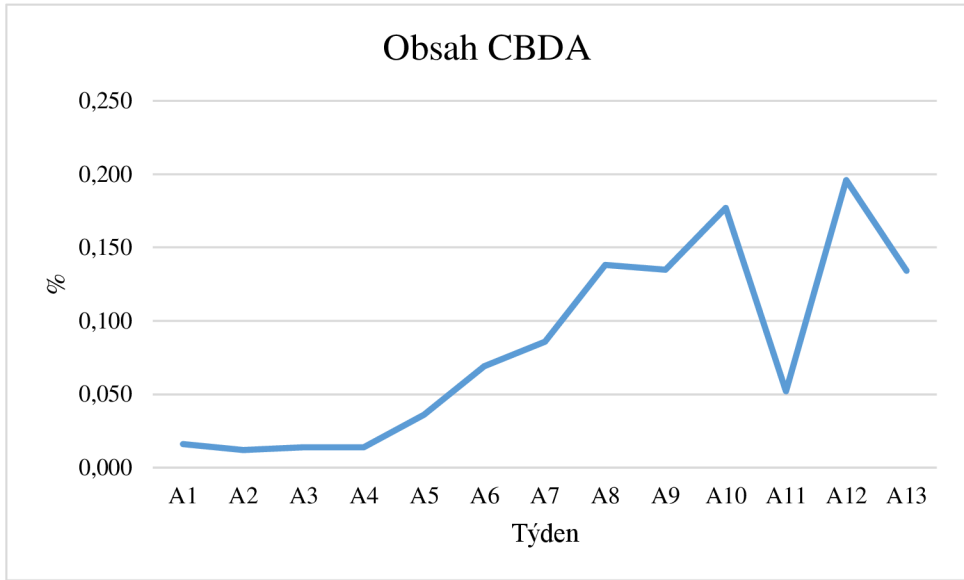
|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1 Obsah esenciálních aminokyselin obsažených v semenu rostliny <i>C. sativa</i> (Oseyko et al. 2019) ..... | 29 |
| Tabulka 2 Složení média Mueller Hinton Broth (Oxoid, Velká Británie) .....   | 30 |
| Tabulka 3 Zastoupení kanabinoidů v různém týdnu experimentu.....   | 34 |
| Tabulka 4 MIC <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 .....  | 36 |
| Tabulka 5 MIC <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 .....  | 37 |

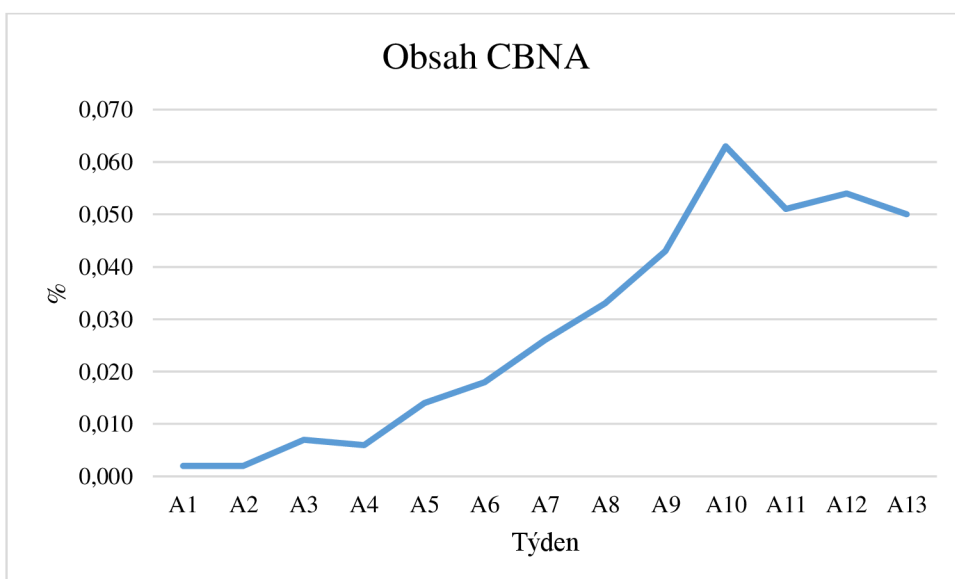
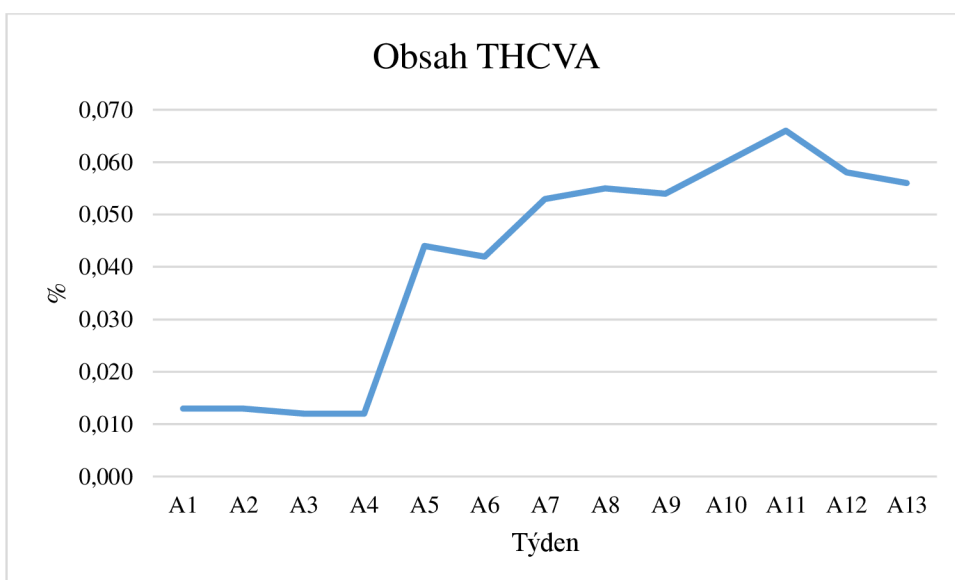
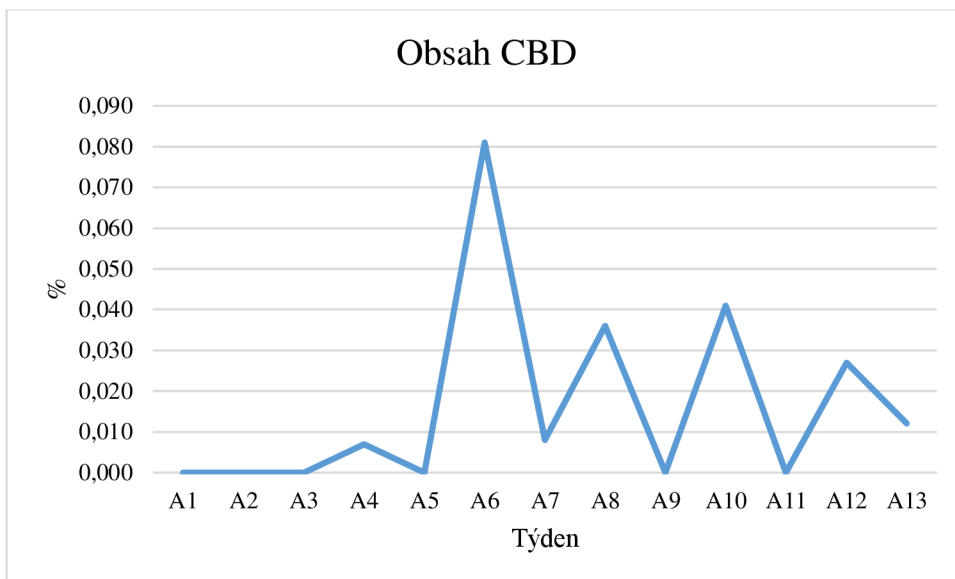


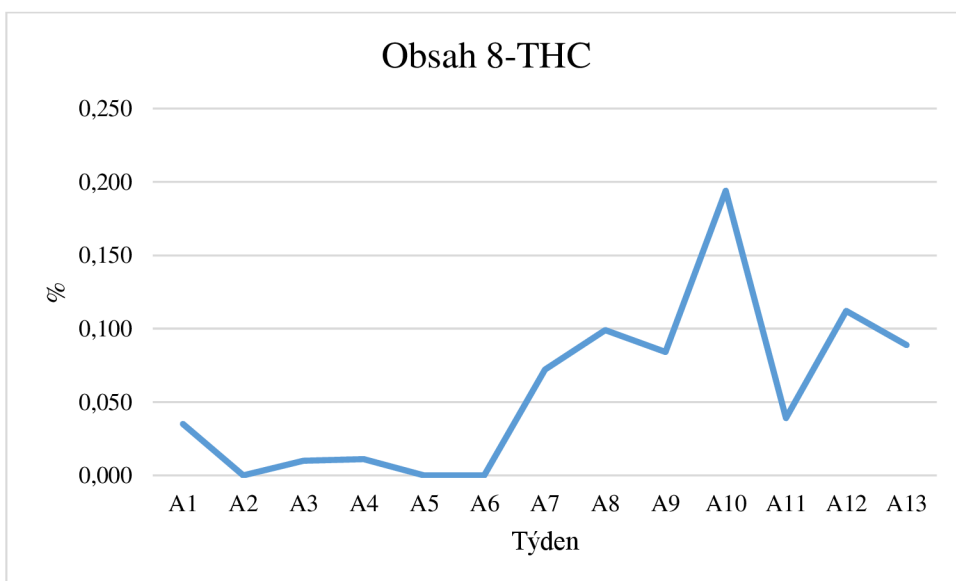
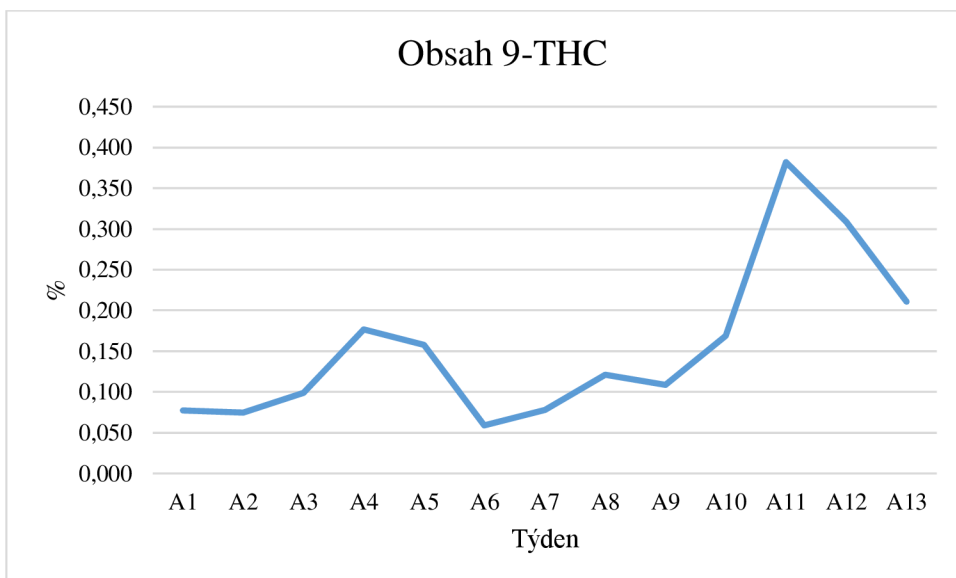
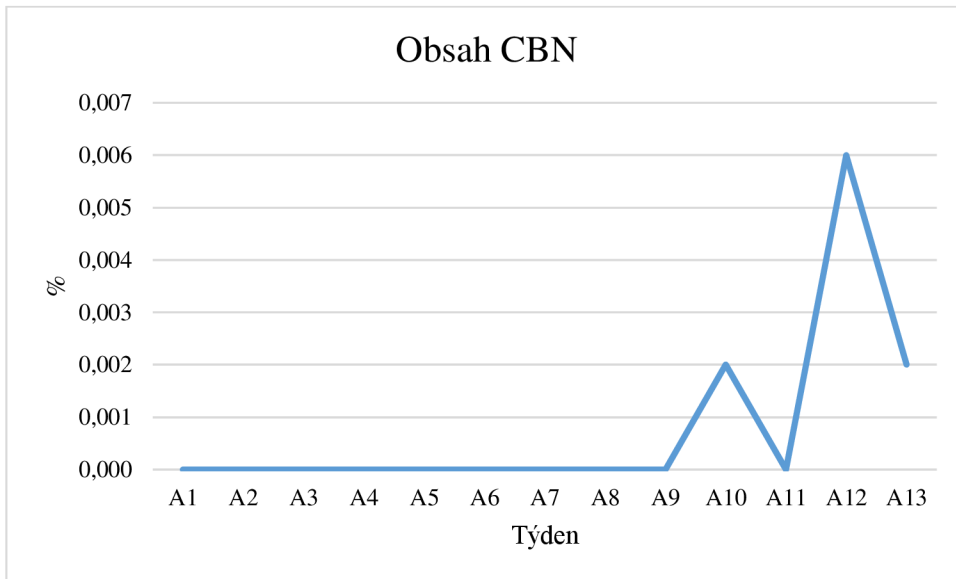
## 10 Samostatné přílohy

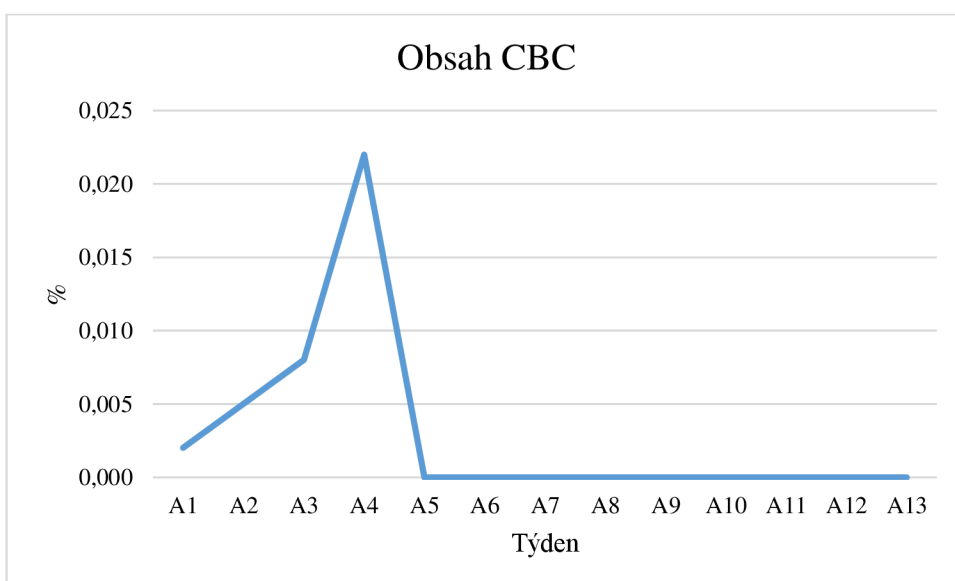
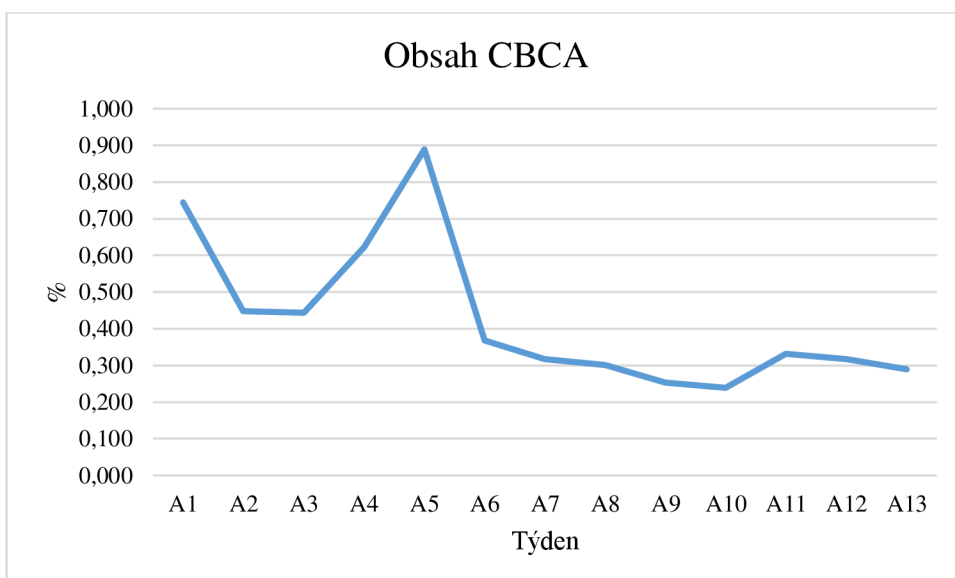
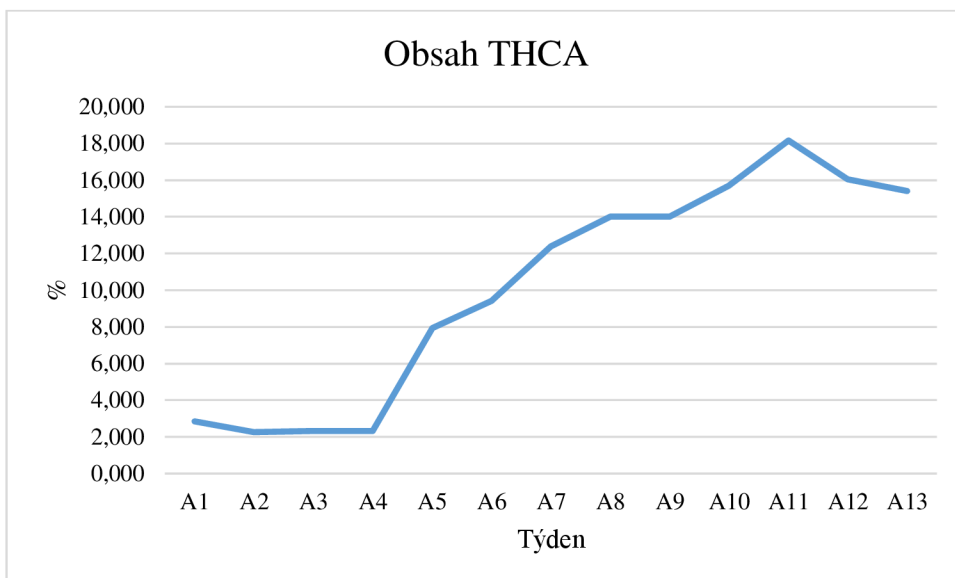
Příloha I – Grafy obsahu jednotlivých kanabinoidů ve vzorcích konopných extraktů v průběhu 1–13. týdne

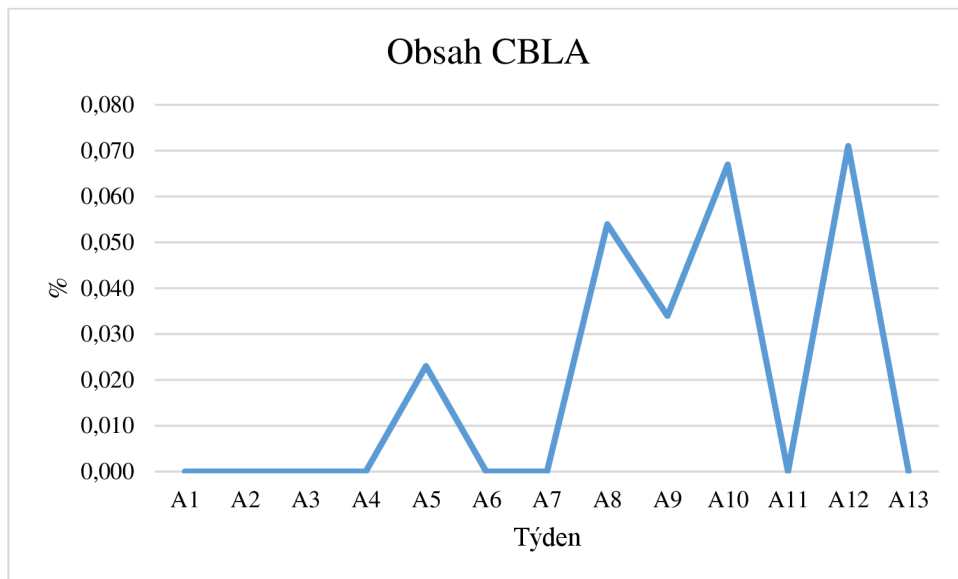












Příloha II– Graf obsahu všech kanabinoidů ve vzorcích konopných extraktů v průběhu 1–13 týdne

