

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Antivirotické a antibakteriální účinky biologicky
aktivních látek z přírodních zdrojů a jejich potenciální
využití proti klíšťaty přenášeným patogenům**

Diplomová práce

Bc. Nikola Ludvíková

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.
Školitel specialista: RNDr. Pavlína Věchtová

České Budějovice 2016

Ludvíková, N., 2016: Antivirotické a antibakteriální účinky biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů a jejich potenciální využití proti klíšťaty přenášeným patogenům. [Antiviral and antibacterial effects of biologically active substances from natural sources and their potential use against tick-borne pathogens. Master Thesis, in Czech.] – 75 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Následující pasáž o rozsahu 1 strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích 22. 4. 2016.

Bc. Nikola Ludvíková

Poděkování

Velké poděkování patří mému školiteli RNDr. Jankovi Štěřbovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Mé poděkování patří též Hance Maškové a Radomíru Vokurkovi za cenné rady a spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce. Dále bych ráda poděkovala Páji Věchtové a Martinu Selingerovi za výraznou pomoc a trpělivost při provádění pokusů, a vůbec celému kolektivu z laboratoře za příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě patří velké dík mému příteli za psychickou podporu a za dobrovolné převzetí veškerých domácích prací po celou dobu psaní mé práce.

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
2.1	Biologicky aktivní látky z rostlin	6
2.1.1	Antioxidanty	7
2.2	Antimikrobiální látky	9
2.2.1	Antibiotika	9
2.2.2	Chemoterapeutika	10
2.2.3	Antivirotika	10
2.2.4	Antimykotika	11
2.6	Viry	13
2.6.1	Flaviviry	13
2.7	Bakterie	16
2.7.1	Klíšťaty přenášené bakterie	16
2.7.2	Lymfská borelióza	18
2.7.3	Standardní kmeny bakterií	19
3	CÍLE PRÁCE	22
4	MATERIÁL A METODY	23
4.1	Materiál	23
4.1.1	Buněčné linie	23
4.1.2	Roztoky a živná média	23
4.1.3	Virus klíšťové encefalitidy	25
4.1.4	Kmeny bakterií	25
4.2	Metody	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
6	ZÁVĚR	29
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	30

1 ÚVOD

Léčebné využití rostlin a následně jejich produktů se po celém světě předává z generace na generaci již po staletí, což výrazně přispívá k rozvoji různých tradičních systémů medicíny. V současné době Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) odhaduje, že přibližně 80 % světové populace považuje tradiční bylinné léky za součást standardní zdravotní péče (Foster et al., 2005). Mnoho předepisovaných léků je přímo izolováno z rostlin nebo se jedná o uměle upravované přírodní produkty (Payne et al., 1991). Biologická aktivita některých přírodních látek zahrnuje antibakteriální, antimykotické, antivirové a antiparazitární účinky. Zájem o výzkum těchto látek v posledních letech stoupá kvůli snaze o objevení nových látek použitelných v terapii virových a bakteriálních infekcí, především s ohledem na klesající účinnost běžně používaných antibiotik (Negi, 2012).

Přírodní látky jsou preferovány především pro svou mnohokrát minimální toxicitu a minimální vedlejší účinky, dobrou dostupnost a lepší odbouratelnost v organismu ve srovnání s antibiotiky (Vinšová a Imramovský, 2004). Výsledky studií potvrzují jejich široké uplatnění v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém průmyslu a v neposlední řadě také v medicíně (Farzaneh a Carvalho, 2015). Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním antivirových a antibakteriálních účinků biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů a jejich potenciálním využitím proti klíšťaty přenášeným patogenům.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biologicky aktivní látky z rostlin

Od nepaměti byly rostliny používány nejen jako zdroj potravy, ale také jako zdroj biologicky aktivních látek (Dushenkov a Raskin, 2008), které můžeme definovat jako látky, které jsou i v nízkých koncentracích schopny ovlivňovat životní pochody organismů, přičemž toto ovlivnění může být pozitivní, ale i negativní (Lachman et al., 2007). Jedná se o látky izolované z přírodních zdrojů, které se mohou svou strukturou jedna od druhé výrazně lišit. U některých se předpokládá preventivní působení proti vzniku rakovinného bujení, neinfekčním chorobám (např. kardiovaskulární a nádorové onemocnění) a blahodárné působení na posílení imunitního systému. Jedná se například o sulfidy, polyfenoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, fytáty, karotenoidy, lignany a další (Bulková, 2011). Přírodní látky získané z rostlin mají pro své různorodé účinky velký rozsah využití v medicíně, potravinářském průmyslu, kosmetice a farmakologii (Kalemba a Kunická, 2003).

Využívání rostlin pro léčebné účely bylo dokumentováno již v sumerských rukopisech před více než 5 000 lety. Látky rostlinného původu byly po dlouhou dobu jediným zdrojem léčivých produktů (Dushenkov a Raskin, 2008). Nejstarší sbírka lékařských textů Corpus Hippocraticum (pojednává celkem o 300 druzích rostlin) nahradila primitivní léčitelskou magii soustavným pozorováním a racionální úvahou a položila tak základy medicíny jako vědeckého oboru. Autorem těchto 58 spisů sepsaných v 73 knihách je neslavnější lékař antického Řecka Hippokratés z Kósu, který žil na přelomu 5. a 4. století před naším letopočtem (Schrutz, 1993).

Odhaduje se, že na Zemi existuje 250 000 až 500 000 druhů rostlin (Borris, 1996). Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization, FAO) uvádí, že se na celém světě využívá v tradiční lidové medicíně přes 50 000 druhů rostlin (Schippmann et al., 2002). Nejvyšší procento využívání původních druhů rostlin jako léčiv lze pozorovat v zemích jihovýchodní Asie, v Indii (20 %) a v Číně (19 %). Ve Spojených státech a v Ruské federaci se používá pro terapeutické účely více jak 10 % léků rostlinného původu (Gurib-Fakim, 2006).

2.1.1 Antioxidanty

Mezi nejvýznamnější látky preventivně působící proti mnohým neinfekčním chorobám (onemocnění kardiovaskulárního systému, nádorová a neurodegenerativní onemocnění atd.) patří antioxidanty. Tyto látky si dokáže člověk sám vyprodukovat nebo je přijímá potravou (zelenina, ovoce, obiloviny, luštěniny atd.). V současné době je známo více než 6 000 antioxidantů. Jejich hlavní funkcí je působení v těle proti volným radikálům, které se do organismu dostávají z vnějšího prostředí (exogenní), velké množství jich vzniká i v průběhu metabolismu (endogenní). Ve zdravém organismu existuje za normálních okolností mezi produkcí volných radikálů a jejich zneškodňováním antioxidanty rovnováha. Pokud převládají volné radikály nebo sníží-li se koncentrace antioxidantů, dochází k oxidačnímu stresu, což může vést ke vzniku četných chorob – ateroskleróze, ischemické chorobě srdeční, infarktu myokardu, diabetu, zhoubným nádorům a mnoha dalším onemocněním. Antioxidanty navíc zvyšují obranyschopnost a podporují imunitní systém organismu (Bulková, 2011).

2.1.1.1 Izolace biologicky aktivních látek z rostlin

Rostlinné extrakty (čisté sloučeniny nebo standardizované extrakty) slouží jako základ řady nových léčiv (Cos et al., 2006), která mohou být následně použita k léčbě chronických a infekčních onemocnění (Duraipandiyar et al., 2006). Díky zjištění, že se dají najít bezpečnější a účinnější formy léků, tzv. fytochemikálie (chemické látky získané z rostlin) mající menší negativní dopad na lidské zdraví než chemicky syntetizované léky (ke kterým často vzniká rezistence), izolace biologicky aktivních látek nabývá na důležitosti. K prokázání účinnosti bioaktivních sloučenin a pravdivosti těchto tvrzení jsou nezbytné klinické studie, jež jsou v rámci ochrany zdraví všech účastníků výzkumu pečlivě plánovány a vyhodnocovány (Sasidharan et al., 2010).

2.1.1.2 Extrakce biologicky aktivních sloučenin z rostlinných zdrojů

Vzhledem k tomu, že se extrakty z rostlin obvykle vyskytují jako kombinace různých typů biologicky aktivních sloučenin nebo fytochemických látek s různými polaritami, zůstává jejich separace stále velkým problémem v procesu identifikace a charakterizace těchto látek. Separační techniky mají za úkol získávat čisté sloučeniny, které se pak používají pro stanovení struktury a biologické aktivity těchto substancí (Sasidharan et al., 2010).

Při objevování nových léků z rostlinných zdrojů bývá prvním krokem extrakce (Wall et al., 1996). Používání tradičních extrahovacích metod, jako jsou například macerace, infúze nebo var pod zpětným vaříčem (reflux), bývá v posledních desetiletích nahrazováno širokou škálou moderních technik. Mezi ně patří mikrovlnná extrakce (microwave-assisted extraction, MAE), extrakce ultrazvukem (ultrasound-assisted extraction, UAE), superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction, SFE) a extrakce za zvýšené teploty a tlaku (accelerated solvent extraction, ASE). Výhodami metod MAE a UAE je především kratší doba extrakce a extrakce složek s vyšší biologickou aktivitou (Zhang et al., 2011).

Enzymy urychlená extrakce (enzyme-assisted extraction) je slibnou alternativní extrakcí v biotechnologických aplikacích. Při extrakci se používají enzymy, jako jsou celulózy, pektinázy a hemicelulózy. Hlavní nevýhodou této metody je nutnost nalézt specifické enzymy pro specifické substráty (Brusotti et al., 2011; Cesari et al., 2013).

Při extrakci hydrofilních sloučenin se používají polární rozpouštědla, jako jsou methanol, ethanol nebo ethylacetát. Pro extrakci lipofilnějších sloučenin se používá dichlormethan nebo směs dichlormethan/methanol v poměru 1:1 (Cos et al., 2006).

2.1.1.3 Další metody izolace biologicky aktivních sloučenin z rostlinných zdrojů

Chromatografie na tenké vrstvě (thin-layer chromatography, TLC) je jednoduchá, rychlá a levná metoda, která nám dává rychlou odpověď na to, kolik je jednotlivých složek ve směsi (Shahverdi, 2007). Vysoce účinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) je univerzální a velmi rozšířenou technikou pro izolaci přírodních produktů (Cannell, 1998). Další používanou metodou jsou imunologické testy (immunoassays) využívající monoklonální protilátky proti lékům a přírodním bioaktivním látkám s nízkou molekulovou hmotností. Tyto testy vykazují vysokou specifčnost a citlivost (Shoyama et al., 2006). Screeningový test fytochemikálií je jednoduchý, rychlý, levný a podává nám rychlou informaci o různých typech fytochemikálií ve směsi (Sasidharan et al., 2010). Infračervená spektroskopie s Fourierovou-transformací (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) se ukázala být cenným nástrojem pro charakterizaci a identifikaci sloučenin nebo funkčních skupin (chemických vazeb) přítomných v neznámé směsi rostlinných extraktů (Eberhardt et al., 2007; Hazra et al., 2007).

2.2 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látka je obecný termín pro léky, chemikálie nebo jiné látky, které ničí mikroorganismy nebo inhibují jejich růst (Hale et al., 2005). Mezi tyto látky řadíme antibiotika, chemoterapeutika, antivirotika (virostatika), antimykotika, antiparazitika aj. (Kramář, 2007). Tyto látky mohou být použity při léčbě nebo prevenci onemocnění způsobených mikroorganismy – bakteriemi, viry, houbami nebo parazity a také k ochraně různých materiálů před jejich růstem (Hale et al., 2005; Kramář, 2007).

Moderní éra antimikrobiální chemoterapie začala v roce 1929 Flemingovým objevem silné baktericidní látky, a to penicilinu, a v roce 1935 Domagkovým objevem sulfonamidů, syntetických chemikálií s širokou antimikrobiální aktivitou (Todar, 2008).

2.2.1 Antibiotika

První léčebné použití antibiotik bylo popsáno českými badateli Honlem a Bukovským v roce 1899. Jednalo se o antibakteriální látku izolovanou z kultury bakterie *Pseudomonas aeruginosa* nazvanou pyocyanáza. Roku 1929 byl penicilin izolován a purifikován a následně podán pokusným zvířatům, u kterých bylo zjištěno, že má pro ně neuvěřitelně nízkou toxicitu. Odstartovalo to intenzivní hledání podobného antimikrobiálního činidla s nízkou toxicitou pro zvířata, které by mohlo být užitečné při léčbě infekčních onemocnění. Spolu s biochemikem Ernstem Chainem a patologem Howardem Floreyem obdržel Alexander Fleming v roce 1945 Nobelovu cenu. Následně byl v padesátých letech 20. století izolován streptomycin, chloramfenikol a tetracyklin (Todar, 2008). Slovo antibiotikum poprvé použil Selman Waksman v roce 1941 s definicí jakékoliv malé molekuly vyprodukované mikrobenem, která antagonizuje růst jiných mikroorganismů (Lochmann, 1998).

Antibakteriální terapie je nezbytnou součástí moderních léčebných metod. V současné době je hlavním problémem zvyšující se odolnost mikroorganismů na užívaná antibiotika (Ferreira, 1998; Overbye a Barret, 2005). Naléhavě se proto hledají nové léčivé látky s antibakteriální aktivitou získané z přírodních zdrojů (Shan a Cai, 2008). Velký význam je přikládán biologicky aktivním látkám včetně antioxidantů z rostlin a jiných přírodních zdrojů (Tombola et al., 2003).

Hlavním úkolem antibakteriálních látek je zničit původce daného onemocnění – baktericidní účinek, nebo omezit jeho růst bez poškození hostitelského organismu – bakteriostatický účinek (Tab. I) (Lüllmann et al., 2004).

Tabulka I: Účinky důležitých antibakteriálních látek.

baktericidní	bakteriostatické
peniciliny	tetracykliny
cefalosporiny	makrolidy
kotrimoxazol (sulfonamid + diaminopyrydinn)	sulfonamidy
inhibitory gyrázy	trimetoprim
aminoglykosidy	
rifampicin	

Zdroj: převzato z Lüllmann et al., 2004.

2.2.2 Chemoterapeutika

Chemoterapeutika jsou chemicky syntetizované látky. Jedná se o polosyntetická antibiotika, v nichž je molekula produkovaná mikroblem následně modifikována chemikem, aby bylo dosaženo požadovaných vlastností (Hynie, 2001). Chemoterapeutika používaná v léčbě bakteriálních a protozoárních infekcí se nazývají sulfonamidy, další skupinou chemoterapeutik podávaných na léčení infekcí močových cest jsou inhibitory gyrázy nebo nitrofurany. Na obligatorně anaerobní bakterie účinně působí například metronidazol (Wenke et al., 1990).

2.2.3 Antivirotika

Antivirotika neboli virostatika se využívají k léčbě virových onemocnění. Mechanismus jejich účinku spočívá v blokování receptorů pro viry na cílových buňkách (virus nemůže proniknout do buňky) nebo v inhibování syntézy DNA či RNA viru. Nevýhodou terapie virostatiky je současné ovlivnění hostitelské buňky (Hynie, 2001). Virostatika jsou cílena hlavně proti herpetickým virům a viru lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus, HIV). Jelikož viry nemají vlastní metabolismus, je obtížné vyvinout takové virostatikum, které bude ovlivňovat virus selektivně bez zásahů do metabolismu infikovaných a zdravých buněk. Přesto bylo vyvinuto mnoho účinných

virostatik (Lüllmann et al., 2004). Mezi ta, která byla schválena pro klinické použití, patří amantadin, rimantadin, ribavirin, idoxuridin, trifluridin, vidarabin, acyclovir, ganciclovir, foscarnet, zidovudin, didanosin, zalcitabin, stavudin, famciklovir a valaciklovir (Růžek, 2011).

2.2.4 Antimykotika

Mykotická onemocnění jsou způsobena mikroskopickými houbami – mikromycetami, mezi něž patří především kvasinky a plísně. Nejčastější těžké systémové mykózy zahrnují kandidózu, aspergilózu, kryptokokózu a mukormykózu (Alangaden et al., 2002; Gavalda et al., 2005). Tabulka II ukazuje rozdělení antimykotik.

Tabulka II: Rozdělení antimykotik.

	Polyeonová	Azolová	Alylaminová	Morfolinová
Lokální	nystatin natamycin	Ekonazol Ketokonazol Oxikonazol Mikonazol Bifonazol Kiotrimazol	terbinafin naftifin	ammorolfin
Celková	amfotericin B	Flukonazol Itrakonazol Mikonazol Ketokonazol Vorikonazol Posakonazol Kaspofungin anidulafungin	terbinafin	

Zdroj: převzato z Lüßmann et al., 2004.

Následující pasáž o rozsahu 15 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

2.6 Viry

Viry představují velice heterogenní skupinu mikroorganismů od nejjednodušších pikornavirů (průměr 20 nm) přes složené velké poxviry (průměr cca 250 nm) až po obří mimiviry (průměr cca 400 nm). Existence velkého počtu virů si vyžádala jejich systematické rozčlenění. V roce 1966 byla na Mezinárodním mikrobiologickém kongresu v Moskvě založena Mezinárodní komise pro nomenklaturu virů, později přejmenovaná na Mezinárodní komisi pro taxonomii virů (International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV) (Růžek, 2012).

Viry jsou charakterizovány typickými vlastnostmi, kterými se liší od buněčných organismů. První typickou vlastností je odlišný charakter jejich genetického materiálu – genom všech organismů je tvořen výhradně molekulou DNA, u virů to může být RNA nebo DNA. Kromě toho nukleová kyselina může být jednořetězcová i dvouřetězcová, kruhová, lineární nebo fragmentovaná. Dalším typickým znakem je specifický typ parazitismu; zatímco jiní parazité napadají organismy na úrovni buňky nebo organismu, viry jsou parazité na úrovni genetické a biochemické, neboť v infikované buňce přebírají informační a řídicí funkce. Všechny organismy, včetně těch nejjednodušších, obsahují vlastní výbavu k syntéze bílkovin, ale u virů proteosyntetický aparát chybí a virové bílkoviny jsou syntetizovány pomocí aparátu hostitelské buňky. V neposlední řadě je známo, že viry postrádají buňku jako základní stavební a funkční útvar, mluvíme tedy o nebuněčné formě života (Růžek, 2012).

2.6.1 Flaviviry

Rod Flavivirus patří do čeledi *Flaviviridae* zahrnuje více než 70 identifikovaných virů. Čeleď *Flaviviridae* je pojmenovaná podle svého prototypového zástupce viru žluté zimnice (z latiny *flavus* = žlutý) (Burke a Monath, 2001). Flaviviry jsou malé (50 nm) sférické částice obsahující kapsidu o velikosti cca 30 nm obklopenou membránou (Murphy, 1995). Na povrchu virových částic lze nalézt dva virové proteiny, E (envelope) a M (membrane). E glykoprotein je hlavní antigenní determinant virových částic, který zprostředkovává vazbu viru na buňku a následnou fúzi endozomu. M protein je proteolytický fragment proteinu prM vznikající při zrání virových částic. Genomy flavivirů se skládají z jednoho pozitivního řetězce RNA o velikosti přibližně 11 kb (Cleaves a Dubin, 1979; Heinz a Allison, 2003; Wengler et al., 1978).

Většina zástupců rodu Flavivirus patří mezi arboviry. Arboviry jsou rozsáhlou skupinou obalených RNA virů primárně přenášených vektory z kmene členovců. Název arboviry pochází z anglického názvu arthropode-borne virus – členovci přenášený virus (Heinz a Allison, 2000). Podle vektoru přenosu dělíme flaviviry do tří skupin: viry přenášené klíšťaty, viry přenášené komáry a viry bez známého vektoru. K virům přenášeným klíšťaty patří virus klíšťové encefalitidy, virus omské hemoragické horečky, virus vrtivky, virus Negishi, virus Langat, virus Powassan a další (Gritsun et al., 2003). Viry z této skupiny jsou přenášeny do konečného hostitele ve slinách klíšťat. Do skupiny virů přenášených komáry řadíme např. virus japonské encefalitidy, virus horečky dengue, virus žluté zimnice atd. (Murphy et al., 1995), které jsou do lidského těla transportovány ve slinách komárů. Mezi viry bez známého vektoru patří virus Entebbe, Modoc a Rio Bravo (Kuno et al., 1998; Růžek, 2011).

2.6.1.1 Virus klíšťové encefalitidy

Teprve v minulém století se změnil pohled na klíšťata. Z nepříjemných, krev sajících parazitů se stali parazité, kteří jsou schopni vyvolat v lidském těle vážná onemocnění přenášením bakterií, virů a prvoků. Klíšťata jsou členovci parazitující na obratlovcích téměř ve všech částech světa. V současné době jsou klíšťata považována za jedny z nejvýznamnějších vektorů lidských infekčních onemocnění na světě (Chambers a Monath, 2003; Kerles, 2015). Virus klíšťové encefalitidy byl poprvé izolován a prokázán jako původce klíšťové encefalitidy roku 1937 v Rusku, zatímco původce lymské boreliózy (*Borrelia burgdorferi*) byl identifikován až v osmdesátých letech dvacátého století v USA (Kerles, 2015).

Virus klíšťové encefalitidy je taxonomicky členěn na tři antigenní subtypy, jež odpovídají třem genotypům – evropský subtyp (s kmenem Neudoerfl jako svým prototypem) vyskytující se převážně v Rakousku, Švýcarsku, Francii, Německu, Maďarsku, České republice, Slovensku, Chorvatsku, Finsku, Bělorusku a v evropské části Ruska; dálnovýchodní subtyp (prototypovým kmenem je Sofjin), vyskytuje se ve východní části Ruska, v Číně, Japonsku, Litvě, na Ukrajině a v evropské části Ruska; sibiřský subtyp (prototypovými kmeny jsou Vasilchenko a Zausaev) se vyskytuje v asijské části Ruska (Demina et al., 2010, Demina et al., 2012; Ecker et al., 1999).

V případě evropského subtypu je hlavním vektorem druh *Ixodes ricinus* (klíště obecné), v případě dálnovýchodního subtypu a sibiřského subtypu jde o druh *I. persulcatus*

(klíště sibiřské), na přenosu klíšťové encefalitidy se ale podílejí i další druhy klíšťat. Lidé se obvykle nakazí sáním infikovaného dospělého klíštěte popř. nymfy nebo ve vzácných případech konzumací nepasterizovaného mléka nebo sýru z nakažených koz a ovcí, které se mohou rovněž nakazit od klíštěte a vylučovat virus do mléka v průběhu viremické fáze (Burke a Monath, 2001).

2.6.1.2 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida (tick-borne encephalitis, TBE) je jednou z nejnebezpečnějších lidských neuroinfekcí vyskytujících se v Evropě a v mnoha částech Asie (Gritsun et al., 2003). Klíšťová encefalitida způsobená evropskými kmeny má dvoufázový průběh (Haglund a Gunther, 2003). První, viremická fáze má charakter lehké chřipky (bolesti hlavy, nucení na zvracení, slabost, zvýšení tělesné teploty), přičemž u některých pacientů tato fáze nemusí vůbec probíhat. K nástupu druhé fáze, během níž se rozvíjí meningitida, meningoencefalitida nebo encefalomyelitida, dochází ve 20–30 % případů. Průběh bývá mírný, fatální následky nastávají u méně než 1 % pacientů. Bohužel může docházet i k dlouhotrvajícímu zdravotnímu postižení, jako je ochrnutí. Dlouhotrvající ochrnutí se může objevit až u 6 % lidí s TBE (Gritsun et al., 2003).

Léčba TBE

Léčba TBE je výhradně symptomatická, jelikož v současné době neexistuje žádná specifická léčba (Robertson et al., 2009). Vzhledem k této skutečnosti je prevence tohoto onemocnění nesmírně důležitá. Většinou efektivní a široce používané vakcíny obsahují inaktivované virové částice nebo části viru (E protein). V Evropě existují 2 vakcíny, které jsou široce používány – FSME-IMMUN (od společnosti Baxter) a ENCEPUR (od společnosti Novartis) (Ecker, 1999; Růžek, 2011). Tyto vakcíny se ukázaly být velmi účinné, v celé Evropě se podávají jako prostředek primární prevence (Gritsun et al., 2003).

Prevence TBE

Nakažení TBE lze zabránit vyhýbáním se oblastem, ve kterých se choroba vyskytuje i nepasterizovaným mléčným výrobkům. Při chůzi v postižených zalesněných venkovských oblastech se doporučuje nosit dlouhé kalhoty na pokrytí odhalené kůže. Použití repelentu je

také účinným ochranným prostředkem proti klíšťatům. Tělo bychom si měli kontrolovat pravidelně a přisátá klíšťata odstranit co nejdříve (Vilibić-Čavlek, 2014).

2.7 Bakterie

Bakterie, jednobuněčné prokaryotické organismy, jsou pro svou jednoduchost, možnost studia za konstantních podmínek a krátkou generační dobu velmi vhodným modelem pro studium základních biologických otázek týkajících se především metabolismu a molekulární podstaty dědičnosti. Na bakteriích lze poměrně přesně specifikovat a vysvětlit základní znaky biologické formy pohybu a jejich molekulární podstatu.

Bakterie se rozmnožují příčným dělením, pučením nebo konjugací. U některých druhů se tvoří tzv. spora, která je odolná proti nepříznivým podmínkám (v tomto stadiu se nemnoží). Tvar a velikost bakteriálních buněk se liší a kolísá podle druhů bakterií. Podle Gramova barvení dělíme bakterie na grampozitivní (G⁺) a gramnegativní (G⁻). Mechanismus barvení se vysvětluje rozdíly v permeabilitě buněčných stěn G⁺ a G⁻ bakterií. G⁺ bakterie zadržují komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně a neodbarvují se organickými rozpouštědly – výsledné zbarvení je modré, kdežto u G⁻ se tento komplex z buněčné stěny vymývá – výsledné zbarvení je červené.

Z hlediska výskytu jsou bakterie kosmopolitní. Značná část patogenních mikroorganismů způsobujících závažná onemocnění patří mezi bakterie (Rozsypal et al., 1981).

2.7.1 Klíšťaty přenášené bakterie

Ke konci 20. století bylo zjištěno, že klíště nehraje roli jen jako vektor, ale také jako rezervoár klíšťaty přenášených bakterií – bakterií z čeledi *Rickettsiaceae* – např. *Rickettsia prowazekii* způsobující tzv. skvrnitě horečky, bakterií z čeledi *Spirochaetaceae* – *Borrelia burgdorferi* sensu lato způsobující lymskou boreliózu a bakterií z čeledi *Francisellaceae* – *Francisella tularensis* způsobující onemocnění zvané tularémie. V těchto případech jsou bakterie přenášeny mezi jednotlivými stádii (z larev na nymfy a dospělé) a také transovariálně (přenos bakterií z infikovaných samiček klíšťat na potomstvo prostřednictvím vajíček). Velmi vzácně se klíšťata bakterií nakazí při tzv. „cofeedingu“ (sousání), to znamená, že několik klíšťat saje na hostiteli v těsné blízkosti a tudíž může dojít k přímému šíření bakterií z

infikovaného klíštěte na neinfikované (Labuda et al., 2006; Murray et al., 2016; Raoult a Roux, 1997).

2.7.1.1 *Rickettsia prowazekii*

Rickettsia prowazekii je gramnegativní intracelulární bakterie. Tato bakterie vyvolává onemocnění nazývané skvrnitý tyfus. Jedná se o nebezpečné infekční onemocnění, které se dnes v České republice již nevyskytuje, historicky se však jednalo o velmi obávanou chorobu. Skvrnitý tyfus se po staletí šířil nejčastěji v místech, kde se shromažďovalo příliš mnoho lidí a kde vládly špatné hygienické podmínky. Bakterie je přenášena vši šatní, blechami, roztoči nebo klíšťaty. Když se bakterie dostane do organismu, může napadnout nervový systém, srdce nebo kůži. Právě na kůži se tvoří typický skvrnitý ekzém (Andersson a Andersson, 1997; Rozsypal et al., 1981).

Nejvirulentnějšími druhy bakterií z čeledi *Rickettsiaceae* jsou *R. rickettsii* (způsobuje skvrnitou horečku, tzv. horečku Skalických hor) a již zmíněná *R. prowazekii*. Mezi klíšťaty přenášené druhy dále patří – *R. burneti*, *R. conorii*, *R. siberica* a *R. africae*. Ke komplikacím, které zhoršují průběh onemocnění, patří lymfadenitida, zápal plic a meningitida (Murray et al., 2016; Parola et al., 2005).

2.7.1.2 *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je intracelulární gramnegativní bakterie způsobující akutní infekční onemocnění zvané tularémie, obvykle charakterizované kožními vředy, záněty spádových mízních uzlin, sepsí a někdy atypickým zápalem plic. *F. tularensis* se řadí mezi aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru, které se na člověka přenáší od volně žijících zvířat, zejména hlodavců, zajíců a králíků. K nákaze dochází přímým kontaktem s nakaženým zvířetem, vdechnutím kontaminovaného prachu nebo požitím kontaminované potravy a vody. K přenosu může dojít i prostřednictvím klíštěte či bodavého hmyzu (Dennis et al., 2001; Staples et al., 2006). Existují 4 poddruhy *F. tularensis* – *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), vysoce virulentní u lidí a zvířat; *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B), méně virulentní typ; *F. tularensis* subsp. *novicida*, také méně virulentní typ a *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, který se rovněž vyznačuje nízkou virulencí (Sjöstedt et al., 2005).

2.7.1.3 *Borrelia burgdorferi*

Borelie jsou mikroaerofilní, gramnegativní spirochéty vyznačující se dlouhým spirálovitě vinutým tělem (o rozměrech 0,2 um x 4–30 um) s nepravidelnými závity (Charon a Goldstein, 2002; Rozsypal et al., 1981). Pohyb umožňuje 7 – 11 bičíků v závislosti na druhu borelie. Borelie obsahují atypický lineární chromozom a vysoký počet cirkulárních a lineárních plazmidů (různé kmeny mají odlišný počet plazmidů). Roku 1982 byl poprvé izolován původce lymfské boreliózy z klíštěte *I. scapularis* Burgdorferem a Barbourem (Burgdorfer et al. 1982). Roku 1984 byla tato bakterie pojmenována po svém objeviteli *Borrelia burgdorferi* (Fraser et al., 1997; Johnson et al., 1984).

Doposud bylo identifikováno 20 příbuzných druhů (popis nových druhů stále pokračuje) *B. burgdorferi* souhrnně označovaných jako komplex *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.), zpočátku identifikován jako jeden druh) – mezi tyto druhy způsobující lymfskou boreliózu řadíme – *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii* (Baranton et al., 1992; Canica et al., 1993), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997), *B. lusitaniae* (Levy et al., 1993), *B. bissetti* (Postic et al., 1998), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. turdii* (Fukunaga et al., 1996b; Masuzawa et al., 2001), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. spielmanii* (Richter et al., 2004), *B. yangtze*, *B. americana*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. kurtenbachii*, *B. bavariensis*, *B. chilensis* a *B. finlandensis* (Casjens et al., 2011; Ivanova et al., 2013; Kerles, 2015; Margos et al., 2011; Rudenko et al., 2011).

Donedávna se předpokládalo, že pouze tři druhy jsou asociovány s lymfskou boreliózou u lidí – *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii*. Na základě molekulárních analýz se zjistilo, že lymfskou boreliózu u lidí vyvolávají další tři druhy – *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* a *B. bissetti* (Collares-Pereira et al., 2004; Rudenko et al., 2009).

Mezi druhy způsobující návratnou horečku řadíme – *B. latyschevi*, *B. hispanica*, *B. persica*, *B. crocidurae*, *B. venezuelensis*, *B. mazzotti*, *B. parker*, *B. turicatae*, *B. miyamotoi*, *B. duttonii*, *B. parceria*, *B. hermsii* a *B. recurrentis* (Barbour, 2014; Forrester et al., 2015).

2.7.2 Lymfská borelióza

Lymfská borelióza je souhrnný termín, který se používá pro označení všech klinických příznaků způsobené infekcí bakterií z komplexu *B. burgdorferi* s.l.. Projevy a rozsah infekce závisí do značné míry na druhu borelie, kterou je člověk infikován. *B. burgdorferi* s.s.

způsobuje především artralgie a artritidu velkých kloubů (Bartůněk et al., 1996; Steere et al., 1987), druh *B. afzelii* je charakteristický kožními projevy – *erythema migrans* (vzniká v místě přisátí klíštěte), boreliový lymfocytom a *acrodermatitis chronica atrophicans* (Balmelli a Piffaretti, 1995), *B. garinii* může způsobit postižení nervového aparátu (Logigian et al., 1990).

Lymfská borelióza byla poprvé popsána v městečku Old Lyme v USA v roce 1977. K infekci dochází v naprosté většině po přisátí klíštěte (nejčastěji *I. ricinus* a *I. scapularis*). Borelie nepřenáší jen dospělá klíšťata, ale i larvy a nymfy, které jsou malé a obtížně rozpoznatelné na kůži (Anderson et al., 1990; Danielová et al., 2010; Kurtenbach et al., 1995; Kurtenbach et al., 1998; Scott et al., 2010). Jelikož se lymfská borelióza vyznačuje širokým spektrem klinických příznaků, které mohou být snadno zaměněny, stále více je zdůrazňován význam laboratorních vyšetřovacích metod k upřesnění klinické diagnózy – ELISA, Western-blotting, nepřímá fluorescence, PCR atd. (Bartůněk et al., 1996).

Léčba lymfské boreliózy je antibiotická a měla by být zahájena jen v případě jasné klinické formy a laboratorní diagnostiky. Antibiotikem první volby bývá doxycyklin (Wormser et al., 2000). V současné době není k dispozici aktivní ani pasivní imunizace, proto prevence spočívá pouze v ochraně před klíšťaty a jejich včasném odstranění.

2.7.3 Standardní kmeny bakterií

2.7.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní, fakultativně anaerobní nesporelující bakterií kokovitého tvaru patřící do rodu stafylokoků. Tuto bakterii nazývanou také jako zlatý stafylokok objevil v roce 1880 skotský chirurg Alexander Ogston v hnisu otevřených ran. *S. aureus* je běžným komenzálem na pokožce a sliznicích přibližně u 10 až 30 % lidské populace, který nevyvolává žádné potíže. Pokud dojde k oslabení imunitního systému hostitele je *S. aureus* schopen vyvolat různá onemocnění (nejčastěji hnisavá) od lehčích zánětů kůže a sliznic přes toxické dermatitidy, pneumonie, abscesy, záněty vnitřních orgánů (endokarditida, osteomyelitida atd.) až po život ohrožující sepse a celková selhání organismu. Je také považován za jednoho z nejvýznamnějších původců alimentárních intoxikací. U člověka se vyskytuje 16 druhů stafylokoků, přičemž *S. aureus* je nejvirulentnější (Eley et al., 1996; Rozsypal et al., 1981; Votava et al., 2003; Wertheim et al., 2005).

V období před objevením antibiotik měly invazivní infekce způsobené tímto stafylokokem většinou fatální následky. Úspěšnost léčby stafylokokových onemocnění se zavedením penicilinu do klinické praxe výrazně stoupla. Brzy se však objevily první rezistentní kmeny k betalaktamovým antibiotikům (penicilinům, cefalosporinům). Bylo proto nutné vyvinout nové antibiotikum na bázi penicilinu, které bude odolné vůči degradaci enzymem betalaktamázou. Jako první z těchto látek byl v roce 1960 vyvinut meticilin. Netrvalo však dlouho a byly izolovány rezistentní kmeny i k tomuto antibiotiku. Tyto kmeny se začaly souhrnně označovat jako meticilin-rezistentní zlatý stafylokok (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (Panlilio et al., 1992; Pantosti et al., 2007).

2.7.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis je grampozitivní bakterie považována za součást fyziologické mikroflóry člověka (převážně kůže), před lety se však ukázal být důležitým původcem zejména nozokomiálních nákaz u oslabených jedinců (Otto, 2013). Často ho nalézáme v souvislosti s umělými materiály ponechávanými delší dobu v organismu, jako jsou chlopenní náhrady, kloubní protézy, nitrožilní kanyly apod. Vyvolává nozokomiální bakteriémie, peritonitidy (při peritoneální dialýze), infekce operačních ran a močových cest. Tyto infekce se mnohdy těžko zvládají, protože bývají často vyvolány multirezistentními kmeny (Otto, 2009).

2.7.3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která je běžným komenzálem tlustého střeva teplokrevných živočichů. Poprvé byla popsána v roce 1885 Theodorem Escherichem jako *Bacterium coli*, kterou izoloval ze stolice novorozenců (Kaper, 2005). Později byla přejmenována na *Escherichia coli*. Většina kmenů *E. coli* je pro člověka prospěšná, jelikož produkují řadu látek bránících kolonizaci patogenních bakterií nebo se podílejí na tvorbě některých vitamínů (vitamínů B1, K1 a K2). Gastrointestinální trakt je kolonizován *E. coli* již několik hodin po narození. Nicméně některé kmeny *E. coli* jsou patogenní a mohou způsobit vážná onemocnění (Manning et al., 2005; Votava, 2005; Zbořil, 2005). Onemocnění způsobené *E. coli* mohou být přenášena prostřednictvím kontaminované vody nebo potravin (syrové maso nebo nedostatečně tepelně upravené výrobky z masa, syrové mléko, kontaminovaná syrová zelenina), kontaktem se zvířaty (zejména krávy, ovce, kozy) nebo výkaly infikovaných lidí. *E. coli* může být zničena při důkladné tepelné přípravě pokrmů,

pokud všechny součásti pokrmu dosáhnou teploty 70 °C nebo vyšší (Sussman, 1997; Votava, 2005).

Přehled patogenních kmenů: Enteropathogenic *E. coli*, EPEC – enteropatogenní (enteritidy novorozenců a kojenců); Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC – enterotoxigenní (cestovatelské průjmy); Enteroinvasive *E. coli*, EIEC – enteroinvasivní (hemoragicko-ulcerózní kolitida); Enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC – enterohemoragický (krvavé průjmy) (Kaper, 2005; Zbořil, 2005).

Z hlediska objasnění základních aspektů regulace genové exprese patří *E. coli* k nejlépe prostudovaným mikroorganismům (Kaper, 2005) a díky tomu slouží vědcům jako důležitý modelový mikroorganismus (Votava, 2005).

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Určení maximálních tolerovaných koncentrací vybraných látek izolovaných z rostlinného materiálu a jiných molekul v použitém *in vitro* systému (buněčná linie glioblastů).
- 2) Detekce antivirotických účinků u studovaných látek proti viru klíšťové encefalitidy.
- 3) Určení antibakteriálních účinků u testovaných látek proti standardním kmenům bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*) a proti vybraným kmenům bakterie *Borrelia burgdorferi*.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné linie

Při pokusech byly používány s ohledem na prováděnou metodu dvě buněčné linie. První kultura buněk (odvozená od podpůrných buněk neurálního původu) je označovaná jako buněčná linie glioblastů. Druhá buněčná linie je nazývána buněčná linie PS (porcine kidney stable). V laboratoři byly po celou dobu výzkumu dodržovány zásady aseptické práce. Veškerá práce s buňkami probíhala v boxu s laminárním prouděním.

Buněčné linie byly udržovány tzv. pasážemi. Po namnožení buněk v kultivačních lahvích následovalo jejich naředění a přenesení do nových kultivačních nádob s čerstvým médiem, čímž došlo ke vzniku tzv. sekundární kultury. Buňky v sekundární kultuře se pěstovaly tak dlouho, dokud nebylo získáno dostatečné množství materiálu pro pokus.

4.1.2 Roztoky a živná média

PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS):

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; doplněno do 1 l destilovanou vodou.

DIMETHYLSULFOXID (DMSO):

C₂H₆SO, čirá kapalina, charakteristického zápachu o koncentraci min. 99,9 %.

CARBOXYMETHYL CELLULOSE (CMC):

3% roztok karboxymethylcelulózy.

NAFTALENOVÁ ČERNĚ:

1g naftalenové černě; 60 ml ledové kyseliny octové; 13,6 g octanu sodného; doplněno do 1 l destilovanou vodou.

TRYPANOVÁ MODŘ:

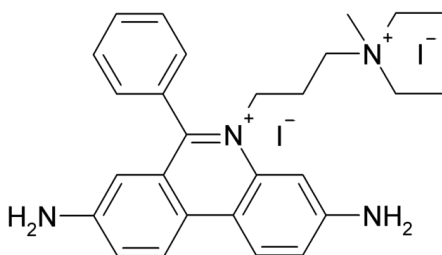
C₃₄H₂₄N₆NA₄O₁₄S₄, 0,4% roztok trypanové modři.

TRYPsinIZAČNÍ SMĚS:

0,02% trypsin + 0,02% EDTA v PBS.

PROPIDIUM IODID (PI):

Roztok propidium jodidu připravený pro přímé použití (Bio-Rad).



Obrázek 17: Struktura PI.

FYZIOLOGICKÝ ROZTOK:

9 g NaCl na 1 l destilované vody.

KULTIVAČNÍ MÉDIUM PRO BUNĚČNOU LINII GLIOBLASTŮ (Iscove's Modified Duplecco's Medium, IMDM):

IMDM médium, 10% fetální hovězí sérum, 1% směs antibiotik (všechno Biowest) – amfotericin B 0,25 µg/ml; penicilin G 100 units/ml; streptomycin 100 µg/ml a 1% glutamin.

KULTIVAČNÍ MÉDIUM PRO BUNĚČNOU LINII PS (Leibovitz's L-15 Medium):

L-15 médium, 3% prekolostrální sérum, 1% směs antibiotik (všechno Biowest).

2 x L-15 MÉDIUM:

2x L-15 médium, 6% prekolostrální sérum, 2% směs antibiotik (všechno Biowest).

KULTIVAČNÍ MÉDIUM PRO *BORRELIA BURGENDORFERI* (Barbour-Stoenner-Kelly II medium, BSK-II):

10 x CMRL 9,7 g/l (US Biological); neopepton 5 g/l (Sigma-Aldrich); hovězí sérový albumin 50 g/l (Millipore); kvasničný extrakt 2 g/l (BD Biosciences); HEPES 6 g/l (Calbiochem); glukóza 5 g/l; citrát sodný 0,7 g/l; pyruvát sodný 0,8 g/l; N-acetylglukosamin 0,4 g/l; hydrogenuhličitan sodný 10 g/l; 6% králičí sérum (všechno Sigma-Aldrich).

CASO MÉDIUM:

vyrobena z CASO agaru – pepton z kaseinu 15g/l; sójový pepton 5g/l; chlorid sodný 5g/l; agar 15g/l.

4.1.3 Virus klíš'ové encefalitidy

Pro infekci tkáňové kultury byl použit méně virulentní kmen TBE, kmen Neudoerfl. Vir byl uchováván v alikvotech po 200 µl při –80 °C. Manipulace s virem probíhala v boxu s laminárním prouděním v laboratoři 2. úrovně biologické bezpečnosti BSL2 (Biosafety Level 2).

4.1.4 Kmeny bakterií

Standardní kmeny

- *Staphylococcus aureus* kmen ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* kmen ATCC 35984/ RP62A
- *Escherichia coli* kmen Seattle 1946 ATCC 25922

Borrelia burgdorferi s.l.

- *Borrelia burgdorferi* s.s. kmen B31
- *Borrelia burgdorferi* s.s. kmen 297
- *Borrelia garinii* kmen PBI
- *Borrelia afzelii* kmen CB43
- *Borrelia finlandensis* kmen SV1

Následující pasáž o rozsahu 2 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

4.2 Metody

Následující pasáž o rozsahu 8 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující pasáž o rozsahu 15 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

6 ZÁVĚR

Následující pasáž o rozsahu 1 strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Následující pasáž o rozsahu 15 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU