

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Antifungální aktivita extraktů a silic medicánálního konopí
proti vybraným plísním způsobující kožní onemocnění**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Zdeňka Kahánková

Obor studia: Rostlinná produkce

Vedoucí práce: Ing. Adéla Fraňková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antifungální aktivita extraktů a silic medicínálního konopí proti vybraným plísním způsobující kožní onemocnění" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce paní Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. a konzultantce paní Ing. Anežce Janatové za vstřícný přístup a cenné rady při konzultacích.

Antifungální aktivita extraktů a silic medicinálního konopí proti vybraným plísním způsobující kožní onemocnění

Souhrn

V současné době trpí plísníovými onemocněními 20-25 % populace. Houbové infekce kůže a nehtů tvoří nejpočetnější a nejrozšířenější skupinu všech mykóz. Hlavními zástupci původců těchto onemocnění jsou antropofilní a zoofilní dermatofyty z rodů *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Vzhledem ke zvyšující se mikrobiální rezistenci vůči konvenčně užívaným antibiotikům je nutné hledat nové způsoby léčby. Je známo, že konopí má velký potenciál při léčbě nejen kožních onemocnění a v mnoha státech je jeho používání v lékařství již legální.

Na třech kmenech výše zmíněných rodů dermatofytů byla testována antifungální aktivita extraktů ze sedmi chemotypů konopí a byla testována i silice z nejvoňavějšího chemotypu. K porovnání účinnosti byl použit griseofulvin. Pro testování byla použita modifikovaná mikrodiluční metoda s následnou makrodiluční metodou.

Dle výsledků bylo zjištěno, že všechny testované konopné extrakty a silice by mohly být využity v terapii mykotických onemocnění.

Nejvyšší citlivost vůči testovaným látkám vykazoval mikroorganismus *Microsporum canis*, na který působil fungicidně extrakt z chemotypu Conspiracy Kush a Nurse Jackie. Tato aktivita byla pozorována při koncentraci testované látky 128 µg/ml. Nejnižší antimykotický účinek byl pozorován u patogenu *Epidermophyton floccosum*.

Závěrem lze konstatovat, že konopí by mohlo být vhodné pro terapii mykóz způsobených testovanými patogeny.

Klíčová slova: extrakty, konopí, onemocnění kůže, protiplísníový, silice

Antifungal activity of extracts and essential oils from medicinal cannabis against selected fungi which cause skin diseases

Summary

Currently 20-25% of the population suffers from fungal diseases. Deep fungal skin and nail infections are the most numerous and most widespread group of all mycoses. The main representatives of these diseases are the anthropophilic and zoophilic dermatoses of the genera *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. Due to increasing microbial resistance to conventionally used antibiotics, it is necessary to seek new treatments. It is well known that cannabis has a great potential in the treatment of not a just skin diseases and its use in many countries is already legal.

Antifungal activities of extracts from seven cannabis chemotypes and from the most fragrant chemotype of essential oil were tested on three strains above-mentioned genes of dermatophytes. Griseofulvin was used to compare the efficiency. For testing was used modified microdilution method followed by a macrodilution method.

According to the results, all tested cannabis extracts and essential oils could be used in the therapy of mycotic diseases.

Highest sensitivity to the test substances showed microorganism *Microsporum canis*. Chemotype Conspiracy Kush and Nurse Jackie has most significant antifungal effect. This activity was observed during concentration of test substance 128 µg/ml. The lowest antifungal effect was observed in the pathogen *Epidermophyton floccosum*.

In conclusion, cannabis could be applicable for the treatment of mycosis caused by tested pathogens.

Keywords: antifungal, essential oils, extracts, cannabis, skin diseases

Obsah

1	Úvod	1
2	Hypotéza a cíl práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Historie konopí.....	3
3.2	Popis rostliny.....	4
3.2.1	Kanabinoidy.....	6
3.2.2	Terpeny	7
3.2.3	Ostatní látky	10
4	Mykózy	12
4.1	Význam mykotických onemocnění	12
4.2	Formy mykopatogenů	14
4.3	Dělení dermatofytóz	15
4.3.1	Tinea capitis	15
4.3.2	Tinea faciei a tinea corporis.....	15
4.3.3	Tinea pedis	16
4.3.4	Tinea unguium	16
5	Reakce imunitního systému a možnosti terapie	17
5.1	Antimykotika.....	19
5.1.1	Specifická antimykotika	19
5.1.2	Nespecifická antimykotika	21
5.2	Antifungální rezistence a její mechanismy	21
5.3	Látky testované na antifungální aktivitu	22
5.3.1	Epigalokatechin galát (EGCG).....	22
5.3.2	Kurkumin	22
5.3.3	Terpeny	22
6	Experimentální část	24
6.1	Rostlinný materiál	24
6.2	Testované plísně.....	25
6.3	Testování antifungální aktivity pomocí mikrodiluční metody.....	25
6.3.1	Příprava inokula.....	25
6.3.2	Mikrodiluční metoda.....	26
7	Výsledky	29
7.1	Extrakt 1	33

7.2	Extrakt 2	34
7.3	Extrakt 3	35
7.4	Extrakt 4	37
7.5	Extrakt 5	38
7.6	Extrakt 6	39
7.7	Extrakt 7	41
7.8	Silice.....	42
7.9	Antibiotikum rozpuštěné v DMSO	43
7.10	Antibiotikum rozpuštěné v lihu.....	45
8	Diskuze.....	47
9	Závěr	50
10	Seznam použité literatury	51
11	Seznam použitých zkratek	58
12	Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	60

1 Úvod

V současné době trpí plísňovými onemocněními velká část populace. Jedná se o primární anebo sekundární onemocnění. V době globalizace dochází mj. i k rozšiřování těchto onemocnění.

Houbová infekce kůže a nehtů tvoří nejpočetnější a nejrozšířenější skupinu všech mykóz. Výskyt povrchových mykotických infekcí se v posledních desetiletích zvýšil a kožní mykóza nyní postihuje více než 20-25 % světové populace. Hlavními zástupci původců těchto onemocnění jsou antropofilní a azofilní dermatofy z rodů *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Z nedermatofytů je hlavním zástupcem rod *Candida*.

Díky intenzivnímu používání antifungálních léků se významně zvyšuje frekvence mikrobiální rezistence vůči používaným léčebným prostředkům. Velké množství klinicky předepisovaných preparátů se vyznačuje rozsáhlými nežádoucími účinky a užívání některých z nich je kontraindikováno (např. v těhotenství). V rámci léčby se kombinace dvou či více antifungálních léčiv ukázala jako nevyhovující rovněž pro možné vedlejší nežádoucí a toxické účinky na organismus. V poslední době jsou prováděny výzkumy a vývoj nových antimikrobiálních látek z různých zdrojů pro boj s mikrobiální rezistencí. Předmětem výzkumu jsou různé přírodní látky, které mohou být samy látkami s antifungální aktivitou anebo mohou představovat adjuvanty prostředků s antimikrobiálními účinky. Potencování antimikrobiální aktivity těchto látek může být dosaženo různými mechanismy.

Z přírodních látek jsou zkoumány esenciální oleje získané z rostlin. Monitoruje se aktivita jednak kompletních směsí, ale i antifungální aktivita jednotlivých látek, které tyto směsi obsahují. Mezi rostliny přitahující zájem vědců patří i *Cannabis sativa*. U této rostliny bylo detekováno přes 1000 látek. Prospěšnost léčebného konopí při terapii kožních onemocnění umocňuje i jeho zařazení do vyhlášky č. 236/2015, o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití, ve které je mezi indikacemi uvedena i povrchová léčba dermatóz a slizničních lézí.

Extrakty anebo silice z konopí by mohly být zahrnuty do podrobnějšího studia při testování jejich antifungální aktivity vůči vybraným patogenům.

2 Hypotéza a cíl práce

Hypotéza: extrakty z konopí potlačují růst dermatofytů.

Cílem práce je popsat nejčastěji se vyskytující plísňová onemocnění kůže, a také shrnout dostupné informace o použití konopí k léčbě kožních onemocnění. Dále experimentálně ověřit aktivitu extraktů a silic vybraných chemotypů konopí proti vybraným plísním vyskytujících se na lidské kůži.

3 Literární přehled

3.1 Historie konopí

Užívání konopí sahá hluboko do historie. Datuje se období až 10 000 let př. n. l. (Miovský et al., 2008). Někteří autoři uvádí její využití jako přadné rostliny do doby před 18 000 lety na území dnešní Moravy (Hanuš, 2012). Geografické průzkumy ukazují, že teplomilné konopí pochází z oblastí stepí Střední Asie, konkrétně Mongolska a Jižní Sibiře. Dále se pak šířilo do oblastí Číny, kdy první dokumentovaný nález konopí užitého jako léčiva je datováno do období až 4 000 let př. n. l. Bylo použito jako anestetikum při chirurgické operaci.

Konopí se poté šířilo do Koreje a Japonska (asi 2 000 let př. n. l.). V důsledku válečných tažení a bojů na asijském kontinentu se konopí dostalo Hedvábnou stezkou na Blízký východ a do východní Evropy (Warf, 2014).

Z Himalájí bylo konopí přeneseno do Indie, kde pěstování konopí a užívání marihuany zažilo největší rozkvět a tato dlouhá tradice přetrvává dodnes. V indické posvátné knize Atharvaveda je konopí zmiňováno jako jedna z pěti královských rostlin zbavující úzkosti a bránící onemocnění (Warf, 2014).

Asijský kočovný kmen Skythů se usadil asi v 8. století př. n. l. ve stepní části Krymu a při Azovském pobřeží (dnešní Ukrajina). Přes řecké kolonie na pobřeží Černého moře měli kontakt na civilizaci starověkých Řeků. Skythy zmiňuje řecký filozof a historik Hérodotos z Halikarnassu, který popisuje konopí, které se pěstuje v zemi skythské a při neznalosti si jej lze splést s jinou přadnou rostlinou a to lnem. Lze říci, že ve středověku bylo konopí rozšířené po celém světě.

Po objevení Ameriky bylo konopí z Evropy dovezeno jako přadná rostlina. Spolu s dovozem otroků z Afriky proniká do Ameriky jako látka s účinky na psychiku. Užívání konopí se zvýšilo i tím, že se rozšířila forma užívání kouřením.

V roce 1899 byla izolována první kanabinoidní látka a následně byla pojmenována jako cannabinol. Její struktura byla určena až v roce 1932 (Hanuš, 2012). V roce 1954 na Vědecké konferenci vysokých škol v Olomouci se uskutečnily přednášky na téma Konopí jako lék (Warf, 2014).

V roce 1955 Jan Kabelík, Zdeněk Krejčí a František Šantaj izolovali první kanabinoidní kyselinu, kyselinu kanabidiolovou, která vykazovala aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Ve Fakultní nemocnici v Olomouci byla tinktura z konopí léčebně

používána na infekce působené virem herpes simplex a varicella zoster. Rovněž našla uplatnění při ošetřování dekubitů u imobilních pacientů (Hanuš, 2012).

Konopí seté obsahuje látku tetrahydrokanabinol (THC) s psychogenní aktivitou a je zaneseno i v právním řádu České republiky. Konopí k léčebným účelům podléhá v České republice preskripčnímu omezení. Specializace lékařů, kteří konopí k léčebným účelům mohou předepisovat je široká. Mezi ně patří specialisté z oborů dermatovenerologie, geriatrie, infekční lékařství, neurologie, oftalmologie, onkologie, ortopedie, paliativní medicína, psychiatrie, revmatologie a vnitřní lékařství.

3.2 Popis rostliny

Canabis sativa je jednoletá, dvoudomá kvetoucí bylina. Samčí rostliny jsou spíše vyšší a štíhlejší v porovnání se samičími rostlinami. Stonkem je vzpřímená lodyha, jejíž výška je značně závislá na druhu, odrůdě a pěstebních podmínkách. Rozmezí výšky stonku je značné, pohybuje se od 20 centimetrů až do 6 metrů, nicméně výška většiny rostlin se pohybuje v rozmezí od 1 do 3 metrů (Bovens et al., 2009).

Konopí má rovný, kulovitý kořen s postranními vlásečnicovými kořínky, které se významně podílejí na výživě a vývoji rostliny. Rozvoj kořenového systému je ovlivněn nejen hloubkou a hustotou výsadby, ale i kvalitou půdy a hladinou spodní vody. Pokud je tato hladina nízká, může kořen sahat i do více jak 2metrové hloubky naproti tomu při vysoké hladině spodní vody dorůstá pouze 40 cm (Miovský, 2008). Dobře rozvinutý kořenový systém může plnit i protierozní funkci.

Síla stonku se pohybuje v rozmezí od 3 mm do 60 mm. Podle typu konopí může být stonek v horní části čtyřhranný až šestihranný, přičemž jsou hrany směrem k vrcholu zvýrazněny. Počet internodií se pohybuje mezi 7 až 15.

Listy jsou dlanitě členité kopinatého tvaru s pilovitými okraji. Jsou 3 až 13četné (Miovský et al., 2008), někteří autoři uvádí, že rostlina v plném růstu jich má obvykle 9 (Adams, 2012). Děložní listy jsou jednodílné a podlouhlé. Brzy po vzejití opadávají a tvoří první kolénko (Miovský et al., 2008).

Konopí je rostlina dvoudomá a to značí existenci samčích a samičích rostlin. Vrcholky samičího květenství se nazývají marihuana a produkovaná pryskyřice je označována jako hašiš (Hanuš, 2012). Marihuana obsahuje 3 -10 % THC (Peč et Dušek, 2009). Samčí rostlina má květenství rozmístěna téměř po celé rostlině a vyrůstají na dlouhých stopkách z úžlabí listů. V době plného kvetení se květy otvírají a vypustí velmi lehký pyl, který je roznášen

větretem až do vzdálenosti až 12 km a je schopný oplodnění 14 – 15 dnů po dozrání (Miovský et al., 2008). Samčí rostliny kvetou o 7- 10 dní dříve než samičí rostliny téhož druhu. Samičí květy se nachází v horní části rostliny, kde tvoří olistěné hrozny při bázi každého listu (Fišar, 2006). Samičí květy mají semeník s vysutým vajíčkem a dvěma bliznami. Pokud se pylové zrno uchytí na blizně, dochází k oplodnění.

Žláznaté trichomy jsou výčnělky tvořené epidermálními buňkami. Je to váček pokrytý kutikulou. U konopných rostlin lze rozlišit 3 druhy těchto trichomů. Nejmenší z nich jsou bulbózní trichomy. V jejich subkutikulárním prostoru se hromadí pryskyřice. Dalším typem trichomů jsou kulovité přirostlé trichomy. Vylučují kanabinoidy a další sekundární metabolity jako jsou lipidy, vosky, fenypropanoidy, flavonoidy, metylketony a terpenoidy (Champagne et Boutry, 2016).

Plodem je vejčítá jednosemenná nažka. Rozměry semene jsou odlišné pro různé typy a odrůdy konopí. Od semen rostlin chmele (*Humulus lupulus* či *Humulus japonicus*) pocházejících ze stejné čeledě se dají snadno odlišit podle charakteristického mramorování (Bovens et al., 2009)



Obrázek 1: rostlina *Canabis sativa*

Zdroj: <https://3c1703fe8d.site.internapcdn.net/newman/gfx/news/hires/2017/cannabis.jpg>

Rostliny konopí obsahují širokou škálu biologicky aktivních látek, které zahrnují rozmanitou skupinu chemických tříd. Mimo primárních metabolitů, mezi které řadíme bílkoviny, cukry a tuky, produkují i specifické sekundární metabolity. Řadíme sem především kanabinoidy, enzymy, glykoproteiny, alkoholy, aldehydy, ketony, jednoduché kyseliny, mastné kyseliny, steroidy, terpeny, fenoly, flavonoidy, vitaminy, pigmenty a další (ElSohly et Slade, 2005). Vzhledem k tomu, že rostliny nemají, na rozdíl od živočichů, žádný imunitní

system, svůj způsob ochrany realizují pomocí specifických sekundárních metabolitů (Holland et al., 2014).

3.2.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou uhlíkaté biologicky aktivní látky (Zima, 2012). Klasické kanabinoidy jsou tricyklické terpenoidy, které jsou nerozpustné ve vodě a jsou rozpustné v lipidech, alkoholech a jiných nepolárních organických rozpouštědlech (Thakur GA et al., 2005). Můžeme je rozdělit do 3 skupin na fyto-kanabinoidy rostlinného původu, endokanabinoidy vyskytující se v živočišných tkáních a na látky synteticky připravené. V konopí setém bylo identifikováno přes 500 látek, z nichž více jak 100 tvoří kanabinoidy. Nejvýznamnější je Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), což je látka s nejvyšší psychoaktivitou. Její obsah se v různých částech rostliny liší a závisí nejen na dané odrůdě, ale i pěstebních podmínkách (Miovský et al., 2008). Při výzkumu vlivu biotických (kmeny hub *Pythium aphanidematum* a *Botrytis cinerea*) a abiotických (UV záření) faktorů na množství kanabinoidů v buněčné kultuře *Cannabis sativa*, bylo zjištěno, že nedošlo ke stimulaci tvorby sekundárních metabolitů a byla pozorována i nízká exprese genu THCA syntázy. Exprese genu tohoto enzymu je ovlivňována vývojovou a růstovou fází žláznatých trichomů rostlin konopí (Flores-Sanchez et al., 2009). Nejvíce THC je obsaženo v samičích květenstvích.

Mezi nejvýznamnější kanabinoidy řadíme: Δ^9 - trans – tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 - trans – tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidiol (CBD), cannabichromen (CBC), cannabielsoin (CBE), cannabiergol (CBG), cannabicyclol (CBL), cannabinol (CBN), cannabinodiol (CBND) a cannabitriol (CBT). Podle jejich základní chemické struktury je můžeme rozdělit do 11 skupin.

Tabulka 1: Přehled farmakologické aktivity kanabinoidů bez psychogenních účinků

účinek	CBC	CBD	CBDV	CBG	Δ^9-THCA	Δ^9-THCV
analgetický	x	x				
anorektický						x
antibakteriální		x		x		
antidiabetický		x				
antiemetický		x				
antiepileptický		x				x
protiischemický		x				
antikinetický ve střevě		x				
antimikrobiální	x					
antiproliferační	x	x		x	x	
antipsoriatický		x				
antipsychotický		x				
antispastický		x			x	
anxiolytický		x				
imunopresivní		x				
neuroprotektivní		x				
protizánětlivý	x	x				
vasorelaxační		x				

Zdroj : <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S016561470900128X-gr1.sml>

3.2.2 Terpeny

V roce 2014 bylo identifikováno více jak 545 složek konopí, z nichž 140 tvořily terpeny. Jsou to chemické látky rostlinného původu bez psychogenní aktivity. Jedná se o nenasycené uhlovodíky, jejichž molekuly se skládají z izoprenových jednotek. Podle autojejich počtu je rozdělujeme na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, steroidy, karoteny a polyisopreny.

Terpeny jsou složeny z atomů uhlíku a vodíku, zatímco terpenoidy mají ve své struktuře ještě atom kyslíku a vznikají z terpenů při sušení rostlin konopí. Terpeny mohou obsahovat karbonylovou i karboxylovou skupinu. Terpeny vznikají nejčastěji cykloadicí avšak existují i necyklické terpeny. Při cykloadici dochází k zániku dvou dvojných vazeb a vzniká kruh. Terpeny jsou těkavé a šíří výrazné aroma do okolí. Jsou rozpustné v lipoidních látkách.

Při testování účinnosti různých extrakčních metod a srovnávání obsahu těchto látek v *Cannabis sativa* a *Cannabis indica* byly detekovány tyto terpeny: α -thujen, α -pinen, kamfen, β -fellandren, β -pinen, β -myrcen, p-cymol, 4-karen, δ -limonen, cineol, trans- β -ocimen, β -ocimen, γ -terpinen, nonanal, terpinen-4-ol, kamfor, estragol, eukalyptol, karvon, β -panasinsen, karyofylen, karyofylen oxid, β -famesen, trans- α -bergamoten, aromadendren, humulen, cis- β -farnesen, alloaromadendren, γ -muurolen, γ -elemen, β -kurkumen, α -kurkumen, elixen, α -bulnesen, β -bisabolen, α -gurjunen, cedrenol, linalool, autmenthol.

Hlavní složku *Cannabis sativa* tvořily seskviterpeny karyofylen (46,8 %), humulen (13,2 %), trans- α -bergamoten (3,1 %), cis- β -farnesen (8,6 %). Z monoterpenů byly detekovány α -pinen (3,6 %), δ -limonen (5,1 %) a cineol (2,6 %). U *Cannabis indica* byly identifikovány jako hlavní seskviterpeny karyofylen (23,5 %), karyofylen oxid (5,0 %), linalool (21,3 %), trans- α -bergamoten (5,2 %) a cis- β -farnesen (3,7 %). Z monoterpenů byl nalezen mentol (8,2 %), α -pinen (4,6 %), δ -limonen (6,4 %), eukalyptol (10,3 %), estragol (5,4 %) a karvon (5,1 %) (Naz et al., 2017).

Složení terpenů je silně geneticky podmíněné a velmi málo ovlivnitelné podmínkami zevního prostředí. Jsou proto používány jako biochemický marker pro určování rostlinných druhů, odrůd a hybridů. Terpeny mají v rostlině ochrannou funkci. Snižují riziko napadení rostliny býložravci, škůdci a chorobami. Monoterpeny převažují v květenstvích a slouží k odpuzování hmyzu. Hořké seskviterpeny jsou především v listech a chrání rostlinu před spásáním. Ze seskviterpenů je nejvíce zastoupen β -karyofylen (Casano et al., 2011), který vykazuje antifungální aktivitu (Russo, 2011). Terpeny jsou těkavé a vytváří výrazný specifický zápach rostliny, především pak limonen a β -myrcen (Peč et Dušek, 2009). Mezi terpeny řadíme silice, které jsou směsí monoterpenů. Rozmezí obsahu terpenoidů v sušeném květenství tvoří 0,01 do 1,5 % hmotnosti (Giese et al., 2015). Sušení rostlin vede ke ztrátě terpenů a to spíše monoterpenů než seskviterpenů (Ross et ElSohly, 1996).

Terpeny v rostlinách mohou mít funkci obrannou, mohou složit jako atraktanty, mají význam při komunikaci mezi rostlinami, mohou být prekurzory hmyzích agregačních feromonů a mají i významný vliv na člověka a to jak léčebný, tak i toxický (Dvořáková et al., 2011).

Monoterpeny ovlivňují vznik rakoviny několika mechanismy:

- inhibují syntézu ubiquinonu a konverzi lathosterolu na cholesterol (limonen);

- ovlivňují aktivitu klíčového enzymu mevalonátového metabolismu (geraniol, limonen, mentol);
- zvyšují aktivitu enzymů v játrech (geraniol, karvon, limonen, sobrerol);
- ovlivňují expresi genů v tumoru (limonen);
- stimulují apoptózu (geraniol);
- inhibují post-translační isoprenylaci proteinů (limonen);
- aktivují gen specifický pro nádorové buňky (TRPM8) – (mentol);
- blokující monoterpeny zabraňují interakci karcinogenu s DNA (limonen, perillyl alkohol, karveol, karvon, mentol, sobrerol);
- potlačující monoterpeny zabraňují dělení nádorových buněk (geraniol, limonen, perillyl alkohol), (Dvořáková et al., 2011).

Limonen vykazuje anxiolytické účinky (Carvalho-Freitas et Costa, 2012) a u β -myrcenu byly pozorovány sedativní účinky (Wichtl, 2004), rovněž působí antimikrobiálně a bronchodilatačně (Nissen et al., 2010). Karyofylen oxid slouží speciálně cvičeným psům k zjištění narkotika (Peč et Dušek, 2009). U karyofyleny byla pozorována cytoprotektivní aktivita (Tambe et al., 1996). Terpeny působí i jako zesilovače penetrace transdermálně podávaných léků (Chen et al., 2016). Přehledová tabulka 2 nabízí výskyt a účinek některých terpenů na člověka.



Obrázek 2: Silice

Zdroj: https://img.webmd.com/dtmcms/live/webmd/consumer_assets/site_images/articles/health_tools/essential_oils_dos_and_donts_slideshow/493ss_thinkstock_rf_essential_oils.jpg

Tabulka 2: přehled významných terpenů a jejich účinků

terpen	vůně	výskyt	účinek
bisabolen	dřevitá	topol, citron, oregano	protirakovinný (Yu-Jen Jou et al., 2016)
borneol		muškátový oříšek, šalvěj, levandule	protizánětlivý (Zou et al., 2017)
farnesol	konvalinková	santalové dřevo, květ jasmínu a lípy, růže	apoptický (Špičáková et al., 2017)
geraniol	růžová	růžový olej	antimikrobiální (BALTA et al., 2017)
karyofylen	chmelová	v silicích bazalky, hřebíčkovci vonném, konopí setém, rozmarýně, chmelu otáčivém	antikonvulzivní (Oliveira et al., 2016) antifungální (Selestino Neta et al., 2017) antibakteriální (Montanari et al., 2011)
limonen	citrusová	silice citronová, pomerančová, konopná	anxiolytický (Carvalho-Freitas et Costa, 2012) apoptický (Ji et al., 2016)
linalool	květinová s kořenitými tóny	v rostlinách z čeledi hluchavkovitých, konopí	antimikrobiální (BALTA et al., 2017) antifungální (Dias et al., 2017) apoptický (Sun et al., 2015) antidepresivní (Guzmán-Gutiérrez et al., 2015)
myrcen	zemitá	silice obsažená v chmelu a vavřínu, konopí	antiulcerózní (Bonamin et al., 2014) antiischemický (Gul Baykalir et al., 2016)
terpineol	borovicová / hřebíčková	prskyřice jehličnanů, hřebíček, vavřín, majoránka, kardamon, baldrián, konopí	antibakteriální (Li et al., 2014) antifungální (Zhou et al., 2014)
α -pinen, β -pinen	borovicová	borovice, konopí	antidepresivní (Guzmán-Gutiérrez et al., 2015) antifungální (Rivera-Yañez et al., 2017)

3.2.3 Ostatní látky

Mimo kanabinoidů, je známo 419 sloučenin, které jsou obsaženy v rostlinách *Cannabis sativa*. Jsou zastoupeny v následujících skupinách: 27 dusíkatých sloučenin, 18 aminokyselin, 3 proteiny, 6 enzymů, 2 glykoproteiny, 34 cukrů a příbuzných sloučenin, 50 uhlovodíků, 7 jednoduchých alkoholů, 12 jednoduchých aldehydů, 13 jednoduchých ketonů, 20 jednoduchých kyselin, 23 mastných kyselin, 12 jednoduchých esterů, lakton, 11 steroidů, 120 terpenů, 25 nekanabinoidních fenolů, 23 flavonoidů, 2 pigmenty, 9 prvků a vitamin (ElSohly et Slade, 2005). Dále pak obsahují i fytohormony, které jsou nezbytné pro buněčný a životní cyklus rostliny.

Flavonoidy spadají do široké skupiny přírodních látek. Patří mezi antioxidanty, které chrání tkáň proti poškození volnými radikály. V konopí bylo detekováno 23 flavonoidů, např. vitexin, orientin, kaempferol, kvercetin, apigenin nebo luteolin, kanflavin A, B a C. Byl u nich pozorován antioxidační a protizánětlivý účinek (Peč et Dušek, 2009).

V roce 1971 byla extrahována z rostlinného materiálu směs alkaloidů, kdy byly izolovány 4 z nich a pojmenovány cannabimin A – D. První kanabinoidní alkaloid byl plně identifikován ze vzorku izolovaném z mexické variety *Cannabis sativa* v roce 1975 v Mississippi. Druhý alkaloid byl pojmenován anhydrocannabisativin, byl nalezen ve vzorcích rostlin konopí pocházejících z 15 různých zeměpisných oblastí. Některé další mají podobnou strukturu jako již známé přírodní spermidinové alkaloidy palustrin a palustridin (Mechoulam et Hanuš, 2000).



Obrázek 3: Konopná silice

Zdroj: <https://media2.fdncms.com/tucsonweekly/imager/u/original/12652482/bigstock-autorcannabis-oil-and-hemp-205317244.jpg>

4 Mykózy

4.1 Význam mykotických onemocnění

Mykotické infekce významně přispívají k lidské morbiditě a mortalitě, nicméně zájem odborníků a organizací o tento jejich dopad na lidské zdraví je spíše okrajový. Je to způsobeno nejspíše i tím, že se jedná o přidružená onemocnění u pacientů s imunosupresivními onemocněními jako jsou různé typy nádorů, imunosupresivní infekce HIV/AIDS anebo i třeba snížení imunity u invazivních lékařských zákroků nebo u čekatelů zařazených v transplantačních programech, kdy je imunosuprese řízená farmakologicky (Brown et al., 2012).

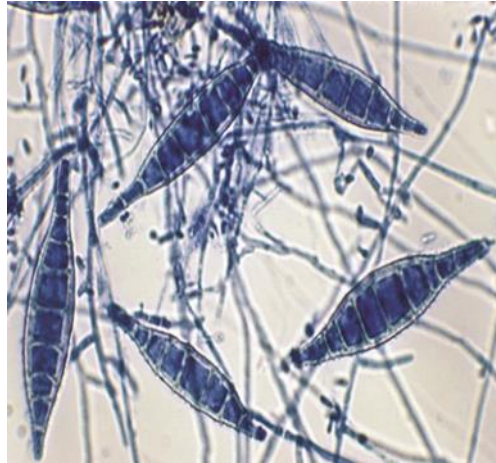
Mykózy dělíme na povrchové a invazivní, které napadají jednotlivé orgány. Invazivní plísňové infekce mají mnohem nižší výskyt než povrchová infekční onemocnění kůže a nehtů, které vykazují výskyt u 20 až 25 % populace, tj. až 1,7 miliardy lidí na celém světě (Brown et al., 2012; Havlickova et al., 2008), nicméně jejich následky jsou závažnější, neboť jsou příčinou úmrtí 1,5 milionu lidí ročně (Brown et al., 2012). Těchto obětí bude zřejmě víc, protože nejsou známy přesné údaje z některých oblastí Afriky a Asie. Výskyt konkrétních infekcí je ovlivněn socioekonomickými podmínkami, geografickým regionem a kulturními zvyklostmi (Havlickova et al., 2008).

Patogeny zodpovědné za kožní mykózy jsou primárně antropofilní a zoofilní dermatofyty z rodů: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (Havlickova et al., 2008).



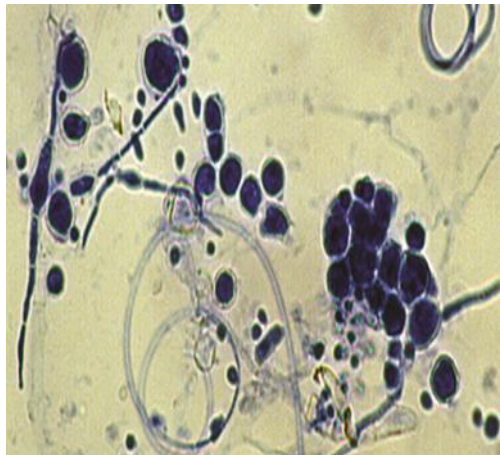
Obrázek 4: *Epidermophyton floccosum*

Zdroj: http://howmed.net/microbiology/cutaneous_mycoses/



Obrázek 5: *Microsporum canis*

Zdroj: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/microsporum/>



Obrázek 6: *Trichophyton interdigitale*

Zdroj: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>



Obrázek 7: *Candida albicans*

Zdroj: [https://www.shiftfrequency.com/tag/candida albicans/](https://www.shiftfrequency.com/tag/candida%20albicans/)

Mezi mikroorganismy působící kožní problémy můžeme zařadit i rod *Candida*, který patří mezi aerobní kvasinkové dimorfní houby. Jsou řazeny mezi oportunní patogeny, kdy kandidózou jsou ohroženi především velmi staří, velmi mladí anebo velmi nemocní lidé. Většinou se jedná o endogenní infekce, kdy v důsledku snížené imunity dochází k přemnožení. Predispozičními faktory jsou obezita, diabetes mellitus, antibiotická či steroidní terapie.

Pro dermatofyty je optimální teplota 25 až 28 °C a vlhké prostředí. Tyto patogeny jsou nejčastěji zodpovědné za onychomykózy v oblastech s mírným klimatem, kdy obyvatelé nosí neprodyšnou uzavřenou obuv, zatímco kandidózy postihují pacienty v zemích s horkým a vlhkým klimatem (Havlickova et al., 2008).

4.2 Formy mykopatogenů

Pokud mají houby podlouhlou vláknitou formu, jedná se o hyfy. Houby s touto strukturou jsou označovány jako vláknité. Některé druhy hub se vyznačují dimorfismem, tj. mohou se vyskytovat jak v kvasinkové, tak i vláknité formě. Těsně spojené hyfy se označují jako mycelium. Pokud pochází mycelium z jediné buňky jedná se thallus; thallus s volnou strukturou je popisován jako kolonie. Někteří zástupci rodu *Candida* mohou existovat ve formě pseudomycelií, které na rozdíl od pravého mycelia nemají kompletně rozlišitelné jednotlivé útvary. Klasifikace hub se zakládá především na morfologických znacích a to především těch, které souvisí s pohlavním nebo nepohlavním rozmnožováním. V biologii je tradičně používáno třídění hub do kmenů, tříd, řádů, čeledí rodů a druhů. Protože

je toto třídění pro klinickou praxi relativně složité, je pro ni užíváno dělení na dermatofyty, kvasinkové a plísňové houby (D-K-P-systém) (Braun-Falco et al., 2001).

4.3 Dělení dematofytóz

Dermatofytózy se dle lokalizace dělí na: tinea capitis (hlava), tinea barbae (brada), tinea faciei (tvář), tinea corporis (tělo), tinea inguinalis (třísla), tinea manuum (ruce), tinea pedum (nohy), tinea unguentum (nehty) (Braun-Falco et al., 2001).

4.3.1 Tinea capitis

Jedná se o dermatofytózu vlasaté části hlavy, obočí a řas, jejímž původcem jsou druhy rodů *Trichophyton* a *Microsporum*. Pod tinea capitis spadá onemocnění mikrospórie, což je vysoce nakažlivé onemocnění s typickým klinickým obrazem.

V kapiliciu (kštici) vznikají zprvu multiplicitní, velmi malé, pityriazoformní olupující se ložiska, která se pomalu rozšiřují až do velikosti několika centimetrů a splývají do polycyklických ohraničených ložisek. Mohou se vyskytovat i zánětlivé projevy. Mikrospórie téměř výlučně postihuje děti, více chlapce. Je to infekční, kontaktní onemocnění, které se vyskytuje endemicky v dětských zařízeních. Zdrojem infekce jsou většinou domácí zvířata, zejména kočky. Při mikroskopickém vyšetření lze pozorovat kolem vlasového stvolu velký počet malých spór (2-3 μm), které jej obklopují. Na základě tohoto jevu vznikl i název mikrospórie (Braun-Falco et al., 2001).

4.3.2 Tinea faciei a tinea corporis

Toto onemocnění mohou vyvolávat všechny rody dermatofytů. U dětí vzniká onemocnění po kontaktu s infekčními bezpříznakovými domácími zvířaty (jedná se o zoofilní dermatofyty). Původcem onemocnění může být *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* nebo *Epidermophyton floccosum*. Typickými projevy onemocnění jsou erytém, olupování a zvýraznění okraje ložiska s malými puchýřky či pustulkami (Havlickova et al., 2008). Zvláštním znakem je výskyt infekčních ložisek v centru a jejich periferní rozšiřování, čímž vznikají charakteristické svědivé prstence. Toto onemocnění lze zaměnit za ekzematické onemocnění. Nesprávnou aplikací léčebných přípravků s kortikoidy se zánětlivá reakce tlumí, svědění však přetrvává a dochází k dalšímu šíření infekce (Braun-Falco et al., 2001).

4.3.3 Tinea pedis

Je to infekční onemocnění nohy. Vyvolavatelem je *Trichophyton rubrum* a *Epidermophyton floccosum*. Toto onemocnění patří mezi nejčastější dermatologická onemocnění. U sportovců je označováno jako „atletická noha“ (Havlickova et al., 2008). Postižení jsou zejména plavci a osoby, které používají sportovní obuv z neprodyšných materiálů. Patogeneticky má největší význam vlhké a teplé mikropostředí v obuvi, mezi podpůrné faktory pak patří hyperhydróza a akrocyanóza. Spory dermatofytů jsou virulentní několik měsíců (obuv, dřevěné podlahy plováren, hotelové koberce aj.). Důležitou profylaxií je hygiena nohou a důkladné vysušení mezíprstí po koupání či sprchování. Mykózy nohou mají často chronicko-intermitentní průběh. Mohou trvat i několik desetiletí (Braun-Falco et al., 2001).

4.3.4 Tinea unguium

Jedná se o onemocnění nehtu, jehož původcem jsou dermatofyty. Spadá pod onemocnění nehtu, která se souhrnně označují onychomykózy (Obrázek 8). Většinou mu předchází tinea pedis. Původce proniká z hyponychia do nehtového lůžka. Dochází k hyperkeratóze a nehet získává žlutou barvu. Při výraznější keratóze mohou vzniknout až drobné nehty (onychodystrofie) (Braun-Falco et al., 2001).



Obrázek 8: Onychomykóza

Zdroj: [http://howmed.net/microbiology/cutaneous mycoses/](http://howmed.net/microbiology/cutaneous%20mycoses/)

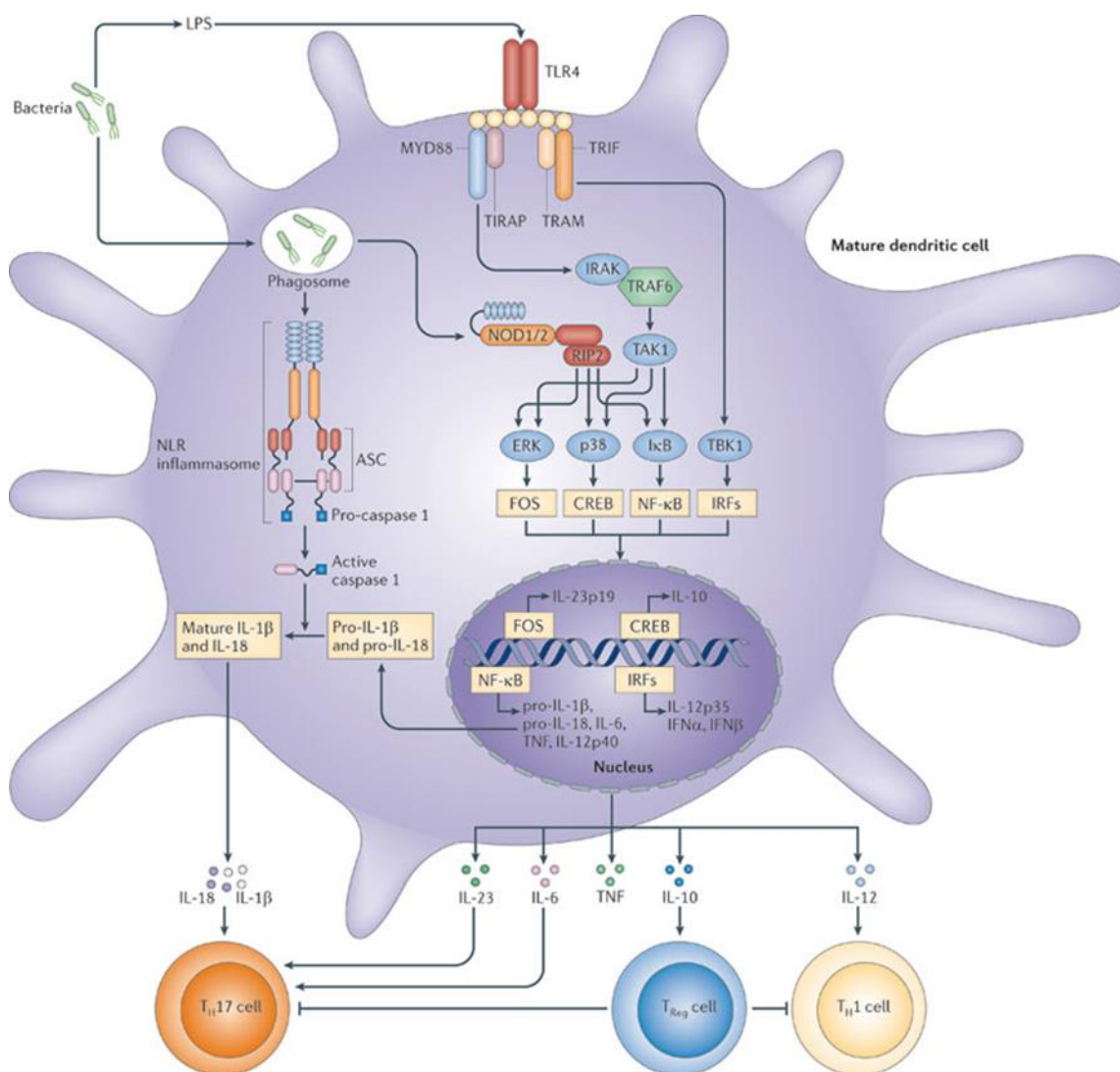
5 Reakce imunitního systému a možnosti terapie

Na obraně organismu se podílejí T lymfocyty, ze kterých se diferencují 3 subpopulace. Jsou to prekuzory pomocných T buněk (T_H) s povrchovým receptorem CD4; prekuzory cytotoxických T buněk (T_C) s povrchovým receptorem CD8 a třetí subpopulací jsou NK buňky.

Zralé T_H buňky produkují cytokiny, které regulují jiné buňky. T_C buňky jsou označovány i jako CTL. Fagocyty (patří mezi ně neutrofilní a eosinofilní granulocyty a monocyty, jejichž tkáňovou formou jsou makrofágy) mají schopnost rozeznávat povrchové struktury mikroorganismů, např. manany typické pro kvasinky a plísňe. Fagocytóza je spouštěna interakcemi mezi lektiny fagocytů a sacharidovými strukturami mikrobů.

Důležité jsou i receptory TLR skupiny (Toll-like receptor), které se podobají receptoru pro cytokin IL-1, jenž se podílí na zprostředkování systémové odpovědi na zánět. Některé kvasinky a plísňe mohou být intracelulárními parazity.

Po pohlcení těchto parazitů makrofágy nastává produkce IL-12 (Hořejší et Říhová, 2002). IL-12 aktivuje T lymfocyty, především podtyp $T_H 1$ a zvyšuje i cytotoxickou aktivitu NK buněk. Typ T_H lymfocytů T_H17 má zásadní význam při antimykotické aktivitě na sliznicích. Rovněž pro antimykotickou obranu mají důležitou roli imunitní receptory typu Toll (TLR) a lektinové receptory typu C (CLR) (Brown et al., 2012). Lze se domnívat, že jednotlivé TLR receptory mají v imunologické odpovědi odlišné biologické vlastnosti (Blasi et al., 2005).



Nature Reviews | Immunology

Obrázek 9: Schéma produkce cytokinů imunitním systémem a aktivace T buněk na základě signálů indukovaných bakteriemi

Zdroj: https://www.researchgate.net/profile/Kingston_Mills/publication/51810938/figure/fig3/AS:282066458562595@1444261292363/Bacterium_induced_signalling_in_innate_immune_cells_leads_to_cytokine_production_that.png

Genetické defekty T_H17 se podílí na zvýšené náchylnosti k chronickému průběhu mykóz. Bohužel téměř chybí genetické a další prognostické biomarkery pro identifikaci vysoce rizikových pacientů (Brown et al., 2012).

Výskyt dermatofytů v kůži vyvolává tvorbu humorálních a celulárních protilátek, které lze prokázat pomocí intrakutánními testy. Po aplikaci houbového antigenu (trichofytin) může vzniknout časná reakce (I. typu) anebo pozdní reakce (IV. typu). Trichofytiny jsou glykoproteiny, jejichž glycidová část zodpovídá za časnou reakci a část peptidová za reakci

pozdní. Tyto testy mají pouze okrajový diagnostický význam, protože reakci lze vyvolat ještě několik let po vyléčení mykózy. Je otázkou, zda protilátky mají význam pro překonání onemocnění anebo zda se mohou podílet na imunizaci (Braun-Falco et al., 2001).

5.1 Antimykotika

Antimykotika jsou látky zabraňující růstu plísní a kvasinek tedy s fungistatickým účinkem anebo působících jejich uhynutí, mající tudíž fungicidní účinek. Dle mechanismu jejich účinku jsou děleny na specifická, která zasahují do metabolismu patogenů, a nespecifická, která působí fungistaticky a velmi často i bakteriostaticky, neboť výsledkem jejich působení je denaturace bílkovin a změna permeability buněčné membrány. Z chemického hlediska se jedná o různorodé látky jako jsou peptidy, echinokandiny, benzofurany, polyeny a další (Suchopár, 1997; Zacchino et al., 2017).

5.1.1 Specifická antimykotika

Specifická antimykotika můžeme dělit dle chemického složení (Tabulka 3) do 3 základních skupin a ostatní bez ohledu na chemické složení (Tabulka 4).

Tabulka 3: Specifická antimykotika dělená na základě chemického složení (Suchopár, 1997; Zacchino et al., 2017)

skupina	zástupce	účinek
Polyenová	nystatin, natamycin, amphotericin B	vážou se na ergosterol a tím inhibují tvorbu buněčné membrány, zvyšují její permeabilitu, zhoršují její bariérovou funkci a to vede až k buněčné smrti
Azolová (imidazolová, triazolová)	bifonazol, clotrimazol econazol, fluconazol isoconazol, itraconazol ketoconazol, miconazol oxiconazol, posaconazol ravuconazol, voriconazol	zasahují do syntézy ergosterolu, neboť působí jako inhibitory 14 α - demetylázy nezbytné pro syntézu ergosterolu v buněčné stěně
Allylaminová	naftifin terbinafin	inhibují skvalen monooxygenázu, což vede k hromadění skvalenu, následně pak k porušení buněčné stěny a ke smrti buňky

Tabulka 4: další specifická antimykotika (Suchopár, 1997; Zacchino et al., 2017)

Specifická antimykotika		
skupina	zástupce	účinek
Thiokarbamátové sloučeniny	tolnaftat, tolciolat	působí inhibici skvalenové monooxidázy
Pyridonová	ciclopirox olamin	ovlivňují syntézu RNA a DNA a podílí se i na intracelulární depleci draslíku
Morfolinové deriváty	amorolfin	působí hromadění 14-ignosterolu v buněčné membráně a nedostatek ergosterolu
Benzofuran	griseofulvin	poškozuje mikrotubuly buněčného cytoskeletu a buňka se nemůže dělit
Echinokandiny	kaspofungin, anidulafungin a mikafungin	dochází k inhibici syntézy glukanu ve stěně mikromycety

5.1.2 Nespecifická antimykotika

Mezi tato léčiva jsou řazeny látky mající antifungální účinek různé spolehlivosti. Jsou používány spíše pouze jako doplňková léčiva ke specifickým antimykotikům. Znesnadňují rezistenci vůči specifickým antimykotikům. Tato rezistence není nijak vyjímečná (Pemán et al., 2009).

Do skupiny těchto látek jsou zahrnuty různé kyseliny (acidum salicylicum, acidum boricum, acidum benzoicum, acidum uncyclenicum), aldehydy (formaldehyd), organická barviva (viride nitens, methylrosanilinii chloridum), deriváty fenolů (resorcinol, 2-chlor-4-nitrophenol, hexachlorophen), 8-chinolinol (cloroxin), sloučeniny jódu a síry, dehty (lithantracis pix) a jim příbuzné látky chrysarobin nebo dithranol (cignolin). Nevýhodou při používání těchto látek může být i jejich zápach a nežádoucí barvení kůže či oděvu (Suchopár, 1997).

5.2 Antifungální rezistence a její mechanismy

Rezistence mikroorganismů vůči antimykotickým preparátům se dělí na mikrobiologickou a klinickou a může být buď primární (vnitřní) anebo sekundární (získaná). Antifungální rezistence významně ovlivňuje úspěšnost či neúspěšnost léčby (Pemán et al., 2009).

Největší náchylnost k rezistenci vůči antimykotikům vykazovaly rody *Candida*, *Cryptococcus* a *Aspegillus*. Mezi mechanismy rezistence patří: snížená koncentrace intracelulárních léčiv aktivací efluxních systémů, snížení penetrace léčiva, změna cílového místa a nadměrná exprese cílového enzymu a vznik náhradních drah (Zacchino et al., 2017), bodové mutace a/nebo nadměrná exprese genů, enzymatické mutace, zvýšená aktivita enzymů nebo defekty biosyntézy ergosterolů (Pemán et al., 2009). Vzhledem k rozšíření rezistence patogenů vůči antimykotikům jsou hledány a testovány nové látky na antifungální aktivitu. V současné době jsou zkoušeny některé přírodní látky v kombinaci s konvenčními léčivy v roli adjuvantů.

5.3 Látky testované na antifungální aktivitu

V posledních letech vzhledem k zvýšené rezistenci mikroorganismů vůči standardně užívaným antimikrobiálním preparátům a jejich vedlejším někdy i velmi závažným nežádoucím účinkům, je pozornost vědců zaměřena na výzkum antimikrobiálních vlastností přírodních látek.

5.3.1 Epigalokatechin galát (EGCG)

Epigalokatechin galát je ester epigalokatechinu a kyseliny galové vyskutující se jako nejhojnější katechin v čaji. EGCG má inhibiční účinek na růst klinických izolátů druhu *Candida* (Park et al., 2006). Výsledky studií in vitro i in vivo potvrdily zvýšenou antimykotickou účinnost v kombinaci amfotericinu B proti rezistentnímu kmenu *Candida albicans* (Zacchino et al., 2017). Při testování 35 izolátů 3 kmenů dermatofytů (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*) se antifungální aktivita EGCG projevila u všech testovaných klinických izolátů. Hodnota MIC se pohybovala v rozmezí od 0,5 do 16 µg/ml. Tento účinek EGCG byl přibližně 4krát vyšší než aktivita flukonazolu a byl 4 až 16krát vyšší než účinek flucytozinu (Park et al., 2006).

5.3.2 Kurkumin

Kurkumin je diferuloylmethan, který je obsažen v oddencích rostlin rodu *Curcuma*. Je to přírodní žlutooranžové barvivo. Studie in vivo na myších ukazuje na zvýšení antimikrobiálního účinku flukonazolu za přítomnosti kurkuminu proti patogenu *Cryptococcus gatii* (Zacchino et al., 2017). U kmenů *Candida albicans* a *Candida glabrata* byla při testování antimikrobiální aktivity kurkuminu stanovena MIC 250 až 500 µg/ml (Neelofar et al., 2011).

5.3.3 Terpeny

Při testování citlivosti kmenů *Candida* rezistentních ke flukonazolu, byl prokázán fungicidní účinek terpenů thymolu a karvakrolu. Rovněž se tyto terpeny účastnily transformace fungistatické aktivity flukonazolu na fungicidní (Ahmad et al., 2013). Karvakrol způsobil lýzu buněk a ztrátu integrity buněčné membrány u testovaného kmene *Candida albicans* (James Bound et al., 2016).

Byla prokázána rovněž synergie flukonazolu s karvonem, mentolem a mentonem z mátové silice. Jejich antifungální účinek spočívá ve snížení koncentrace ergosterolů,

což inhibuje PM-ATPázu a vede k intracelulárnímu okyselování a nakonec buněčné smrti (Samber et al., 2015).

Byl prokázán synergistický vliv flukonazolu a geraniolu proti *Trichophyton rubrum* (Khan et Ahmad, 2011).

Při výzkumu antimikrobiální aktivity cymen projevoval inhibiční schopnosti vůči kvasinkám. Silice obsahující 47 % cymenu, vykazovala vysokou inhibiční aktivitu vůči patogenu *Aspegillus flavus* (Marchese et al., 2017).

Byly zkoumány i antifungální vlastnosti silic z rostlin *Cinnamomum verum*, *Thymus capitatus*, *Syzygium aromaticum* a *Pelargonium graveolens*, které vykazovaly široké spektrum účinnosti proti různým patogenním kmenům *Candida* (Essid et al., 2017).

6 Experimentální část

V rámci experimentu byla pomocí modifikované mikrodiluční metody testována antifungální aktivita sedmi extraktů a jedné silice získaných z různých chemotypů konopí. Všechny extrakty byly testovány ve třech technických a ve dvou nezávislých opakováních.

6.1 Rostlinný materiál

Extrakty a silice použité k testování antifungální aktivity byly získány z rostlin konopí vypěstovaných na Katedře rostlinné výroby Fakulty agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze v roce 2015. Jednalo se o ethanolové extrakty připravené ze samičího květenství, silice byla taktéž získána z květenství (Tab. 5).

Z výše uvedených extraktů byly do dimethylsulfoxidu (DMSO) připraveny zásobní roztoky o koncentraci 51,2 mg/ml, které byly skladovány v mrazáku (-20 °C) do dalšího použití.

Sledování antifungálního účinku extraktu a silice z léčebného konopí probíhalo u 3 typů dermatofytů: *Epidermaphyton floccosum* (EF), *Microsporum canis* (MC) a *Trichophyton interdigitalis* (TI).

Testované vzorky ethanolových extraktů a silice byly označeny čísly. Jejich seznam je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5: Identifikace jednotlivých vzorků a obsah THC a CBD v květenství (%)

Pořadí označení	Název odrůdy	Obsah THC (%) v květenství	Obsah CBD (%) v květenství
1	Conspiracy Kush	14 až 21	0,4
2	Jillybean	15 až 16	0,4
3	Nurse Jackie	17 až 18	0,5
4	Jack Skellington	17 až 22	0,5
5	National Health Service	18 až 20	0,5
6	Nordle	12 až 16	0,4
7	McLove	15 až 20	0,1
S	silice McLove	-	-

6.2 Testované plísně

Sledování antifungálního účinku extraktu a silice z léčebného konopí probíhalo u 3 typů dermatofytů: *Epidermaphyton floccosum* (EF), *Microsporium canis* (MC) a *Trichophyton interdigitalis* (TI). Testované mikroorganismy byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů (CCM). Jako pozitivní kontrola bylo použito antibiotikum griseoflavin (FARKOS NPF RU), jehož zásobní roztok (51,2 mg/ml) byl připraven ve dvou různých rozpouštědlech. V prvním případě bylo použito dimethylsulfoxidu (PENTA, CZ) a druhý vzorek byl rozpuštěn v 70% lihu (PENTA, CZ).

6.3 Testování antifungální aktivity pomocí mikrodiluční metody

Testování probíhalo ve sterilním prostředí, které bylo zajištěno laminárním kabinetem (flow box, FASTER IT), všechna použitá média a nástroje byly sterilní.

6.3.1 Příprava inokula

Inokulum jednotlivých dermatofytů bylo získáno z týden starých kultur seškrábáním mycelia a jeho následném rozpuštění ve známém množství fyziologickém roztoku (složení roztoku: NaCl 8,5% (w/v), Tween 80 1% (w/v) a pepton 1% (w/v)). Chemikálie byly

zakoupeny od PENTA, CZ a Carl Roth, GmBH, DE. Hustota získaného inokula byla následně vyhodnocena pomocí Bürkerovy komůrky pro počítání fragmentů sledovaných mikroorganismů. Inokulum bylo naředěno na výslednou koncentraci $5 \cdot 10^4$ kolonie tvořící jednotky (KTJ)/ml.

6.3.2 Mikrodiluční metoda

Testy extraktů byly prováděny na 96jamkových mikrotitračních destičkách, jako růstové médium bylo použito RPMI médium (Sigma Aldrich, CZ). Ze zásobních roztoků extraktů a antibiotika byl do RPMI média připraven pracovní roztok o koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$, ten byl následně pomocí dvojnásobného ředění naředěn, do každé jamky bylo dále přidáno 100 μl připraveného inokula. Výsledné testované koncentrace byly následující 1024, 512, 256, 128, 64, 32 a 8 $\mu\text{g/ml}$ (Obrázek 10). Poté byly mikrotitrační destičky inkubovány 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě 27 °C.

		KN	E1/1	E1/2	E1/3	E2/1	E2/2	E2/3	E3/1	E3/2	E3/3		KČ
($\mu\text{g/ml}$)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1024	A												
512	B												
256	C												
128	D												
64	E												
32	F												
16	G												
8	H												


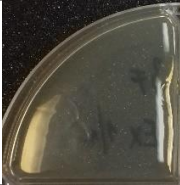






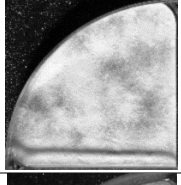
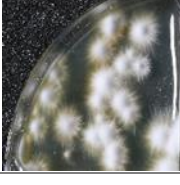
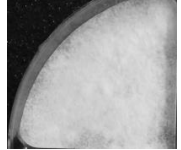
KN – kontrola nárůstu, E1/1 – extrakt 1 v 1. opakování, E1/2 – extrakt 1 ve 2. opakování, E1/3 – extrakt 1 ve 3. opakování, E2/1 – extrakt 2 v 1. opakování, E2/2 – extrakt 2 ve 2. opakování, E2/3 – extrakt 2 ve 3. opakování, E3/1 – extrakt 3 v 1. opakování, E3/2 – extrakt 3 ve 2. opakování, E3/3 – extrakt 3 ve 3. opakování, KČ – kontrola čistoty

Obrázek 10: Schéma mikrotitrační destičky

Mikrodiluční metoda neumožňuje zcela spolehlivé vizuální vyhodnocení nárůstu dermatofytů. Z tohoto důvodu, bylo z každé jamky přeneseno 100 μ l roztoku na čtvercivé Petriho misky s modifikovaným Sabouraudůvým agarem (SDA) (Sabouraud Dextrose Broth, Sigma Aldrich CZ, AGAR NO.1 OXOID CZ) o pH 7. Inokulované Petriho misky byly dále kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě 27 °C.

Hodnocení fungicidního a fungistatického účinku jednotlivých extraktů bylo prováděno vždy 3., 6. a 9. den po naočkování. Vyhodnocování probíhalo vizuálně na základě předem definované stupnice míry nárůstu mikroorganismů. Stupnice hodnocení nárůstu mikroorganismů se pohybovala u *Epidermophyton floccosum* v hodnotách 0 až 2,0 a u *Microsporum canis* a *Trichophyton interdigitale* v hodnotách 0 až 1,5 (Tabulka 6). Výsledné hodnoty byly převedeny na procenta. Hodnoty nárůstu plísní v jednotlivých dnech pak byly vyjádřeny jako procento z maximální hodnoty nárůstu kontroly (Tabulka 9 až 11).

Tabulka 6: Stupnice hodnocení nárůstu mikroorganismů

Stupnice hodnocení nárůstu mikroorganismů		
stupnice	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i> <i>Trichophyton interdigitale</i>
0,0		
0,1		
0,5		
1,0		
1,5		
2,0		

Zdroj: autorka

7 Výsledky

Naměřené hodnoty hustoty nárůstu testovaných mikroorganismů byly významně rozdílné. Lišily se jak mezi jednotlivými testovanými látkami, tak i mezi antifungálními účinky na sledované mikroorganismy. Převažovala fungistatická aktivita extraktů. Fungicidní aktivita jednotlivých látek je spolu s účinnou koncentrací uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7: Fungicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) testovaných látek

Fungicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) testovaných látek			
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
Extrakt 1	-	128	1024
Extrakt 2	-	-	-
Extrakt 3	-	128	-
Extrakt 4	-	-	-
Extrakt 5	-	1024	-
Extrakt 6	-	1024	256
Extrakt 7	-	1024	256
Silice	-	-	-
ATB – DMSO	-	128	-
ATB – LÍH	-	-	-

Zdroj: autorka

Tabulka 8: Hodnoty hustoty nárůstu *Epidermiphyton floccosum* vyjádřené v procentech vztažené k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích (µg/ml), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci

Epidermiphyton floccosum

dny	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.
KN	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100
µg/ml	1024			512			256			128			64			32			16			8		
E 1	5	5	25	5	25	25	5	25	50	25	50	50	25	75	75	25	75	75	25	75	75	25	75	75
E 2	5	25	50	25	25	50	25	25	50	25	50	50	25	50	50	25	50	75	25	50	75	25	50	75
E 3	5	25	75	25	75	75	25	75	75	25	75	75	25	75	75	25	75	100	25	75	100	25	75	100
E 4	5	50	50	25	50	50	25	50	50	25	50	50	25	75	75	25	75	75	25	75	75	25	75	75
E 5	5	5	25	25	25	25	25	25	50	25	50	50	25	50	50	25	50	50	25	50	50	25	50	75
E 6	5	5	25	5	5	25	5	25	25	25	25	50	25	50	75	25	75	75	25	75	75	25	75	75
E 7	0	5	25	0	5	25	5	25	25	5	25	25	5	25	25	5	25	25	25	50	50	25	50	75
Silice	5	25	50	5	25	50	5	25	50	5	25	50	5	50	50	25	50	50	25	50	50	25	50	50
A - D	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100
A- L	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100	25	75	100

Tabulka 8: KN – kontrola nárůstu, E1 – extrakt 1, E2 – extrakt 2, E3 – extrakt 3, E4 – extrakt 4, E5 – extrakt 5, E6 – extrakt 6, E7 – extrakt 7, A-D – antibiotika rozpuštěná v DMSO, A-L – antibiotika rozpuštěná v lihu

Zdroj: autorka

Tabulka 9: Hodnoty hustoty nárůstu *Microsporium canis* vyjádřené v procentech vztahované k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích (µg/ml), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci

Microsporium canis

dny	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.
KN	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
µg/ml	1024			512			256			128			64			32			16			8		
E 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	7	7	33	7	33	67
E 2	0	7	7	33	33	33	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67
E 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7	7	0	7	33	7	33	33
E 4	7	0	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	33	7	33	33	33	33	33	33	33	33
E 5	0	0	0	0	0	7	0	7	7	0	7	7	0	7	7	7	7	33	7	7	33	7	7	33
E 6	0	0	0	0	0	7	0	0	7	0	0	7	7	7	7	33	33	67	33	33	67	33	67	100
E 7	0	0	0	7	7	33	7	7	33	7	33	33	7	33	33	33	33	33	33	33	67	33	33	67
Silice	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
A-D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	33	33	7	33	33	7	33	33	7	33	33
A-L	7	7	33	7	7	33	7	7	33	7	7	33	7	33	33	7	33	33	7	33	67	7	33	67

Tabulka 9: KN – kontrola nárůstu, E1 – extrakt 1, E2 – extrakt 2, E3 – extrakt 3, E4 – extrakt 4, E5 – extrakt 5, E6 – extrakt 6, E7 – extrakt 7, A-D – antibiotika rozpuštěná v DMSO, A-L – antibiotika rozpuštěná v lihu

Zdroj: autorka

Tabulka 10: Hodnoty hustoty nárůstu *Trichophyton interdigitale* vyjádřené v procentech vztažené k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích (µg/ml), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci

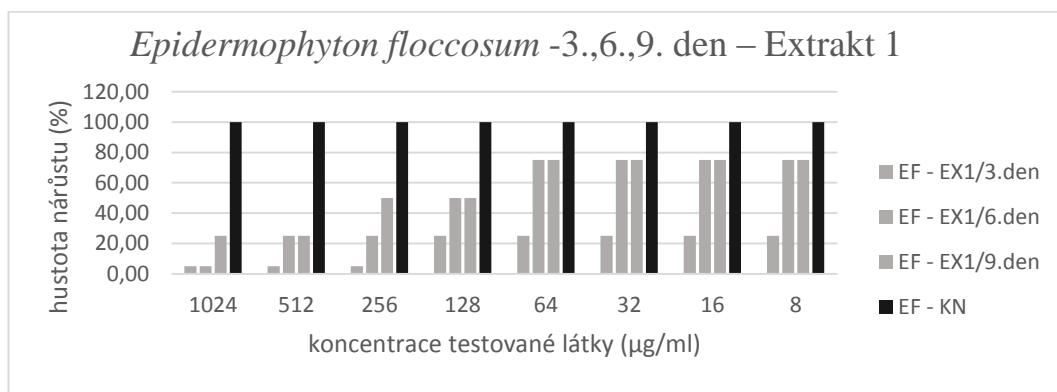
<i>Trichophyton interdigitale</i>																								
dný	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.	3.	6.	9.
KN	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
µg/ml	1024			512			256			128			64			32			16			8		
E 1	0	0	0	7	33	33	7	33	33	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
E 2	0	7	7	7	33	33	7	33	67	33	33	100	33	33	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
E 3	0	7	7	0	7	7	7	7	33	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67	33	33	67
E 4	7	7	33	7	33	67	33	33	67	33	33	67	33	67	67	33	67	67	33	67	67	33	67	67
E 5	0	7	7	7	33	33	7	33	33	7	33	67	7	33	67	7	33	67	33	33	100	33	67	100
E 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	7	33	33	7	33	67	7	33	67
E 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	33	33	7	33	33	7	33	67	33	33	67
Silice	7	7	33	7	67	67	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100	33	67	100
A-D	0	7	7	0	7	7	0	7	7	0	7	7	0	7	7	0	7	7	0	7	7	7	33	100
A-L	0	7	7	0	7	7	0	33	33	0	33	33	0	33	33	0	33	33	0	33	67	33	67	100

Tabulka 10: KN – kontrola nárůstu, E1 – extrakt 1, E2 – extrakt 2, E3 – extrakt 3, E4 – extrakt 4, E5 – extrakt 5, E6 – extrakt 6, E7 – extrakt 7, A-D – antibiotika rozpuštěná v DMSO, A-L – antibiotika rozpuštěná v lihu

Zdroj: autorka

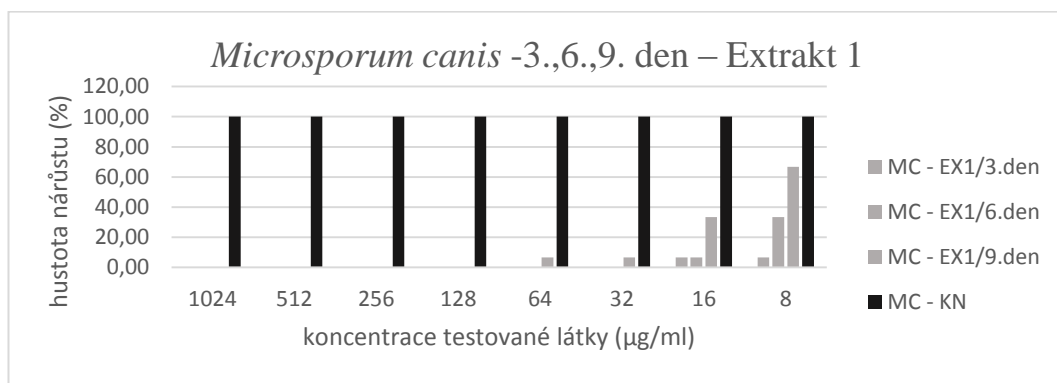
7.1 Extrakt 1

Extrakt 1 vykazoval nejvyšší fungicidní účinek u testovaného mikroorganismu *Microsporium canis* v koncentraci 128 $\mu\text{g/ml}$ a u *Trichophyton interdigitale* v koncentraci 128 $\mu\text{g/ml}$ (graf 3). U *Epidermophyton floccosum* účinkoval pouze fungistaticky a v koncentraci 128 $\mu\text{g/ml}$ a 9. den dosahoval jeho nárůst 50% oproti kontrolnímu nárůstu (graf 1). Fungistatický účinek u patogenu *Microsporium canis* dosahoval 9. den měření v koncentraci 16 $\mu\text{g/ml}$ s hustotou nárůstu 33 % (graf 2).



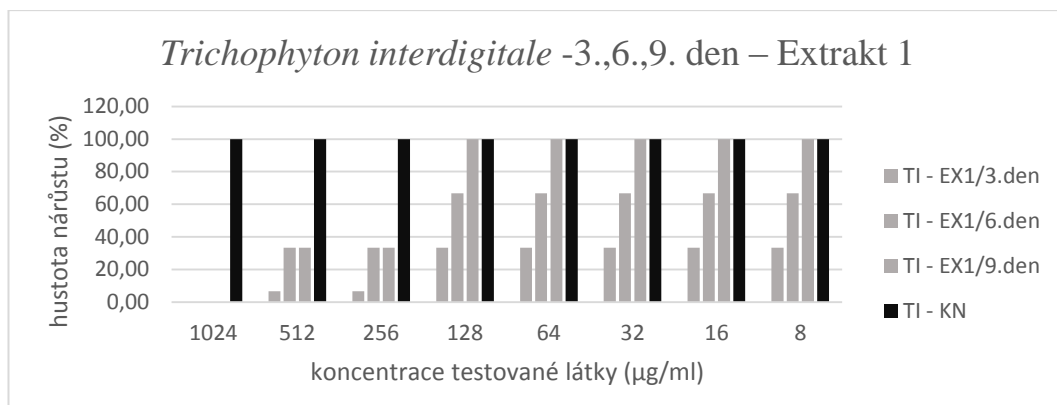
Graf 1: Extrakt 1 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 2: Extrakt 1 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

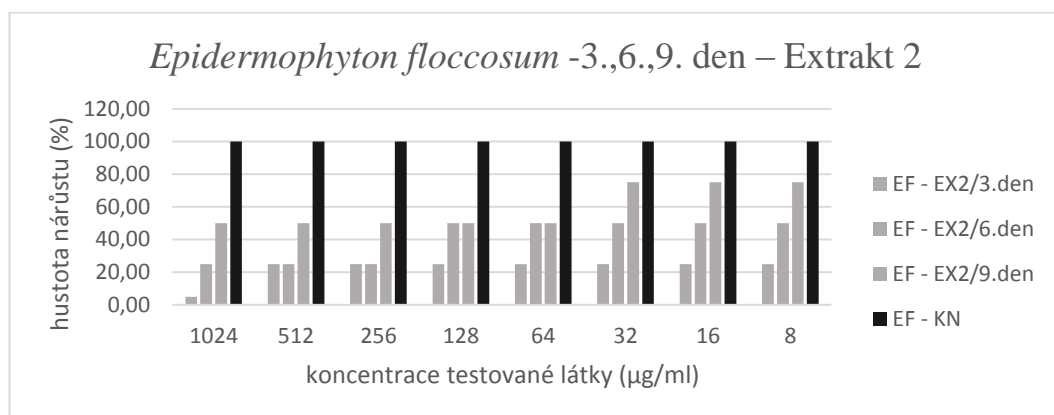


Graf 3: Extrakt 1 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

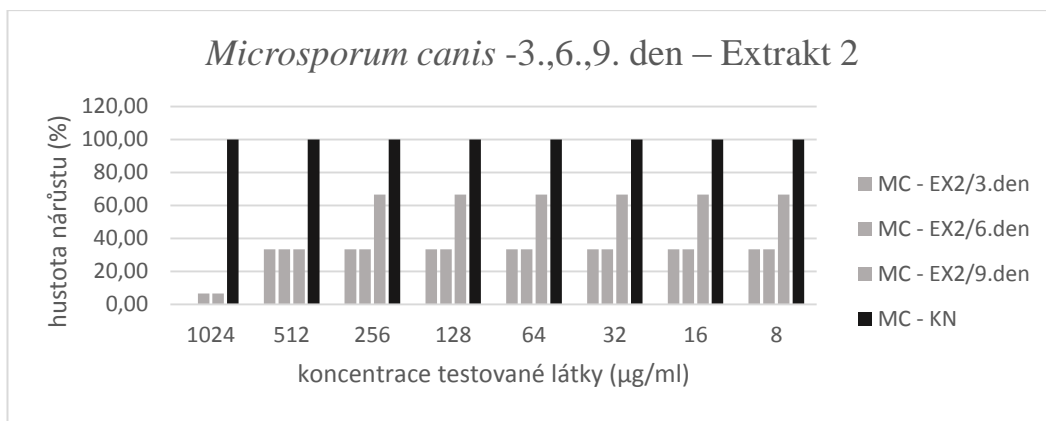
7.2 Extrakt 2

U žádného z testovaných mikroorganismů tento extrakt nevykazoval fungicidní účinek. Jeho fungistatický účinek byl nejstabilnější u dermatofytu *Microsporum canis*, neboť 6. den sledování nárůstu nepřekročil hodnotu 33 % hustoty nárůstu oproti kontrole ani při nejnižší testované koncentraci 8 µg/ml (graf 5). *Epidermophyton floccosum* nepřekročil hodnotu nárůstu 75 % oproti kontrole ani 9. den při nejnižší testované koncentraci (graf 4).



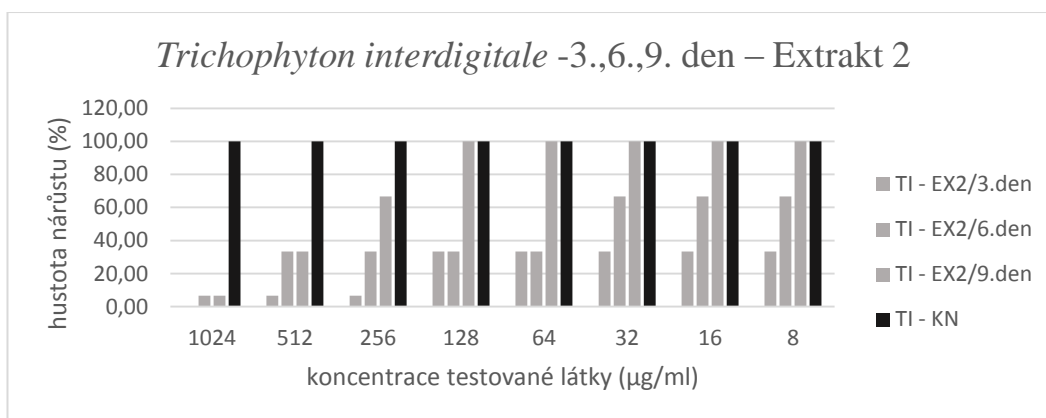
Graf 4: Extrakt 2 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 5: Extrakt 2 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

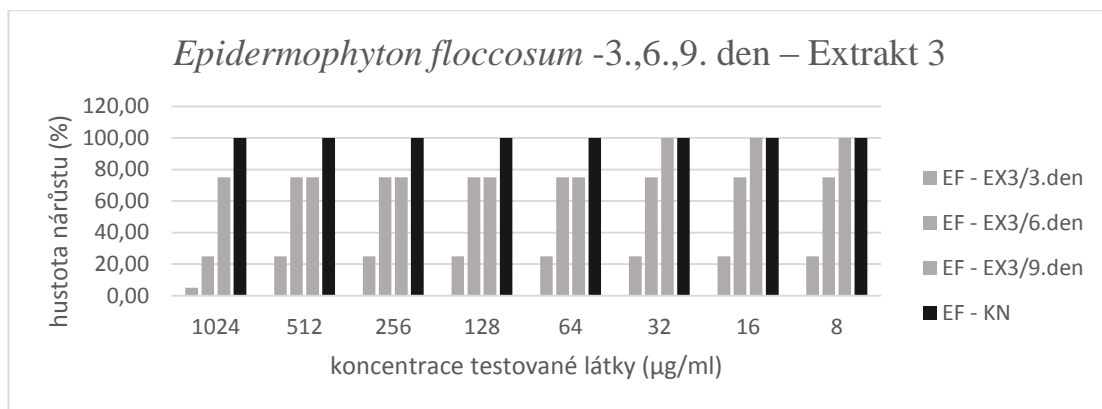


Graf 6: Extrakt 2 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

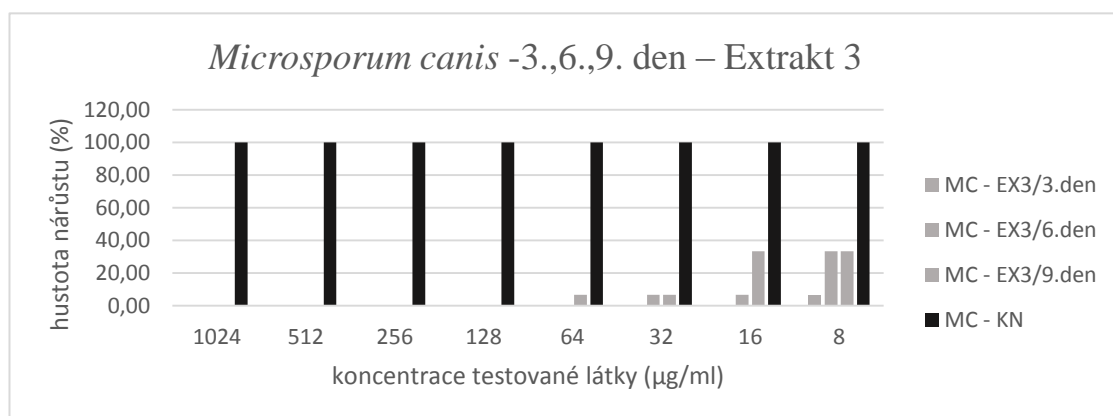
7.3 Extrakt 3

Extrakt 3 projevil výrazný fungicidní i fungistatický účinek u mikroorganismu *Microsporium canis*. Fungicidně u tohoto patogenu působil v koncentraci 128 µg/ml. Jeho maximální hustota nárůstu byla 9. den v koncentraci 16 µg/ml a 6. a 9. den v koncentraci 8 µg/ml. Tato hodnota dosahovala maxima 33 % oproti kontrole nárůstu (graf 8). U *Trichophyton interdigitale* byla 6. den hustota nárůstu 7 % v koncentraci 256 µg/ml a vyšších. Maximum jeho hustoty nárůstu 9. den v nejnižší koncentraci 8 µg/ml byla 67 % proti kontrole nárůstu (graf 9). U *Epidermophyton floccosum* v koncentraci 64 µg/ml a vyšší, nepřesáhla hustota nárůstu 75 %. V koncentracích 32 µg/ml a nižších dosáhla hustota nárůstu 100% proti kontrole nárůstu (graf 7).



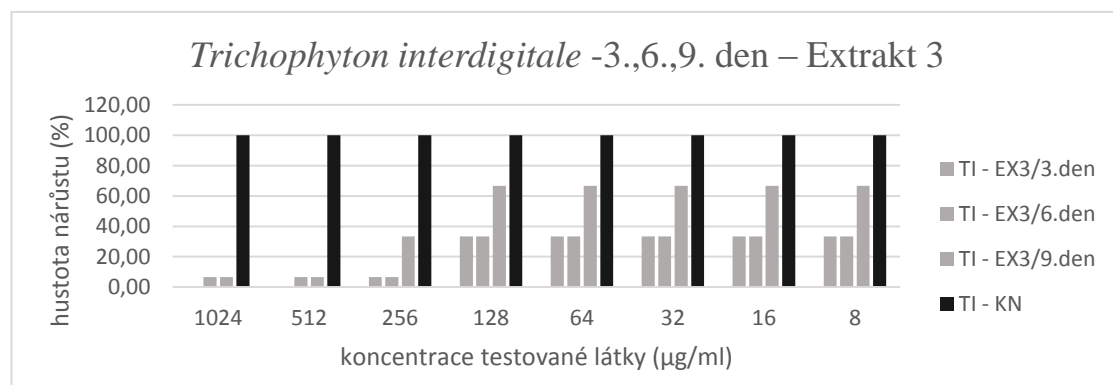
Graf 7: Extrakt 3 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 8: Extrakt 3 - hustota nárůstu *Microsporum canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

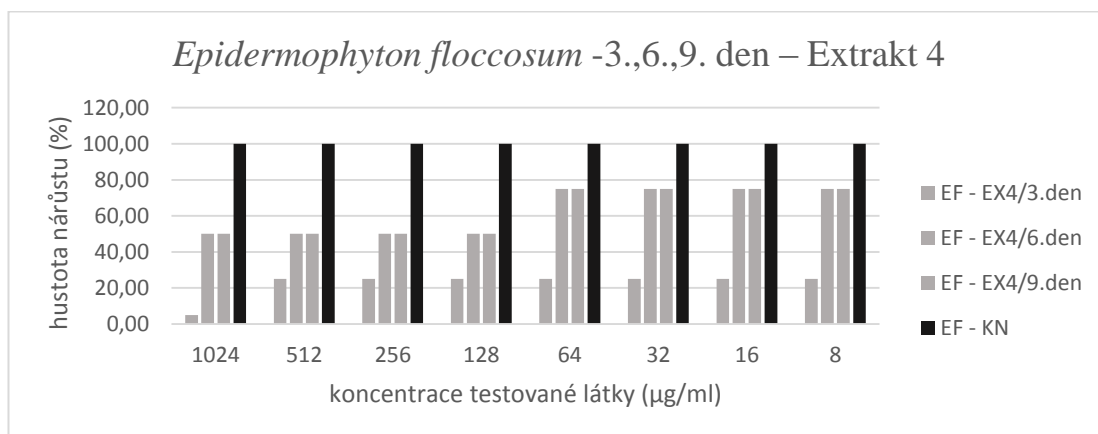


Graf 9: Extrakt 3 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

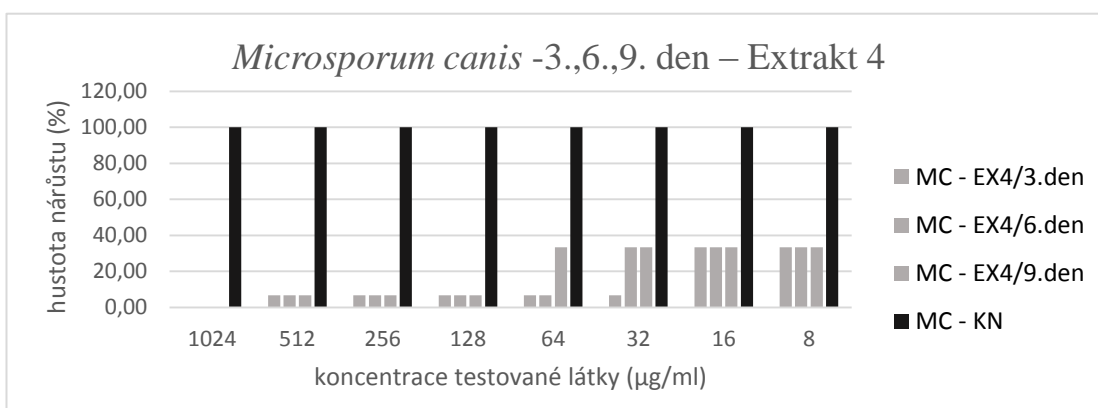
7.4 Extrakt 4

Extrakt 4 působil fungicidně pouze u *Microsporium canis* v koncentraci 1024 µg/ml. Dále u tohoto patogena měl fungistatický účinek až po nejnižší koncentraci 8 µg/ml. Dosahoval nejvyšší hustoty nárůstu 33 % proti kontrole nárůstu i 9. den v nejnižší koncentraci (graf 11). U dalších dvou testovaných patogenů byl jeho fungistatický účinek nižší, ale i přesto nejvyšší hodnota nárůstu 9. den při nejnižší koncentraci dosahovala proti kontrole nárůstu 75 % (graf 10). *Trichophyton interdigitale* 9. den sledování dosahoval stabilního výsledku hustoty nárůstu 67 % v rozmezí koncentrací 8 až 512 µg/ml testovaného extraktu v médiu (graf 12).



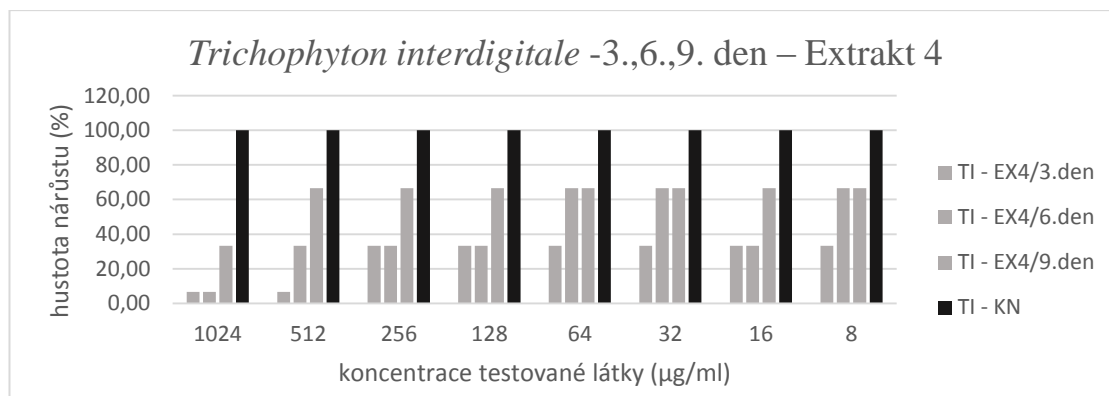
Graf 10: Extrakt 4 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 11: Extrakt 4 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

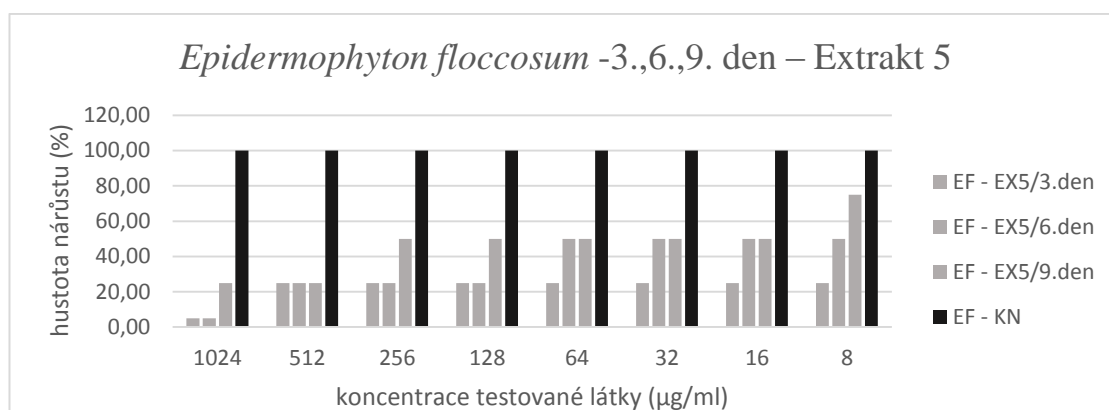


Graf 12: Extrakt 4 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

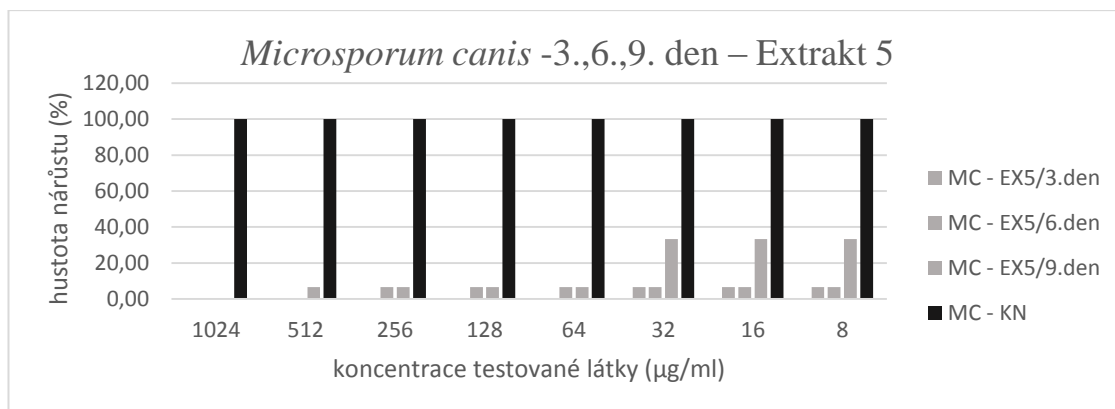
7.5 Extrakt 5

Extrakt 5 vykazoval fungicidní účinky pouze u *Microsporum canis* a to v koncentraci 1024 µg/ml. Jeho fungistatická aktivita byla velmi stabilní a 9. den sledování byla nejvyšší hodnota hustoty nárůstu pouze 33 % i v nejnižší koncentraci 8 µg/ml (graf 14). U *Epidermophyton floccosum* dosahovala hustota nárůstu 9. den v koncentraci 512 µg/ml hodnoty 25 % a její maximální hustota nárůstu 9. den v nejnižší sledované koncentraci 8 µg/ml nepřesáhla 75 % proti kontrole (graf 13). *Trichophyton interdigitale* měl v nejvyšší sledované koncentraci 1024 µg/ml 9. den sledování hustotu nárůstu 7%, přičemž v koncentraci 16 a 8 µg/ml vykazoval 9. den sledování hustotu nárůstu 100 % ve srovnání s kontrolou nárůstu.



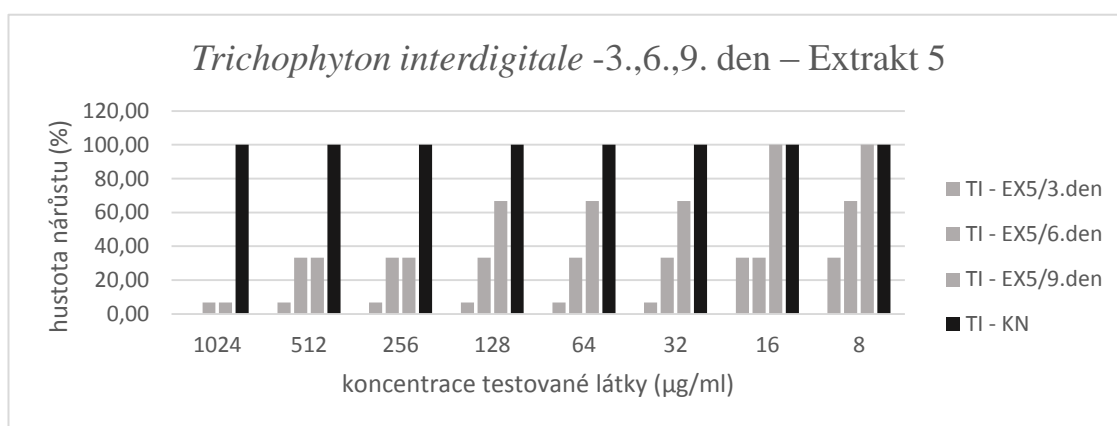
Graf 13: Extrakt 5 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 14: Extrakt 5 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



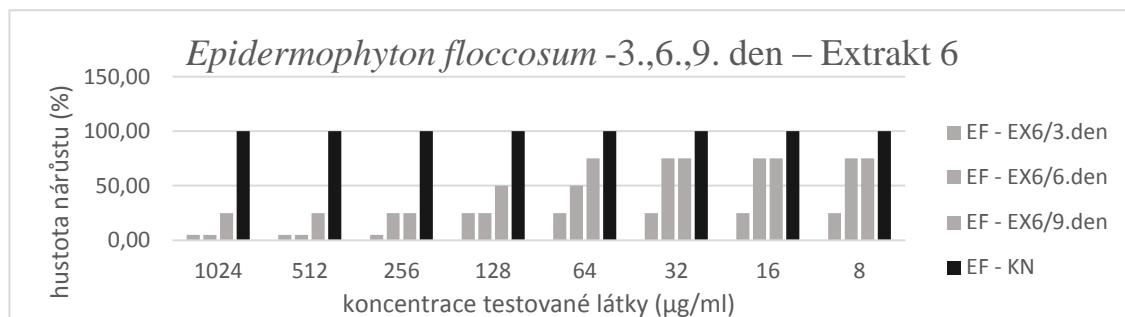
Graf 15: Extrakt 5 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

7.6 Extrakt 6

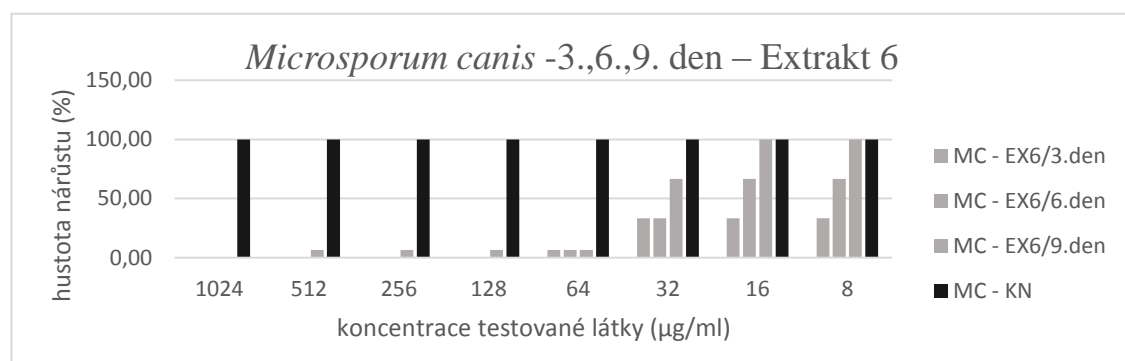
Extrakt 6 působil fungicidně u *Microsporium canis* v koncentraci 1024 µg/ml a u *Trichophyton interdigitale* v koncentraci 256 µg/ml. U *Microsporium canis* měl fungistatický účinek v koncentraci 64 µg/ml, kdy 9. den dosáhla jeho hustota nárůstu v této koncentraci 7 % hustoty nárůstu proti kontrole. Tento jeho účinek klesal a v koncentraci 16 µg/ml dosahoval 9. den sledování už 100 % hustoty nárůstu v porovnání s kontrolou nárůstu (graf 17). U *Trichophyton interdigitale* byla maximální hodnota hustoty nárůstu 9. den sledování 7% v koncentraci 64 µg/ml. Největší naměřená hodnota hustoty nárůstu tohoto mikroorganismu nepřesáhla 67 % proti kontrole nárůstu (graf 18). Tento extrakt působil

fungistaticky i na mikroorganismus *Epidermophyton floccosum*. Koncentrace 256 $\mu\text{g/ml}$ vykazovala 9. den sledování hustoty nárůstu hodnotu 25 % proti kontrole nárůstu a její maximální hustota nárůstu nepřesáhla 75 % (graf 16). *Trichophyton interdigitale* v koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$ nepřesahuje hustotu nárůstu 33 % proti kontrole nárůstu a maximální hodnota hustoty nárůstu je 67 % (graf 18).



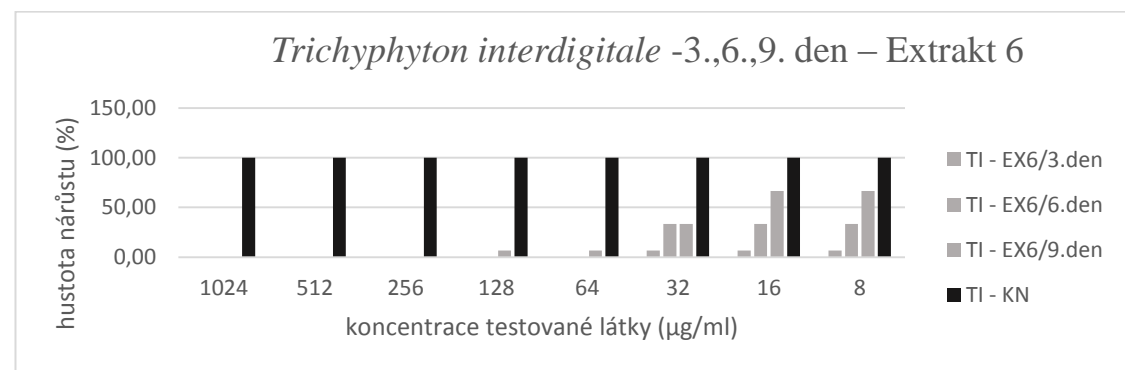
Graf 16: Extrakt 6 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 17: Extrakt 6 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

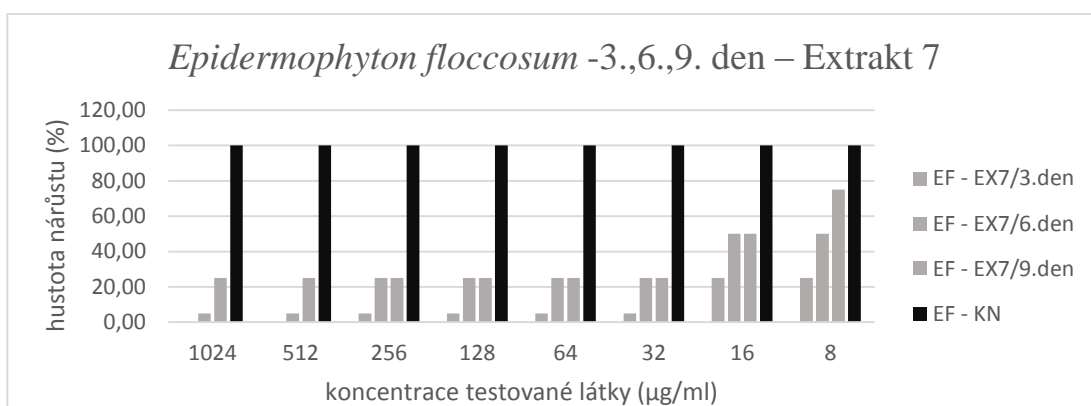


Graf 18: Extrakt 6 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

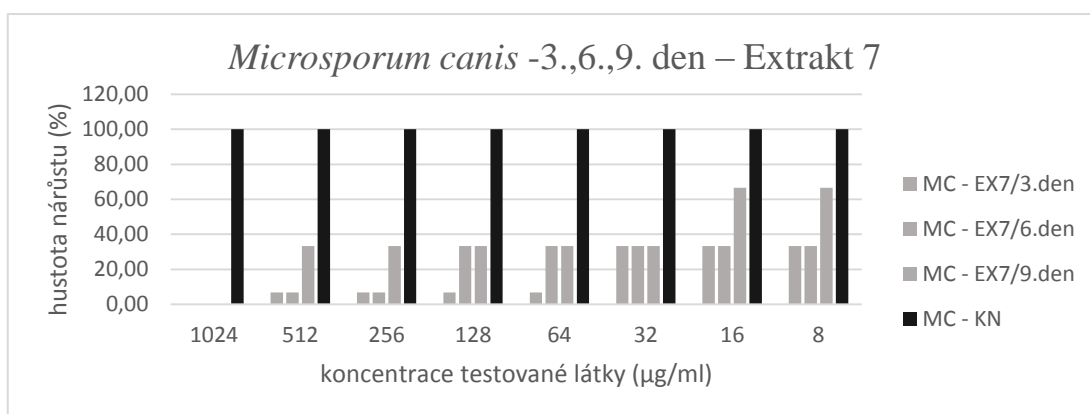
7.7 Extrakt 7

Tento extrakt vykazoval fungicidní aktivitu u dvou testovaných mikroorganismů. U *Trichophyton interdigitale* se projevila při koncentraci 256 $\mu\text{g/ml}$ (graf 21) a u *Microsporium canis* v koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$ (graf 20). U tohoto extraktu lze pozorovat stabilní fungistatický účinek. U *Epidermophyton floccosum* hustota nárůstu nepřesáhla 25% při koncentracích 32 až 1024 $\mu\text{g/ml}$. Maximální hustota nárůstu dosahovala 75 % proti kontrole nárůstu v nejnižší koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ (graf 19). U *Microsporium canis* byla hustota nárůstu v koncentracích 32 až 512 $\mu\text{g/ml}$ 33 % a nejvyšší hodnota hustoty nárůstu nepřesáhla 67 % proti kontrole nárůstu stejně jako u *Trichophyton interdigitale*.



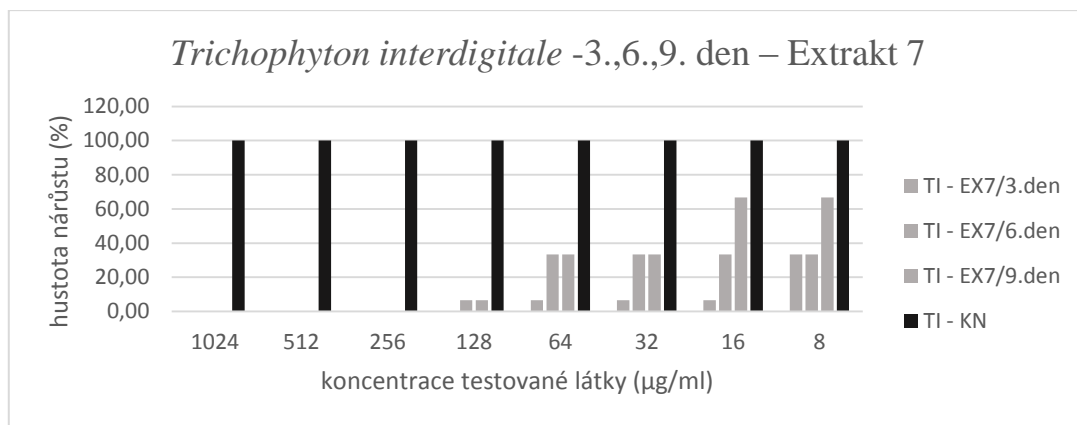
Graf 19: Extrakt 7 - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 20: Extrakt 7 - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

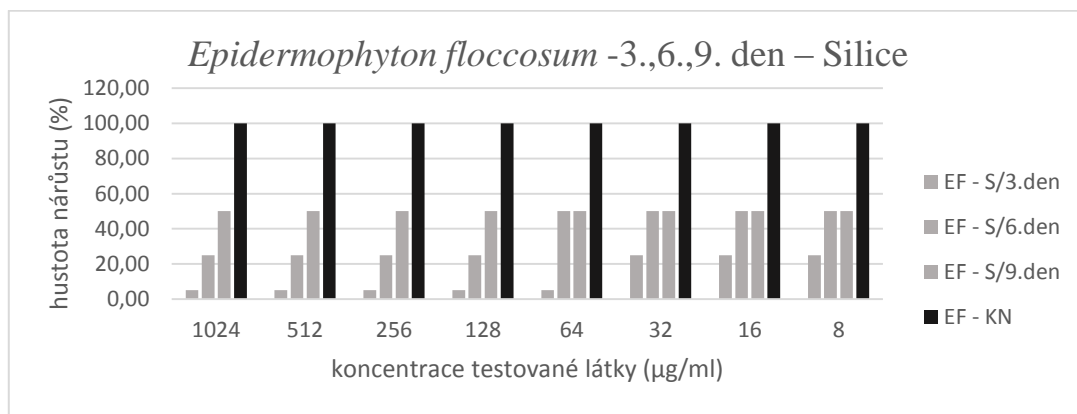


Graf 21: Extrakt 7 - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

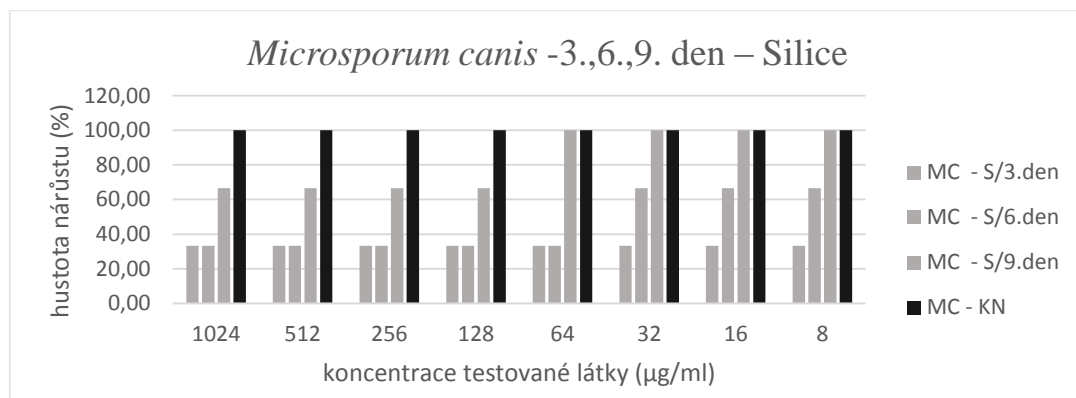
7.8 Silice

Silice nevykazovala fungicidní účinek u žádného z testovaných mikroorganismů. Nejvýraznější a nejstabilnější fungistatický účinek měla na patogen *Epidermophyton floccosum*, u nějž dosahovala 9. den sledování hustoty nárůstu maximální hodnoty 50 % oproti kontrole nárůstu u všech testovaných koncentrací, tj. v rozmezí 8 až 1024 µg/ml (graf 22). U *Microsporium canis* v rozmezí koncentrací 128 až 1024 µg/ml dosahovala hustoty nárůstu 67 % a od koncentrace 64 µg/ml to byla již hustota nárůstu 100% proti kontrole nárůstu (graf 23). *Trichophyton interdigitale* vykazoval v nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml hustotu nárůstu 33 %, ale od koncentrace 256 µg/ml a nižších dosahoval hustoty nárůstu 100 % proti kontrole nárůstu (graf 24).



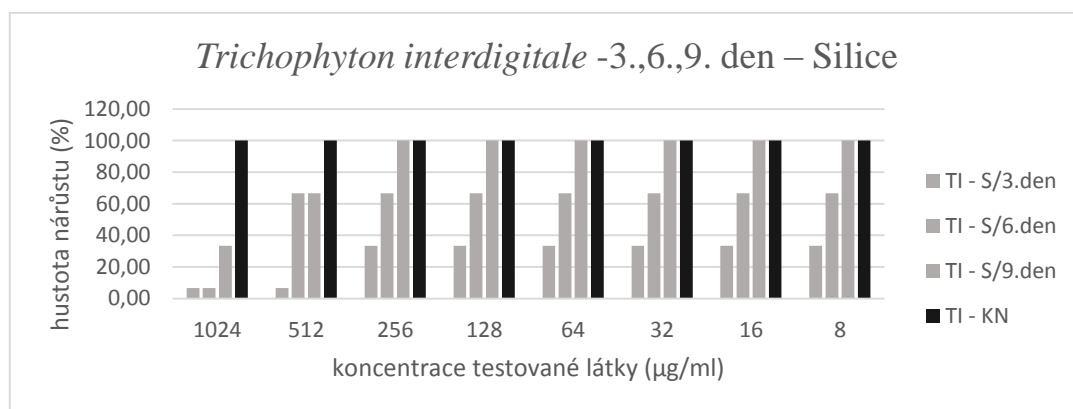
Graf 22: Silice - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 23: Silice - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

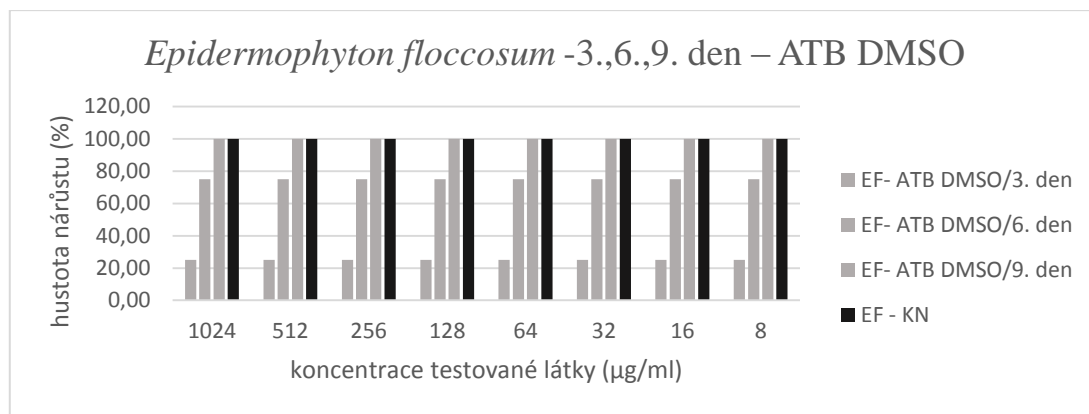


Graf 24: Silice - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

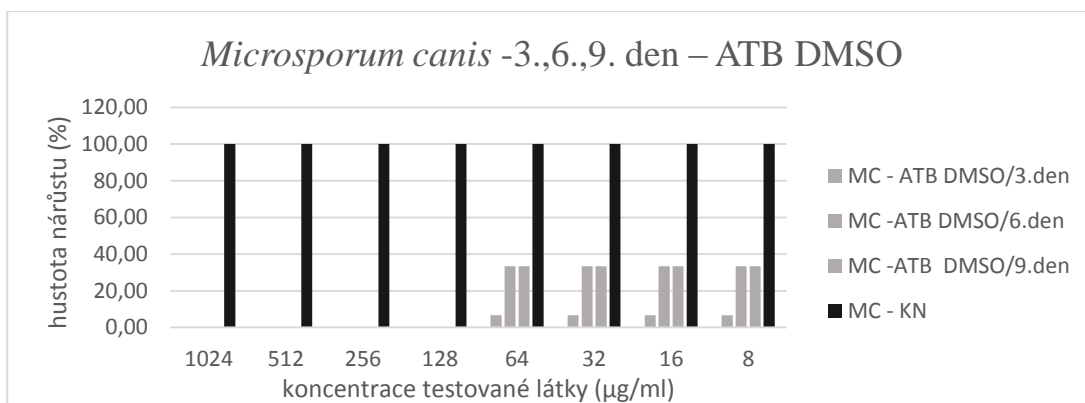
7.9 Antibiotikum rozpuštěné v DMSO

Tato testovaná látka měla fungicidní účinek pouze u patogenu *Microsporium canis* v koncentraci 128 µg/ml. U tohoto mikroorganismu dosahovala maximální hustota nárůstu pouze hodnoty 33 % proti kontrole nárůstu (graf 26). U patogenu *Trichophyton interdigitale* nebyla fungicidní aktivita pozorována, ale byla vysledována významná fungistatická aktivita, neboť hodnota hustoty nárůstu dosahovala v koncentracích 16 až 1024 µg/ml pouze 7 % proti kontrole nárůstu. Byl pozorován vysoký nárůst v koncentraci 8 µg/ml, kdy hustota nárůstu dosáhla 100 % proti kontrole nárůstu (graf 27). U mikroorganismu *Epidermophyton floccosum* došlo u všech testovaných koncentrací ke 100 % nárůstu proti kontrole nárůstu (graf 25).



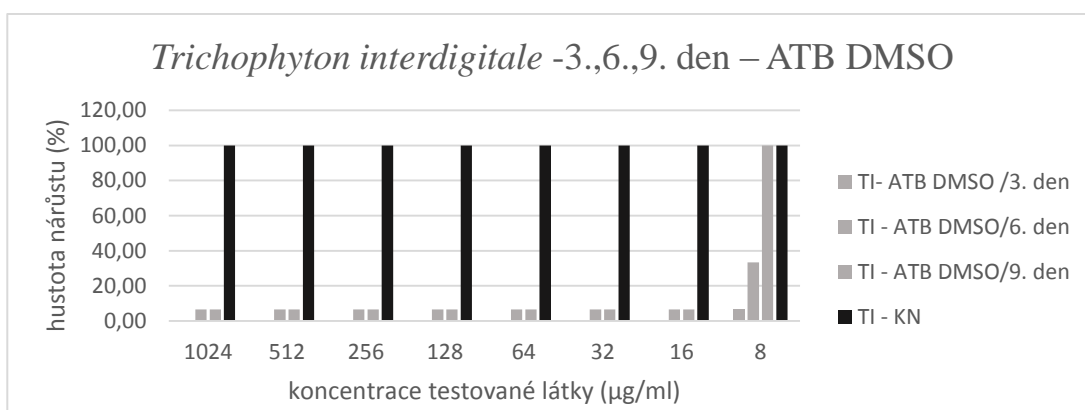
Graf 25: ATB - DMSO - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 26: ATB-DMSO - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

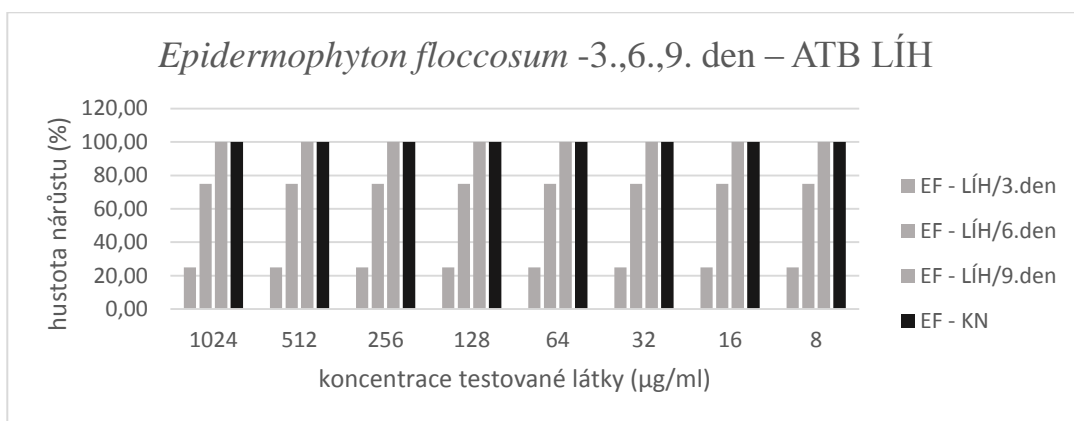


Graf 27: ATB - DMSO - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

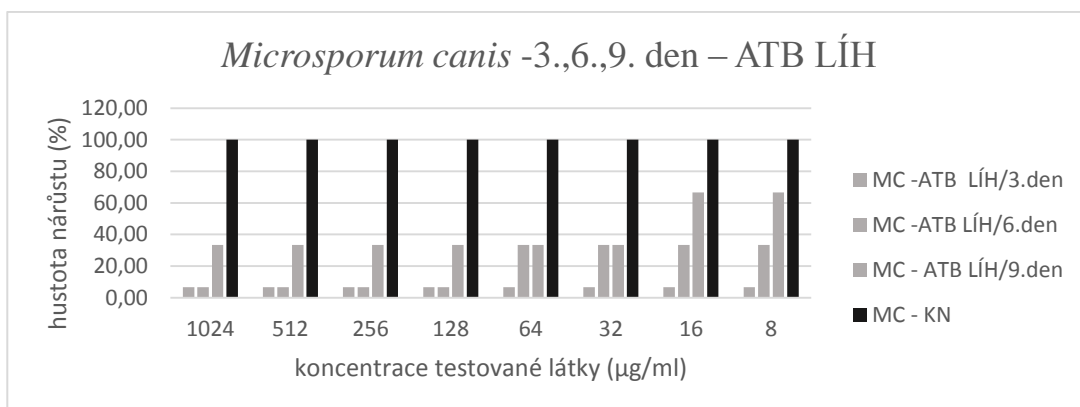
7.10 Antibiotikum rozpuštěné v lihu

Tato poslední testovaná látka nevykazovala žádnou fungicidní aktivitu. U mikroorganismu *Epidermophyton floccosum* byla pozorována hustota nárůstu ve všech sledovaných koncentracích 100 % proti kontrole nárůstu (graf 28). U zbývajících mikroorganismů toto antibiotikum působilo fungistaticky. U *Microsporium canis* byla pozorována hustota nárůstu v koncentracích 32 až 1024 $\mu\text{g/ml}$ 33 % proti kontrole nárůstu, v nižších koncentracích dosahovala maxima 67 % (graf 29). Hustota nárůstu u *Trichophyton interdigitale* v koncentracích 512 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ byla 7 %, v koncentracích 32 až 256 $\mu\text{g/ml}$ dosahovala hodnot 33% a v nejnižší koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$ byla hustota nárůstu 100 % proti kontrole nárůstu. U tohoto mikroorganismu bylo pozorováno, že 3. den sledování byla hustota nárůstu v koncentracích 16 až 1024 $\mu\text{g/ml}$ nulová oproti kontrole nárůstu (graf 30).



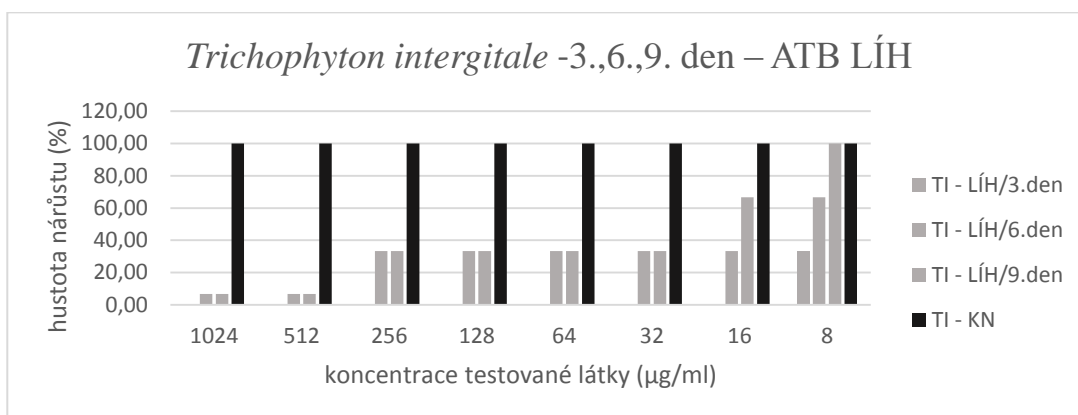
Graf 28: ATB - LÍH - hustota nárůstu *Epidermophyton floccosum* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 29: ATB - LÍH - hustota nárůstu *Microsporium canis* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka



Graf 30: ATB - LÍH - hustota nárůstu *Trichophyton interdigitale* 3., 6., a 9. den

Zdroj: autorka

8 Diskuze

Přírodní látky jsou dnes jedním z hlavních zdrojů nových molekul, které jsou zkoumány v souvislosti s objevením a aplikací nových léčebných prostředků. Tyto přírodní zdroje mohou poskytovat obrovské množství komplexních a strukturně různorodých sloučenin. Značná pozornost je v poslední době věnována výzkumu antimikrobiálního účinku rostlinných extraktů, silic a sekundárních metabolitů *in vitro*.

U testovaných extraktů konopí a silice proti vybraným dermatofytům byla prokázána v některých případech i fungicidní aktivita.

Epidermophyton floccosum vykazoval nejvyšší rezistenci vůči testovaným látkám i kontrolnímu antibiotiku griseofulvinu, který se v použitých koncentracích ukázal jako neúčinný. Na základě výsledků lze konstatovat, že všechny testované extrakty a silice vykazovaly fungistatickou aktivitu u tohoto mikroorganismu. Pouze u extraktu 3 dosáhla hustota nárůstu 100 % a to až v nižších koncentracích (8 až 32 µg/ml). Extrakty 5, 6 a 7 až do koncentrace 128 µg/ml inhibovaly nárůst plísně z 50 % v porovnání s kontrolou po celou dobu sledování. U testovaných extraktů se hustota nárůstu zvyšovala se snižující se koncentrací, zatímco u silice byl nárůst stabilní bez ohledu na koncentraci a nepřesáhl 50 %.

Microsporum canis se ukázal jako nejcitlivější z vybraných mikroorganismů k testovaným látkám. V nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml byla pozorována fungicidní aktivita u 7 z 10 testovaných látek. Griseofulvin rozpuštěný v lihu měl pouze fungistatický účinek zatímco griseofulvin rozpuštěný v DMSO působil až do koncentrace 128 µg/ml fungicidně, stejně jako extrakt 1 a 3. U extraktu 3, 4 a 5 ani v nejnižší koncentraci 8 µg/ml nepřesáhla hustota nárůstu 33 %.

Trichophyton interdigitale – fungicidní aktivita byla prokázána v nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml u extraktů 1, 6 a 7. Extrakt 1 má dobrou antifungální činnost pouze v koncentracích do 128 µg/ml. Griseofulvin nepůsobil fungicidně v žádné koncentraci, ale účinkoval v roztoku DMSO velmi dobře fungistaticky, neboť hustota nárůstu až do koncentrace 16 µg/ml nepřesáhla 7 %. Testovaná silice inhibovala růst plísně do koncentrace 512 µg/ml.

Rozdílná antifungální aktivita testovaných extraktů je zcela jistě dána jejich různým chemickým složením, značnou roli by mohlo sehrát zastoupení terpenických látek, které jsou v extraktu obsaženy a u kterých byla už v minulosti prokázána antimikrobiální aktivita (Russo, 2011). Terpenický profil testovaných látek bude v budoucnu analyzován. Prozatím

jsou k dispozici údaje o složení silic těchto chemotypů, kde převažují terpeny karyofylen a humulen.

Porovnání výše uvedených výsledků s literaturou je obtížné, neboť informace o antifungální aktivitě konopných extraktů nejsou dostupné. Srovnání s jinými testovanými přírodními látkami je možné, avšak je třeba vzít v úvahu, že testování není jednotné, např. jsou použity různé nestandardizované postupy přípravy inokula, různorodá média a podmínky a délka inkubace.

Při testování antifungálních účinků extraktů z listů rostlin *Calendula officinalis*, *Acacia arabica*, *Altheae officinalis*, *Ginkgo biloba*, *Juglans regia*, *Osimum basilicum*, *Solanum nigrum*, *Hypericum perforatum*, *Urtica dioica* a *Anagalis arvensis* proti *Epidermis floccosum*, *Microsporium canis* a *Trichophyton rubrum* vykazovaly všechny rostliny protiplísňovou aktivitu. Rozmezí jejich MIC se lišilo v závislosti na použité metodě. Při použití odhadu inhibiční zóny se pohybovala v rozmezí 1 až 16 µg/ml. V případě diluční agarové metody bylo rozmezí hodnot 300 až 12800 µg/ml a při diluční bujonové metodě byly tyto hodnoty 200 až 12500 µg/ml (Massiha et Muradov, 2015).

Z testovaných mikroorganismů (*Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii* a *Epidermophyton floccosum*) byl nejvíce rezistentní *Epidermophyton floccosum*. (Massiha et Muradov, 2015).

Největší inhibiční účinek z testovaných extraktů měla *Calendula officinalis* proti *Trichophyton rubrum* (66,6 % inhibice, kdy aktivita griseofulvinu představuje 100%) a proti *Epidermophyton floccosum* (inhibice 65 %) (Massiha et Muradov, 2015).

Antimykotické preparáty Amphotericin B, Clotrimazol, Iatroconazol, Ketoconazol, Miconazol, Fluconazol, G-1, Terbinafin, UR-9825 a Vorikonazol byly testovány proti 508 kmenům dermatofytů. S výjimkou flukonazolu a G-1, bylo prokázáno, že všechny antifungální látky jsou účinné. Kmeny *Epidermophyton floccosum* byly nejcitlivější k testované látce UR-9825, jejíž MIC se byla v rozmezí 0,01 až 0,5 µg/ml. Na kmeny *Microsporium canis* měl nejvyšší antimykotický účinek Clotrimazol (MIC 0,007 až 0,5 µg/ml) a u kmenů *Trichophyton interdigitale* byl zjištěn nejvyšší antifungální účinek u Clotrimazolu a Iatroconazolu, jejichž MIC se byla v rozmezí hodnot 0,01 až 0,5 µg/ml (Fernández-Torres et al., 2001).

Při výzkumu antifungální aktivity čajovníku *Melaleuca alternifolia* bylo potvrzeno, že všechny složky esenciálního oleje čajovníku mimo β-myrcenu, měly antifungální aktivitu. Nejvýznamnějšími složkami majícími MIC ≤0,25% byly terpinen-4-ol, linalool, α-pinen a

1,8-cineol. Kmeny *Epidermophyton floccosum* měly MIC 0,008 až 0,03 % v/v; *Microsporum canis* MIC 0,004 až 0,03 % v/v a *Trichophyton interdigitale* MIC 0,008 až 0,03 % v/v. Tyto hodnoty byly porovnávány s griseofulvinem, jehož MIC byla v rozmezí 250 až 1000 µg/ml (Hammer et al., 2003).

Testovaný esenciální olej čajovníku obsahoval terpinen-4-ol (41,5 %), γ -terpinen (21,2 %), α -terpinen (10,2 %), terpinolen (3,5 %), α -pinen (2,5 %), 1,8-cineol (2,1 %), aromadendren (1,0 %), limonen (0,9 %). Koncentrace β -myrcenu, β -pinenu, linaloolu a phelandrenu nebyly stanoveny (Hammer et al., 2003). Testovaný extrakt konopí genotypu McLove obsahoval terpeny humulen (4,9 %), karyofylen (11,1 %), linalyl acetát (7,2 %), guaiol (10,0 %), eudesmol (3,9 %), fenchol (3,3 %), limonen (2,7 %), pinanol (2,6 %) a další. Z výše uvedeného lze usoudit, že i silice se podílejí na fungistatické aktivitě.

Rozdílné výsledky v účincích jednotlivých silic mohou způsobeny několika faktory. Jedním z těchto faktorů může být i materiál pomůcek použitých k testování. Většina terpenů je ve vodném prostředí jen velmi málo rozpustná. Důležitým aspektem při testování antimikrobiální aktivity je dosažení a udržení solubilizace testované látky a fyzického kontaktu s testovaným mikroorganismem. Zvýšení koncentrace solubilního činidla Tween 80 z 0,001 na 0,1 % v mikrodilučním testu nevedlo k významně nižšímu MIC nebo MFC. Bylo prokázáno, že dalším faktorem, který může ovlivnit hodnoty MIC a MFC je interakce některých látek s určitými druhy plastů. Při testování čajovníkové silice byly potvrzeny významné rozdíly v MIC a MFC v závislosti na použití plastových anebo skleněných kultivačních misek. MIC a MFC byly výrazně nižší, když bylo použito laboratorní sklo. Rozpustnost složek hraje důležitou roli při hodnocení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů, neboť velikost zóny inhibice závisí na difuzi těchto látek, které jsou většinou ve vodě a vodném agarovém mediu nerozpustné (Hammer et al., 2003).

Dalším významným faktorem při srovnávání účinnosti antifungální aktivity různých látek je hustota inokula testovaných mikroorganismů. V některých studiích byla použita inokula v rozmezí hodnot 10^4 až 10^6 KTJ/ml (Fernández-Torres et al., 2001) anebo 10^3 KTJ/ml (Hammer et al., 2003). Rozmezí těchto hodnot se liší až o několik řádů, což může vést k významným rozdílům při srovnávání výsledků jednotlivých studií.

Rozdíly v antigungální aktivitě stejného antimykotika použitého jako kontrolní látky inhibující růst mikroorganismů mohou být způsobeny jednak čistotou látky, rozpouštědlem nebo případnými adjuvanty, které mohou antimykotickou aktivitu modifikovat.

9 Závěr

Na základě výsledků experimentu lze konstatovat, že hypotéza byla naplněna. U testovaných mikroorganismů byl prokázán fungistatický účinek u všech testovaných extraktů a silice. Fungicidní účinek měly pouze některé extrakty u patogenů *Microsporum canis* a *Trichophyton interdigitale*. Mezi testovanými konopnými extrakty a silicí byly rozdíly ve fungicidním i fungistatickém účinku mezi sebou navzájem, i u jednotlivých extraktů a testovaných mikroorganismů. Nejméně citlivý k testovaným látkám byl patogen *Epidermophyton floccosum*. Nejvýraznější fungistatickou aktivitu u tohoto mikroorganismu měl extrakt z chemotypu McLove, u kterého byla v koncentracích 32 -1024 µg/ml hustota nárůstu 25 % proti kontrole nárůstu a konopná silice ze stejného chemotypu, která ve všech testovaných koncentracích vykazovala 50% nárůst.

Microsporum canis vykazoval největší citlivost k testovaným látkám, zejména k extraktům z chemotypů Conspiracy Kush, Nurse Jackie a National Health Service. *Trichophyton interdigitale* byl nejcitlivější ke konopným extraktům z chemotypů Nordle a McLove, které shodně vykazovaly i fungicidní účinek.

Podrobnější analýzy a izolace jednotlivých látek a jejich následné testování, by mohlo vést k jednoznačné identifikaci látek mající přímou zodpovědnost za antifungální účinek proti vybraným patogenům.

10 Seznam použité literatury

Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N. 2013. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* .48 (1-2). 80-86. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.09.016. ISSN: 09280987.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol 6, Iss 2, Pp 71-79 (2016). 6 (2). 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN: 20951779.

BALTA, I., BRINZAN, L., STRATAKOS, A. C., LINTON, M., KELLY, C., PINKERTON, L., CORCIONIVOSCHI, N. 2017. Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, Vol 74, Iss 2, Pp 157-161 (2017). 74 (2). 157-161. DOI: 10.15835/buasvmcn-asb:0025. ISSN: 18435262.

Blasi, E., Mucci, A., Neglia, R., Pezzini, F., Colombari, B., Radzioch, D., Andrea Cossarizza, Lugli, E., Volpini, G., Giudice, G. D., Peppoloni, S. 2005. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunology*. 44 (1). 69-79 DOI: 10.1016/j.femsim.2004.12.005. ISSN: 09288244.

Bonamin, F., Moraes, T. M., dos Santos, R. C., Kushima, H., Faria, F. M., Silva, M. A., Junior, I. V., Nogueira, L., Bauab, T. M., Souza Brito, A. R. M., da Rocha, L. R. M., Hiruma-Lima, C. A. 2014. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chemico-Biological Interactions*. 212. 11-19. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.009. ISSN: 00092797.

James Bound, D., Murthy, P. S., Srinivas, P. 2016. 2,3-Dideoxyglucosides of selected terpene phenols and alcohols as potent antifungal compounds. *Food Chemistry*. 210. 371-380. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.127. ISSN: 03088146.

Bovens, M., Schlapfer, M., Fiddian, S., Holmes, A., Huizer, H. 2009. *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products.: Manual for use by national drug analysis laboratories*. United Nations Office on Drugs and Crime: Unodc. United Nations Publications. Austria. . 60. ISBN: 978-92-1-148242-3.

Braun-Falco, O., Wolff, H. H., Plewig, G. 2001. Dermatológia a venerológia. Osveta. Martin. ISBN: 80-8063-080-1.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., White, T. C. 2012. Hidden killers: human fungal infections. 2012. 4 (165).10.1126/scitranslmed.3004404.

Carvalho-Freitas, M. I. R., Costa, M. 2012. Anxiolytic and Sedative Effects of Extracts and Essential Oil from *Citrus aurantium* L. 25 (12). 1629-1633. DOI: 10.1248/bpb.25.1629. ISSN: 09186158.

Casano, S., Grassi, G., Martini, V., Michelozzi, M. 2011. Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa* L. *Acta horticulturae*. (925). ISSN: 05677572.

Dias, I. J., Trajano, E. R. I. S., Castro, R. D., Ferreira, G. L. S., Medeiros, H. C. M., Gomes, D. Q. C. 2017. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis / Atividade antifúngica do linalol em casos de *Candida* spp. isolados de indivíduos com candidíase oral. *Brazilian Journal of Biology*. DOI: 10.1590/1519-6984.171054. ISSN: 16784375.

Dvořáková, M., Valterová, I., Vaněk, T. 2011. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*. 105 (11). 839-845. ISSN: 0009-2770.

ElSohly, M. A., Slade, D. 2005. Minireview: Chemical constituents of marijuana. *Life Sciences*. 78 (5). 539-548. (cit. 2018-02-08). DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.011. ISSN: 00243205.

Essid, R., Hammami, M., Gharbi, D., Karkouch, I., Hamouda, T., Elkahoui, S., Limam, F., Tabbene, O. 2017. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Applied Microbiology*. 101 (18). 6993-7006. DOI: 10.1007/s00253-017-8442-y. ISSN: 01757598.

Fernández-Torres, B., Carrillo, A. J., Martín, E., Del Palacio, A., Moore, M. K., Valverde, A., Serrano, M., Guarro, J. 2001. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 (9). 2524-2528. ISSN: 00664804.

- Flores-Sanchez, I. J., Peč, J., Fei, J., Choi, Y. H., Dušek, J., Verpoorte, R. 2009. Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *Journal of Biotechnology*. 143 (2). 157-168. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.05.006. ISSN: 01681656.
- Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., Smith, K. M. 2015. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *Journal of AOAC International*. 98 (6). 1503-1522. DOI: 10.5740/jaoacint.15-116. ISSN: 10603271.
- Gul Baykalir, B., Ciftci, O., Cetin, A., Oztanir Mustafa, N., Basak Türkmen, N. 2016. The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia/reperfusion in C57BL/J6 mouse. *Acta Cirurgica Brasileira*. 31 (7). 456. DOI: 10.1590/S0102-865020160070000005. ISSN: 16782674.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R., Reyes-Chilpa, R. 2015. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life Sciences*. 128. 24-29. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.02.021. ISSN: 00243205.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*. 95 (4). 853-860. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x. ISSN: 13645072.
- Hanuš, L. O. 2012. Endogenní kanabinoidy, receptory, fyziologické role. *Revue České lékařské akademie*. 8. 8-12. ISSN: 1214-8881.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., Friedrich, M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. John Wiley. 4 (51). 2-15. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x.
- Holland, J., Weil, A., Pollan, M., Grinspoon, L., St. Pierre, A., Abrams, D. I. 2014. *Tráva: Kompletní průvodce světem marihuany v medicíně, vědě, kultuře a politice*. Praha. PRAGMA. 455 s. ISBN: 978-80-7349-408-7.
- Hořejší, V., Říhová, B. 2002. *Základy imunologie*. 2. TRITON. Praha. 260 s. ISBN: 80-7254-215-x.

- Champagne, A., Boutry, M. 2016. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *BBA – Proteins and Proteomics*. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.02.010. ISSN: 15709639.
- Chen Jun., Qiu-Dong Jiang, Ya-Ping Chai, Hui Zhang, Pei Peng, Xi-Xiong Yang. 2016. Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Molecules*. 21 (12). 1-22. DOI: 10.3390/molecules21121709. ISSN: 14203049.
- Ji, J., Zhang, L., Wu, Y. -Y., Zhu, X. -Y., Lv, S. -Q., Sun, X. -Z. 2016. Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. *December 2006;47(12): 2617-2624. http. Leukemia*. 57 (5). 1242-1242. DOI: 10.3109/10428194.2016.1158953. ISSN: 10428194.
- Khan, M. S. A., Ahmad, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag. (3). 1083-1094. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3152-3>. ISSN: 1432-0614.
- Li, L., Chaofeng, S., Zhongqiong, Y., Renyong, J., Lianci, P., Shuai, K., Zhengwen, L. 2014. Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol 45, Iss 4, Pp 1409-1413 (2014). 45 (4). 1409-1413. ISSN: 16784405.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Sokeng, A. J. T., Izadi, M., Jafari, N. J., Suntar, I., Daglia, M., Nabavi, S. M. 2017. Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. *Materials (1996-1944)*. 10 (8). 1-15. DOI: 10.3390/ma10080947. ISSN: 19961944.
- Massiha, A., Muradov, P. Z. 2015. Comparison of Antifungal Activity of Extracts of Ten Plant Species and Griseofulvin Against Human Pathogenic Dermatophytes. *Majallah-i taḥqīqāt-i 12ulūm-i pizishkī-i Zāhidān*, Vol 17, Iss 10, Pp 1-7 (2015). 17 (10). 1-7. ISSN: 22286403.
- Mechoulam, R., Hanuš, L. 2000. Review: A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 108 (1). 1-13. DOI: 10.1016/S0009-3084(00)00184-5. ISSN: 00093084.

- Miovský, M., Blaha, T., Dědičová, M., Dvořáček, J., Gabrhelík, R., Gabrielová, H., Gajdošíková, H., Hanuš, L. O., Horáček, J., Krměčık, P., Kubů, P., Miovská, L., Ouštěcká-Neradová, A. B., Nerad, J. M., Radimecký, J., Ruman, M., Sivek, V., Šejvl, J., Šulcová, A., Vacek, J., Vopravil, J., Vorel, F., Zábanský, T. 2008. Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium. Grada. Praha. 533 s. ISBN: 9788024708652.
- Montanari, R. M., Barbosa, L. C. A., Demuner, A. J., Silva, C. J., Carvalho, L. S., Andrade, N. J. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Química Nova*. 34 (9). 1550. DOI: 10.1590/S0100-40422011000900013. ISSN: 01004042.
- Naz, S., Hanif, M. A., Bhatti, H. N., Ansari, T. M. 2017. Impact of Supercritical Fluid Extraction and Traditional Distillation on the Isolation of Aromatic Compounds from *Cannabis indica* and *Cannabis sativa*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 20 (1). 175-184. DOI: 10.1080/0972060X.2017.1281766. ISSN: 0972060X.
- Neelofar, K., Shreaz, S., Rimple, B., Muralidhar, S., Nikhat, M., Khan, L. A. 2011. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Canadian Journal of Microbiology*. 57 (3). 204-209. ISSN: 00084166.
- 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. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.11.010. ISSN: 0367326X.
- Oliveira, C. C. de, Oliveira, C. V. de, Grigoletto, J., Ribeiro, L. R., Funck, V. R., Grauncke, A. C. B., Souza, T. L. de, Souto, N. S., Furian, A. F., Menezes, I. R. A., Oliveira, M. S. 2016. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy*. 56. 26-31. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.12.040. ISSN: 15255050.
- Park, B. J., Park, J. -C., Taguchi, H., Fukushima, K., Hyon, S. -H., Takatori, K. 2006. Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 347 (2). 401-405.. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.06.037. ISSN: 0006291X.
- Peč, J., Dušek, J. 2009. Konopí, konopná droga a související léčivé přípravky. *Praktické lékařství*. Solen, s.r.o. Praha. 5 (4). 189 -193. ISSN: 1803-5329.

- Pemán, J., Cantón, E., Espinel-Ingroff, A. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 7 (4). 453-460. ISSN: 14787210.
- Rivera-Yañez, C. R., Terrazas, L. I., Jimenez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernandez, L. B., Cruz-Sanchez, T., Garrido-Fariña, G. I., Rodriguez-Monroy, M. A., Canales-Martinez, M. M. 2017. Anti-Candida Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ Terpinene--An In Vitro Study. *Molecules*. 22 (12). 1-13. DOI: 10.3390/molecules22122095. ISSN: 14203049.
- Ross, S. A., Elsohly, M. A. 1996. The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*. *Journal of natural products (USA)*. 59 (1). 49-51. ISSN: 01633864.
- Russo, E. B. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 163 (7). 1344-1364. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x. ISSN: 00071188.
- Samber, N., Khan, A., Varma, A., Manzoor, N. 2015. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharmaceutical Biology*. 53 (10). 1496-1504. DOI: 10.3109/13880209.2014.989623. ISSN: 13880209.
- Selestino Neta, M. C., Vittorazzi, C., Guimarães, A. C., Martins, J. D. L., Fronza, M., Endringer, D. C., Scherer, R. 2017. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*. 55 (1). 190-197. DOI: 10.1080/13880209.2016.1254251. ISSN: 13880209.
- Suchopár, J. (ed.). 1997. *Remedia Compendium*. 2. přepac. a rozš. vyd. PANAX. Praha. ISBN: 80-902-1263-8.
- Sun, X. -B., Wang, S. -M., Li, T., Yang, Y. -qing. 2015. Anticancer Activity of Linalool Terpenoid: Apoptosis Induction and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 14 (4). 619-625. DOI: 10.4314/tjpr.v14i4.9. ISSN: 15965996.
- Špičáková, A., Szotáková, B., Dimunová, D., Myslivečková, Z., Kubíček, V., Ambrož, M., Lněničková, K., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L. 2017. Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-Metabolizing

- Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. *Molecules*. 22 (4). 1-11. DOI: 10.3390/molecules22040509. ISSN: 14203049.
- Tambe, Y., Tsujiuchi, H., Honda, G., Ikeshiro, Y., Tanaka, S. 1996. Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene. *Planta Medica*. 62 (5). 469-470. ISSN: 00320943.
- Thakur GA, Duclos RI Jr, Makriyannis A. 2005. Natural cannabinoids: templates for drug discovery. *Life Sciences*. 78 (5). 454-66. ISSN: 00243205.
- Warf, B. 2014. High Points: An Historical Geography of Cannabis. *Geographical Review*. 104 (4). 414-438. DOI: 10.1111/j.1931-0846.2014.12038.x. ISSN: 00167428.
- Wichtl, M. 2004. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis. 3rd expanded and completely rev. ed. CRC Press. Boca Raton, FL. ISBN: 978-084-9319-617.
- Yu-Jen Jou, Chun-Hung Hua, Chen-Sheng Lin, Ching-Ying Wang, Lei Wan, Ying-Ju Lin, Su-Hua Huang, Cheng-Wen Lin. 2016. Anticancer Activity of γ -Bisabolene in Human Neuroblastoma Cells via Induction of p53-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecules*. 21 (5). 601-611. DOI: 10.3390/molecules21050601. ISSN: 14203049.
- Zacchino, S. A., Butassi, E., Liberto, M. D., Raimondi, M., Postigo, A., Sortino, M. 2017. Review: Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine*. 37. 27-48. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.10.018. ISSN: 09447113.
- Zima, T. 2012. Biochemické stanovení produktů metabolismu kanabinoidů. *Revue České lékařské akademie*. 8 (8). 13-15. ISSN: 1214-8881.
- Zhou, H., Tao, N., Jia, L. 2014. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*. 37. 277-283. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.09.057. ISSN: 09567135.
- Zou, L., Zhang, Y., Li, W., Zhang, J., Wang, D., Fu, J., Wang, P. 2017. Comparison of Chemical Profiles, Anti-Inflammatory Activity, and UPLC-Q-TOF/MS-Based Metabolomics in Endotoxic Fever Rats between Synthetic Borneol and Natural Borneol. *Molecules*. 22 (9). 1-15. DOI: 10.3390/molecules22091446. ISSN: 14203049.

11 Seznam použitých zkratek

CB	canabinoid receptor
CBC	kanabichromen
CBCA	kyselina kanabichromenová
CBD	kanabidiol
CBE	kanabielsoin
CBG	kanabiergol
CBL	kanabicyklol
CBN	kanabinol
CBN	kanabinol
CBND	kanabinodiol
CBT	kanibitriol
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CD4	typ T _H
CD8	typ T _C
CLR	lektinový receptor typu C
ČZU	Česká zemědělská univerzita v Praze
DMSO	dimetylsuloxid
EF	<i>Epidermophyton floccosum</i>
IL	interleukin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KTJ	kolonie tvořící jednotky
MC	<i>Microsporium canis</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NK (natural killer cell)	cytotoxické buňky imunitního systému
pH	angl. potential of hydrogen, lat. pondus hydrogenia
př. n. l.	před naším letopočtem
T _C	cytotoxické T lymfocyty

T _H (helper)	pomocné T lymfocyty
THC	tetrahydrokanabinol
THCA	kyselina tetrahydrokanabinolová
THCV	tetrahydrokanabivarin
TLR	Toll-like receptor
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
UV	ultraviolet (ultrafialové)
Δ8-THC	Δ8-trans-tetrahydrokanabinol
Δ9-THC	Δ9-trans-tetrahydrokanabinol

12 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Seznam obrázků

Obrázek 1: rostlina <i>Canabis sativa</i>	5
Obrázek 2: Silice.....	9
Obrázek 3: Konopná silice.....	11
Obrázek 4: <i>Epidermophyton floccosum</i>	12
Obrázek 5: <i>Microsporum canis</i>	13
Obrázek 6: <i>Trichophyton interdigitale</i>	13
Obrázek 7: <i>Candida albicans</i>	14
Obrázek 8: Onychomykóza	16
Obrázek 9: Schéma produkce cytokinů imunitním systémem a aktivace T buněk na základě signálů indukovaných bakteriemi	18

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled farmakologické aktivity kanabinoidů bez psychogenních účinků.....	7
Tabulka 2: přehled významných terpenů a jejich účinků	10
Tabulka 3: Specifická antimykotika dělená na základě chemického složení (Suchopár, 1997; Zacchino et al., 2017).....	20
Tabulka 4: další specifická antimykotika (Suchopár, 1997; Zacchino et al., 2017).....	20
Tabulka 5: Identifikace jednotlivých vzorků a obsah THC a CBD v květenství (%)	25
Tabulka 6: Stupnice hodnocení nárůstu mikroorganismů	28
Tabulka 7: Fungicidní koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) testovaných látek	29
Tabulka 8: Hodnoty hustoty nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> vyjádřené v procentech vztahené k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích ($\mu\text{g/ml}$), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci	30
Tabulka 9: Hodnoty hustoty nárůstu <i>Microsporum canis</i> vyjádřené v procentech vztahené k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích ($\mu\text{g/ml}$), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci.....	31

Tabulka 10: Hodnoty hustoty nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> vyjádřené v procentech vztážené k maximálnímu nárůstu při testování vybraných látek v 8 různých koncentracích (µg/ml), které byly odečítány 3., 6. a 9. den po inokulaci	32
--	----

Seznam grafů

Graf 1: Extrakt 1 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	33
Graf 2: Extrakt 1 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	33
Graf 3: Extrakt 1 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	34
Graf 4: Extrakt 2 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	34
Graf 5: Extrakt 2 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	35
Graf 6: Extrakt 2 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	35
Graf 7: Extrakt 3 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	36
Graf 8: Extrakt 3 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	36
Graf 9: Extrakt 3 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	36
Graf 10: Extrakt 4 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	37
Graf 11: Extrakt 4 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	37
Graf 12: Extrakt 4 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	38
Graf 13: Extrakt 5 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	38
Graf 14: Extrakt 5 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	39
Graf 15: Extrakt 5 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	39
Graf 16: Extrakt 6 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	40
Graf 17: Extrakt 6 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	40
Graf 18: Extrakt 6 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	40
Graf 19: Extrakt 7 - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	41
Graf 20: Extrakt 7 - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	41
Graf 21: Extrakt 7 - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	42
Graf 22: Silice - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den.....	42
Graf 23: Silice - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den	43

Graf 24: Silice - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den	43
Graf 25: ATB - DMSO - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den	44
Graf 26: ATB-DMSO - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	44
Graf 27: ATB - DMSO - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den.....	44
Graf 28: ATB - LÍH - hustota nárůstu <i>Epidermophyton floccosum</i> 3., 6., a 9. den.....	45
Graf 29: ATB - LÍH - hustota nárůstu <i>Microsporum canis</i> 3., 6., a 9. den.....	45
Graf 30: ATB - LÍH - hustota nárůstu <i>Trichophyton interdigitale</i> 3., 6., a 9. den	46