

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Antimikrobiální a cytotoxická aktivita
přírodních extraktů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Gramesová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Gramesová
Název práce	Antimikrobiální a cytotoxická aktivita přírodních extraktů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývá stanovením antimikrobiální aktivity, aktivací transkripčního faktoru Nrf2 na buněčné linii EpRE – LUX a stanovením cytotoxicity na buněčné linii BJ. Testovány byly extrakty z včely medonosné, mravence obecného, ruměnice pospolné, slunéčka východního, sklípkana kadeřavého, muchomůrky červené a lišejníků <i>Cladonia coniocraea</i> a <i>Cladonia fimbriata</i>. Transkripční faktor Nrf2 byl aktivován (≥ 200 %) extrakty <i>C. fimbriata</i>, muchomůrka – klobouk, muchomůrka – třeň, včela medonosná a mravenec obecný. Vzorky <i>C. coniocraea</i>, muchomůrka – noha, včela medonosná a slunéčko východní působily cytotoxicky a ruměnice pospolná a mravenec obecný zvyšovali viabilitu buněk. Vzorek s nejvyšší antimikrobiální aktivitou byl extrakt z lišejníku <i>C. coniocraea</i>, který byl aktivní vůči mikroorganismům <i>Enterococcus faecalis</i> (0,51 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (1,01 mg/ml), <i>Streptococcus mutans</i> (0,51 mg/ml), <i>Bacillus cereus</i> (0,25 mg/ml), <i>Actinomyces odontolyticus</i> (0,13 mg/ml) a <i>Clostridium perfringens</i> (0,13 mg/ml).</p>
Klíčová slova	Antimikrobiální aktivita, cytotoxicita, Nrf2, přírodní extrakt
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucie Gramesová
Title of thesis	Antimicrobial and cytotoxic activities of natural extracts
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The bachelor thesis deals with the determination of antimicrobial activity, activation of the transcription factor Nrf2 using cell line EpRE – LUX and determination of cytotoxicity to BJ cell line. Extracts from European honeybee, black garden ant, firebug, Asian ladybeetle, curlyhair tarantula, fly agaric and lichens <i>Cladonia coniocraea</i> and <i>Cladonia fimbriata</i> were tested. The transcription factor Nrf2 was activated ($\geq 200\%$) by extracts <i>C. fimbriata</i>, fly agaric – cap, fly – agaric – stipe, European honeybee and black garden ant. Samples <i>C. coniocraea</i>, fly agaric, European honeybee and Asian ladybeetle were cytotoxic and firebug and black garden ant increased cell viability. The sample with the highest antimicrobial activity was <i>C. coniocraea</i> extract, which was active against <i>Enterococcus faecalis</i> (0,51 mg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (1,01 mg/ml), <i>Streptococcus mutans</i> (0,51 mg/ml), <i>Bacillus cereus</i> (0,25 mg/ml), <i>Actinomyces odontolyticus</i> (0,13 mg/ml) and <i>Clostridium perfringens</i> (0,13 mg/ml).</p>
Keywords	Antimicrobial activity, cytotoxicity, Nrf2, natural extracts
Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Lucie Gramesová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady, odborné vedení a trpělivost během tvorby bakalářské práce.

Dále děkuji Mgr. Lucii Slobodianové za veškerou pomoc a rady v laboratoři a také RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. za spolupráci a pomoc při testování antimikrobiální aktivity.

Tato bakalářská práce byla řešena s podporou interního grantu IGA_PrF_2020_021.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
2 Cíle práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Mikroorganismy	11
3.1.1 Grampozitivní a gramnegativní bakterie.....	13
3.1.2 Antibiotika	16
3.1.3 Přírodní antimikrobiální látky	19
3.2 Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i> (L.)).....	21
3.3 Mravenec obecný (<i>Lasius niger</i> (L.)).....	22
3.4 Ruměnice pospolná (<i>Pyrrhocoris apterus</i> (L.)).....	23
3.5 Slunéčko východní (<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas)).....	23
3.6 Sklípan kadeřavý (<i>Brachypelma albopilosum/Tliltocatl albopilosum</i> (Mendoza)).....	24
3.7 Muchomůrka červená (<i>Amanita muscaria</i> (L.)).....	25
3.8 Lišejníky.....	26
3.8.1 Kyselina usnová	26
3.8.2 Puklérka islandská (<i>Cetraria islandica</i> (L.)).....	27
3.9 Cytotoxicita.....	27
3.10 Použité metody.....	28
3.10.1 Extrakce	28
3.10.2 Pasážování buněk.....	28
3.10.3 Nrf2	29
3.10.4 Mikrodiluční metoda.....	29
4 Materiál a metody	30
4.1 Biologický materiál.....	30
4.2 Použité chemikálie	31

4.3	Příprava roztoků:.....	32
4.4	Kultivační půdy.....	32
4.5	Přístrojové vybavení.....	33
4.6	Metody	34
4.6.1	Extrakce	34
4.6.2	Pasážování buněk.....	34
4.6.3	Nrf2 assay	35
4.6.4	Stanovení cytotoxicity.....	36
4.6.5	Testování antimikrobiální aktivity látek mikrodiluční metodou.....	36
5	Výsledky	38
5.1	Nrf2 assay.....	38
5.2	Stanovení cytotoxicity.....	39
5.3	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	40
6	Diskuze.....	42
7	Závěr	45
8	Literatura.....	46

Seznam použitých zkratek

DW	hmotnost suchého materiálu
FW	hmotnost čerstvého materiálu
EMEM	Eagle's minimum essential medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
PBS	fosfátový pufr (<i>Phosphate - Buffered Saline</i>)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

1 Úvod

Mikroorganismy jsou významnými patogeny, které způsobují celou řadu nemocí. K léčbě infekčních onemocnění jsou hojně využívány antimikrobiální látky, kam řadíme i antibiotika.

Bakterie si však v důsledku jejich nadměrného užívání začaly vytvářet prostřednictvím řady mechanismů rezistenci, která je velkou překážkou v léčbě infekčních onemocnění (Krzyściak et al., 2013). Proto je důležité hledat nové látky, které vykazují antimikrobiální vlastnosti a řada z nich se nachází v přírodě.

Předmětem této bakalářské práce bylo stanovit antimikrobiální a cytotoxickou aktivitu přírodních extraktů získaných z včely medonosné, mravence obecného, ruměnice pospolné, slunéčka východního, sklípkana kadeřavého, muchomůrky červené a lišejníků *Cladonia coniocraea* (Flörke) a *Cladonia fimbriata* (L.). A dále zjistit, zda některý z těchto extraktů aktivuje dráhu transkripčního faktoru Nrf2, který moduluje oxidativní stres, průvodní jev řady onemocnění, a také může pomoci zamezit přeměně nádoru na maligní (Surh et al., 2008).

2 Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat rešerši zabývající se problematikou mikroorganismů a antimikrobiálních látek.

Cílem experimentální části bylo extrahovat přírodní látky a stanovit na těchto extraktech antimikrobiální a cytotoxickou aktivitu. Dále pak zjistit, zda nějaký z přírodních extraktů aktivuje dráhu transkripčního faktoru Nrf2.

3 Teoretická část

3.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy jsou nejstaršími organismy na Zemi a jejich stáří se obvykle uvádí na 3,5 miliard let (Line, 2002). Existuje ale studie zkoumající textury na horninách v Grónsku, která naznačuje, že mikroorganismy mohou být starší (Allwood et al., 2018). Mezi mikroorganismy řadíme bakterie, archaea, protozoa, plísně, kvasinky, některé řasy a je možné zde zařadit nebuněčné organismy jako jsou viry.

Mikroorganismy se vyskytují ve vzduchu, vegetaci, v půdě, v potravě, ve všech typech vody a v symbióze s jinými organismy. Některé jsou dokonce schopny přežít v extrémních podmínkách jako je vysoká teplota (65 - 105 °C) nebo vysoký tlak (Allen et al., 2004; Brock, 1985; Seufferheld et al., 2008). V ekosystému mají mikroorganismy důležitou roli při rozkladu biomasy a koloběhu látek, zejména uhlíku, síry a dusíku. Některé druhy se podílí i na fixaci vzdušného dusíku v amonné kationty nebo na produkci kyslíku. (Zhou et al., 2009).

Člověk využívá řadu mikroorganismů v čistírnách odpadních vod a při výrobě biopaliv z nevyužitého zdroje rostlinné biomasy, takzvané lignocelulózy (S. K. Lee et al., 2008). Široké využití mají v potravinářství, například při výrobě fermentovaných potravin, piva, vína či chleba a ve farmaceutickém průmyslu, kde jsou součástí vakcín, antibiotik a probiotik. Mikroorganismy významně přispívají také ve výzkumu, kde slouží jako modelové organismy (Legras et al., 2007).

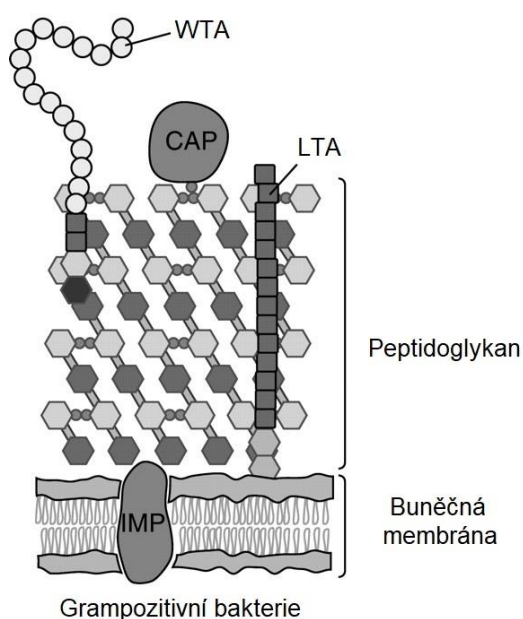
Existuje řada mikroorganismů, které produkují toxické metabolity nebo jsou patogeny lidí, živočichů či rostlin. Toxické metabolity znehodnocují potraviny, což vede nejen k ekonomickým ztrátám, ale požití takto znehodnocených potravin je spojeno se zdravotními riziky (Bata & Lásztity, 1999; Gram et al., 2002). Nejznámějšími toxickými metabolity jsou mykotoxiny, které produkují plísně. Mykotoxiny potlačují imunitu, působí toxicky na vnitřní orgány jako jsou ledviny či játra a ve značné míře podněcují vznik rakoviny (Bennett & Klich, 2003). Vysoce nebezpečným mykotoxinem s karcinogenními a mutagenními účinky je například aflatoxin B1, který je schopen pronikat do těla nejen při vdechnutí, ale také skrz kůži (Boonen et al., 2012). Aflatoxiny jsou produkovány rodem *Aspergillus* a to zejména plísní *Aspergillus flavus*, jejíž metabolity způsobují primárně jaterní onemocnění (Cotty et al., 1994; Richard, 2007). Potraviny velice často znehodnocují také botulotoxiny, které jsou produkovány bakteriemi rodu *Clostridium* a působí jako

neurotoxiny (Montecucco & Molgó, 2005). Mikroorganismy napadají často rostliny, což v případě zemědělských plodin vede k značným hospodářským a ekonomickým ztrátám. Rozšířeným rostlinným patogenem je *Pseudomonas syringae* a jeho patovary, které se liší tím, jakou rostlinu napadají. *Pseudomonas syringae* kolonizuje řadu rostlinných tkání, způsobuje nemoci dřevin a stromů, bakteriální skvrny na rajčatech nebo například hnilobu fazolí (Arnold & Preston, 2019). Další problematickou skupinou mikroorganismů jsou lidské patogeny, které způsobují řadu onemocnění. Příkladem rozšířeného lidského patogenu jsou některé bakterie rodu *Streptococcus*, které způsobují pneumonii (*S. pneumoniae*), zubní kaz (*S. mutans*), invazivní novorozenecké infekce (*S. agalactiae*) a mnoho dalších onemocnění (Krzyściak et al., 2013). Patogeny je potřeba eliminovat na kritických místech jako jsou nemocnice, laboratoře či výrobní prostory farmaceutických firem, a proto se využívají antiseptické přípravky, kterými se desinfikují povrchy v těchto oblastech. Jako prevence proti některým onemocněním slouží imunizace a v případě propuknutí nemoci se využívá celá řada antibiotik či antimikrobiálních přípravků.

3.1.1 Grampozitivní a gramnegativní bakterie

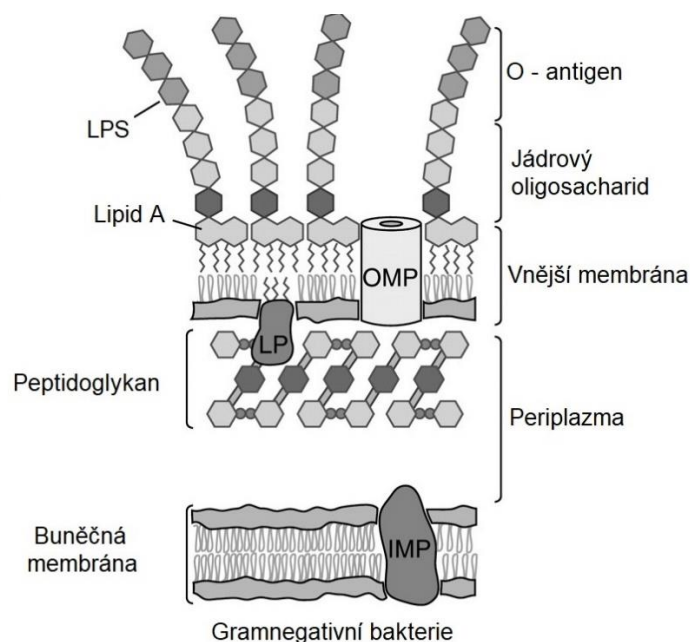
Mikroorganismy si během vývoje vytvořily celou řadu odlišných obranných mechanismů, které znesnadňují plošné použití antimikrobiálních látek. Bakterie dělíme do dvou skupin podle složení buněčného obalu na grampozitivní a gramnegativní. V závislosti na složení buněčného obalu je potřeba zvolit vhodné antimikrobiální látky, kterými se léčí onemocnění bakteriálního původu.

Grampozitivní bakterie jsou rozmanitou skupinou, která se vyznačuje tím, že postrádají vnější membránu. Jejich buněčná stěna obsahuje až 90 % peptidoglykanu o tloušťce 30–100 nm (Silhavy et al., 2010). Peptidové postranní řetězce jsou zesíťovány pomocí DD-transpeptidázy, na kterou je schopen se navázat penicilin a tím inhibovat aktivitu tohoto enzymu (Yocum et al., 1979). Dále obsahuje volná místa, kde mohou být připojeny další molekuly jako je kyselina teichoová a lipoteichoová. Kyselina teichoová, popřípadě její modifikované formy jsou kovalentně vázány na peptidoglykan fosfodiesterovou vazbou a ovlivňují citlivost grampozitivních bakterií vůči antibiotikům (Brown et al., 2015; Navarre & Schneewind, 1999; Swoboda et al., 2010).



Obr. 1: Složení buněčného obalu grampozitivních bakterií: WTA – kyselina teichoová vázaná na peptidoglykan, LTA – kyselina lipoteichoová, CAP – kovalentně navázaný protein, IMP – integrální membránový protein. Převzato a upraveno z (Silhavy et al., 2010).

Buněčný obal gramnegativních bakterií obsahuje dvě membrány – vnější a vnitřní. Vnitřní membrána je symetrická dvojvrstva složená z fosfolipidů, mezi kterými jsou vmezeřeny integrální membránové proteiny. Nad vnitřní membránou se nachází periplazma obsahující periplazmatické enzymy, vazebné proteiny a zasahuje zde vrstva peptidoglykanu, která je na rozdíl od grampozitivních bakterií mnohem tenčí – pouze několik nanometrů (Decad & Nikaido, 1976). Ochrannou funkci buňky plní vnější membrána, která je asymetrická a obsahuje fosfolipidy pouze ve vnitřní části, kde jsou lipoproteiny a poriny sloužící jako kanály pro drobné molekuly. Část vnější membrány, která je v kontaktu s okolním prostředím obsahuje lipopolysacharidy. Lipopolysacharid je složen z prodloužených polysacharidových řetězců, takzvaných O-antigenů, jádrového oligosacharidu a lipidu A, které jsou spojeny kovalentní vazbou. Lipid A je vyžadován pro růst většiny gramnegativních bakterií a inhibitory biosyntézy lipidu A jsou dobrými antibiotiky, například proti bakterii *Escherichia coli*. Některé bakterie však lipid A pro svůj růst nepotřebují nebo jej vůbec nemají, a proto na ně takto zaměřená antibiotika neúčinkují. Obecně platí, že gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči antibiotikům, protože obsahují vnější membránu s lipopolysacharidy, které jsou významnými endotoxiny a produkují toxické molekuly. Na tyto toxiny reaguje vrozený imunitní systém hostitele a dochází k bakteriální infekci (Silhavy et al., 2010; Sperandeo et al., 2017).



Obr. 2: Složení buněčného obalu gramnegativních bakterií: LPS – lipopolysacharid, OMP – protein vnější membrány, LP – lipoprotein, IMP – integrální membránový protein
Převzato a upraveno z (Silhavy et al., 2010).

Tab. 1: Výběr běžně využívaných mikroorganismů pro stanovení antimikrobiální aktivity.

Zařazení	Mikroorganismus	Obecná charakteristika
grampozitivní bakterie	<i>Enterococcus faecalis</i>	součást gastrointestinálního traktu člověka a jiných savců, patogen (infekce močových cest, meningitida aj.) (Kayaoglu & Ørstavik, 2004)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	součást přirozené mikroflóry (horní cesty dýchací, kůže), patogen (infekce kůže, kostí, kloubů aj.) (Schindler, 2010)
	<i>Streptococcus mutans</i>	běžně kolonizuje ústní dutinu, původce zubního kazu (Ajdić et al., 2002)
	<i>Bacillus cereus</i>	běžně se vyskytuje v půdě a ve vzduchu, způsobuje otravy jídlem (Ivanova et al., 2003)
grampozitivní anaerobní bakterie	<i>Clostridium perfringens</i>	běžně obývá půdu či střevní trakt, patogen (otravy jídlem, infekce jako např. myonekróza) (Schindler, 2010)
gramnegativní bakterie	<i>Escherichia coli</i>	součást gastrointestinálního traktu; některé kmeny způsobují Crohnovu chorobu, infekci močových cest aj. (Schindler, 2010)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	patogen (infekce dýchacích cest, močových cest, krevní infekce aj.) (Schindler, 2010)
kvasinky	<i>Candida albicans</i>	součást gastrointestinálního traktu a úst člověka, patogen (infekce kůže, sliznic, cévního systému aj.) (Calderone & Fonzi, 2001)

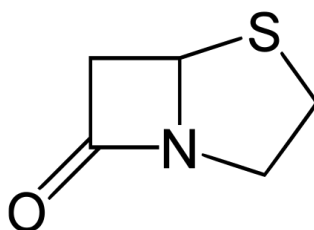
3.1.2 Antibiotika

Antibiotikum je antimikrobiální látka přírodního původu, nejčastěji mikrobiálního, která inhibuje růst ostatních mikroorganismů.

Nejznámějšími a zároveň nejrozšířenějšími antibiotiky jsou β -laktamová antibiotika, jejichž účinnou složkou je β -laktamový kruh. Většina těchto antibiotik inhibuje biosyntézu buněčné stěny a řadí se zde peniciliny, cefalosporiny, karbopenemy, karbacefemy a monobaktamy (Holten & Onusko, 2000). Tato antibiotika jsou připravována semisyntézou nebo jsou synteticky upravována *de novo*, což znamená, že dříve byla izolována z živých organismů jako je v případě penicilinu houba rodu *Penicillium* (Von Nussbaum et al., 2006). Dalším příkladem takového přírodního antibiotika jsou aminoglykosidy, které jsou využívány při léčbě onemocnění způsobených gramnegativními bakteriemi. Aminoglykosidy narušují vnější membránu, kterou se dostanou dovnitř buňky a následně jsou schopny narušit syntézu bakteriálních proteinů prostřednictvím vazby na prokaryotické ribosomy. Mezi aminoglykosidy patří kanamycin, gentamicin, tobramycin a streptomycin, který je odvozen od bakterie *Streptomyces griseus* a slouží zejména k léčbě tuberkulózy (Mingeot-Leclercq et al., 1999; Ohnishi et al., 2008).

3.1.2.1 Penicilin

Penicilin je v dnešní době obecné označení pro skupinu β -laktamových antibiotik využívána zejména pro léčbu onemocnění způsobených grampozitivními bakteriemi. Dříve byl pojmem penicilin označován pouze benzylpenicilin, což je látka objevena a izolována Alexandrem Flemingem v roce 1928 z houby *Penicillium notatum* (Fleming, 1944; Nathwani & Wood, 1993). Peniciliny jsou rozsáhlou skupinou bicyklických kruhových sloučenin, které obsahují čtyřčlenný p-laktamový kruh (penam) fúzovaný s pětičlenným thiazolidinovým kruhem.



Obr. 3: Chemická struktura penamu

Převzato a upraveno z (Van Bambeke et al., 2010).

Mechanismus účinku penicilinu a jiných β -laktamových antibiotik spočívá v inhibici enzymu DD-transpeptidázy, také známého jako protein vázající penicilin. Tyto periplazmatické proteiny jsou vázané na membránu a zodpovídají zejména za syntézu zesílení peptidoglykanového řetězce bakteriální buněčné stěny. Jestliže se penicilin obsahující čtyřčlenný p-laktamový kruh naváže na enzym DD-transpeptidázu, pak dojde k inhibici enzymu a tím k přerušení syntézy peptidoglykanových zesílení v bakteriální buněčné stěně, což vede k její degradaci a následné smrti bakteriální buňky (Sauvage et al., 2008; Van Bambeke et al., 2010).

3.1.2.2 Rezistence vůči antibiotikům

Řada bakterií se stala odolná téměř vůči všem třídám antibiotik, což značí velký zdravotnický problém. Onemocnění je tak mnohem náročnější diagnostikovat a léčit, neboť na trhu není dostatečné množství odlišných druhů antimikrobiálních léčiv. Bakterie získaly rezistenci během přizpůsobování se okolnímu prostředí pomocí velice rozmanitých a složitých mechanismů. Ve výsledku nejsou bakterie rezistentní pouze vůči jednomu typu antibiotik, ale v mnoha případech jsou multirezistentní, což je velká překážka při léčbě infekcí a volbě vhodného léku.

Bakterie si vyvinuly mechanismy rezistence v závislosti na účinku příslušných antibiotik (viz. Tab. 2). Běžným mechanismem rezistence je produkce enzymů, které chemicky degradují nebo modifikují antimikrobiální látky, a proto jsou pro bakterie neaktivní. Tento mechanismus je znám u řady antibiotik, ale nejběžnější je u β -laktamových antibiotik, proti kterým bakterie produkují β -laktamázy, které hydrolyzují β -laktamový kruh, a tím přestává být antibiotikum účinné (Alanis, 2005; Jacoby & Munoz-Price, 2005).

Tab. 2: Rozdělení tříd antibiotik podle mechanismu účinku. Převzato a upraveno z (Alanis, 2005).

Mechanismus účinku	Třída antibiotik
Inhibice syntézy buněčné stěny	Beta-laktamy (peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy); glykopeptidy (vankomycin); cyklické lipopeptidy (daptomycin)
Inhibice syntézy proteinů	Tetracykliny; aminoglykosidy; oxazolidonony (linezolid); streptograminy (chinupristin-dalfopristin); ketolidy; makrolidy; linkosamidy
Inhibice syntézy DNA	Fluorochinolony
Inhibice syntézy RNA	Rifampin
Inhibice syntézy kyseliny listové	Sulfonamidy; trimethoprim
Porucha funkce cytoplazmatické membrány	Polymyxiny (Polymyxin-B, Colistin)

Dalším častým mechanismem rezistence je modifikace receptoru antibiotického léčiva, v důsledku čehož nevzniká dostatečná vazba mezi receptorem a léčivem, a tak není antibiotikum dostatečně účinné. Typickým příkladem je modifikace proteinů vázajících penicilin. Jestliže změní svou strukturu, nemůže se na tyto enzymy navázat penicilin či jiné antibiotikum, a tím se stává léčivo neúčinné. Může také docházet k ribozomálním změnám, které jsou typické pro aminoglykosidy, makrolidy či tetracykliny nebo k modifikaci DNA-gyrázy, což vede k rezistenci vůči fluorochinolonům (Alanis, 2005). Mimo těchto mechanismů existuje celá řada dalších, které vedou ke snížení permeability buněčné stěny či odstranění léčiva z buňky (Sefton, 2002).

V souvislosti s rezistencí je potřeba zmínit vícenásobnou rezistenci na léčivo (Multiple Drug Resistance; MDR), která je popisována jako jev, kdy rezistence na jedno léčivo je doprovázena rezistencí na léčiva, jejichž struktury a mechanismy působení se mohou úplně lišit. Tento jev není znám pouze u rezistence vůči antibiotikům, ale je často zmiňován v souvislosti s odolností na chemoterapii při léčbě nádorových onemocnění, kde je velkou překážkou (Baguley, 2010).

3.1.3 Přírodní antimikrobiální látky

Přírodní aktivní látky se v organismech většinou vyskytují v malém množství, a proto jsou nejčastěji získávány biotechnologickými postupy. Jedná se o semisyntetické postupy, ke kterým není potřeba velkého množství původního organismu, díky čemuž nedochází k úbytkům organismů ve volné přírodě. Biotechnologická produkce probíhá v bioreaktorech, kdy nejprve připravíme v případě mikroorganismů prekulturu, kterou namnožíme a následně dochází v bioreaktoru k fermentaci a izolaci čisté látky.

Existuje celá řada látek s antimikrobiální aktivitou, které jsou produkovány různými organismy. Velké množství takovýchto látek bývá využíváno například v lidovém léčitelství nebo čínské medicíně, ale pouze některé jsou registrovány jako léčiva (Samuelsson & Bohlin, 2017). Přehled přírodních antimikrobiálních látek, které jsou schváleny jako léčiva jsou uvedena v *Tab. 3*.

Tab. 3: Přehled přírodních antimikrobiálních látek, která jsou registrována jako léčiva, jejich původ a využití (Samuelsson & Bohlin, 2017).

Antimikrobiální látka	Původní organismus	Využití
amikacin a kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	antibiotikum
amphotericin B	<i>Streptomyces nodosus</i>	antimykotikum
cefalosporin	<i>Acremonium chrysogenum</i>	antibiotikum
cefamycin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	antibiotikum
erythromycin A (deriváty clarithromycin a azithromycin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	antibiotikum
gentamicin	<i>Micromonospora purpurea</i>	antibiotikum
gramicidin S	<i>Bacillus brevis</i>	antibiotikum
griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvum</i>	antimykotikum
neomycin	<i>Streptomyces fradiae</i>	antibiotikum
nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	antimykotikum
penicilin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	antibiotikum
rifamycin	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>	antibiotikum
spiramycin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	antibiotikum
streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	antibiotikum
tetracyklin	<i>Streptomyces sp.</i>	antibiotikum
thymol	<i>Thymus vulgaris</i>	antiseptikum
vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	antibiotikum

3.2 Včela medonosná (*Apis mellifera* (L.))

Včela medonosná je společenský hmyz z řádu blanokřídlých, který vytváří včelstva s určitou kastovní hierarchií. Včelstvo je složeno z jedné matky, která má za úkol klást vajíčka a tím obnovovat včelstvo, z několika trubců, kteří oplodňují matku, a především z mnoha dělnic, které mimo obstarávání potravy zastávají celou řadu dalších činností jako je střežení úlu, starání se o potomstvo, krmení matky mateří kašičkou a podobně. Včely jsou známé, a také chované, především díky produkci medu a propolisu, čehož se využívá především díky příznivým účinkům na lidské zdraví.



Obr. 4 Včela medonosná (Převzato od BAYER BEE CARE CENTER).

Propolis vzniká tak, že včely sklídí pryskyřici z různých druhů rostlin a přinesou ji zpět do včelstva, kde se pak mísí s různým množstvím vosku. Chemické složení propolisu je velice bohaté a závisí také na rostlinném původu pryskyřice. Obsahuje z 50% fenoly a další látky jako například vitamin B₁, B₂, B₆, C, E, minerální a stopové prvky. Propolisu se přisuzují silné hepatoprotektivní, protinádorové, antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti (Banskota et al., 2001; Simone-Finstrom & Spivak, 2010). Bylo zjištěno, že propolis vykazuje antibakteriální aktivitu především vůči některým druhům rodu *Streptococcus* a *Staphylococcus* zejména *Staphylococcus aureus* a dále vůči *Bacillus subtilis*. Některé studie udávají, že propolis zesiluje účinek některých antibiotik. Antibakteriální účinky propolisu jsou zřejmě způsobeny obsahem flavonoidů, esterů a různých aromatických sloučenin. Propolisu je dále přisuzována antivirotická a cytotoxická aktivita (Marcucci, 1995; Miorin et al., 2003).

Med je sladká kapalina, kterou včely vyrábí přetvářením rostlinných šťáv. Med je složen z 80 % cukrů, zejména glukózy, fruktózy a někdy sacharózy a maltózy, dále obsahuje méně než 18 % vody. Med je znám svými antiseptickými a antibakteriálními vlastnostmi, kdy hlavní antibakteriální látkou je peroxid vodíku, který se v medu vyskytuje v malém množství a vzniká díky enzymu glukózaoxidáze, který přeměňuje glukózu na peroxid vodíku a kyselinu glukonovou během ředění medu. V některých typech medu byl detekován také methylglyoxal a antimikrobiální peptid včelí defensin-1 (také známý jako royalisin), který je obsažen v hemolymfě, v hlavě a hrudních žlázách včel. Včelí defensin-1 vykazuje silnou aktivitu pouze vůči grampozitivním bakteriím, zejména proti bakteriím *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* (Kwakman & Zaat, 2012).

Včelí jed neboli apitoxin, jehož hlavní složkou je melittin byl studován v souvislosti s protirakovinnými účinky vůči osteosarkomu, rakovině tlustého střeva a žaludku. Včelí jed indukuje lýzu membrány, inhibuje proliferaci nádorových buněk a také podporuje apoptózu rakovinných buněk zvýšením reaktivních forem kyslíku a intracelulárního Ca^{2+} (Chaisakul et al., 2016).

3.3 Mravenec obecný (*Lasius niger* (L.))

Mravenec obecný je sociální hmyz z řádu blanokřídlých, který má na konci zadečku zakrnělé žihadlo s jedovou žlázou, která obsahuje kyselinu mravenčí. Tuto látku mravenci vystřikují v případě ohrožení a kyselina mravenčí má také antimikrobiální vlastnosti. Synteticky vyráběná kyselina mravenčí je využívána jako konzervant potravin a je součástí čisticích prostředků (Brütsch et al., 2017).



Obr. 5: Mravenec obecný (Převzato od Ing. Zbyněk Pokorný).

3.4 Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus* (L.))

Ruměnice pospolná je společenský hmyz z řádu polokřídlí, taktéž často pojmenovávána jako ploštice podle podřádu, do kterého spadá. Jedná se o druh, který se živí převážně sáním rostlinných šťáv a v případě ohrožení produkuje páchnoucí sekret, který má odstrašit nepřítele. Mezi obranné látky, které ruměnice pospolná produkuje patří defensiny, což jsou peptidy, které vykazují určitou antimikrobiální aktivitu. Konkrétně defensiny získané z ruměnice vykazovaly antibakteriální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím (Von Nussbaum et al., 2006).



Obr. 6: Ruměnice pospolná (Převzato od Theodoor Heijerman).

3.5 Slunéčko východní (*Harmonia axyridis* (Pallas))

Slunéčko východní je všežravý invazivní hmyz z řádu brouci, který se na území České republiky dostal z východní Asie a v dnešní době vytlačuje slunéčko sedmitečné, které je u nás původním druhem. Slunéčko se živí především mšicemi a vylučuje zápachající tělní tekutiny.



Obr. 7: Slunéčko východní (Převzato od U. Schmidt)

Mezi obranné sloučeniny vylučované sluníčkem východním patří harmonin ((17*R*,9*Z*) - 1,17-diaminooctadec – 9 - en), který je přítomen v hemolymfě a vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu. Harmonin vykazuje antiproliferativní a cytotoxickou aktivitu proti buněčným liniím člověka, působí proti několika buněčným liniím solidních nádorů člověka, dále inhibuje růst parazita malárie *Plasmodium falciparum* a působí antibakteriálně proti 12 bakteriálním kmenům včetně mykobakterií. Působí antibakteriálně také vůči multirezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* (Alam et al., 2002; Röhrich et al., 2012).

3.6 Sklípkan kadeřavý (*Brachypelma albopilosum*/Tliltocatl *albopilosum* (Mendoza))

Sklípkan kadeřavý je druhem pavouka, který je velice často chovaný v zajetí. Ve volné přírodě se vyskytuje v deštných pralesích Kostariky a Nikaraguy (Mendoza & Francke, 2019). Tento druh pavouka se brání pouze vyčesáváním chloupků ze zadečku, které se zabodávají do kůže a sliznic a mohou způsobovat alergické reakce. I přesto byl v jedu sklípkana kadeřavého objeven neurotoxin brachylin, který vykazoval silnou insekticidní aktivitu vůči švábům *Periplaneta americana* (L.) a potemníku moučnému (*Tenebrio molitor* (L.)). Brachylin vykazoval také analgetické účinky na myších modelech, včetně břišního svíjení a tento neurotoxin výrazně inhiboval proliferaci nádorových buněk (Zhong et al., 2014).



Obr. 8: Sklípkan kadeřavý (Převzato od Micro Wilderness).

3.7 Muchomůrka červená (*Amanita muscaria* (L.))

Muchomůrka červená je jedovatá houba, která roste převážně v jehličnatých lesích mírného pásu. Muchomůrka obsahuje několik biologicky aktivních látek jako je muscimol a kyselina ibotenová, které jí dodávají psychotropní vlastnosti. Díky podobné struktuře jako dva hlavní neurotransmitery centrální nervové soustavy: kyselina glutamová a GABA (kyselina gamaaminomáselná), jsou schopny ovlivňovat nervový systém a vyvolávat psychomotorické vzrušení s euforií, depresí a úzkostí, iluzemi a vizuálními a sluchovými halucinacemi. Mimo muscimolu a kyseliny ibotenové, které se vyskytují zejména v klobouku, muchomůrka obsahuje cholin, acetylcholin, betain, muskaridin, malé množství tropanových alkaloidů (atropin, hyoscyamin, skopolamin, bufotenin) a muscazon, což je laktamový izomer muscimolu (Michelot & Melendez-Howell, 2003; Satora et al., 2005).



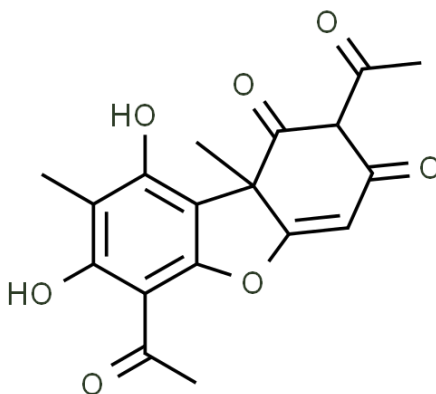
Obr. 9: Muchomůrka červená (Převzato od Robert Siegel).

3.8 Lišejníky

Lišejníky jsou symbiotické organismy, které sestávají ze dvou částí – fotobionta a mykobionta. Mykobiontem bývá nejčastěji vřeckovýtrusná houba a fotobiontem fotosyntetizující řasa či sinice. Lišejníky jsou známé bioindikátory čistoty ovzduší, neboť jsou velmi citlivé na změny v okolním prostředí (Conti & Cecchetti, 2001). Dále jsou využívány v lichenometrii, což je soubor metod k určení stáří zejména geologických útvarů na základě velikosti stélky lišejníku. Tato metoda je využívána v archeologii, geomorfologii či paleontologii. Lišejníky také produkují celou řadu sekundárních metabolitů, které se liší u jednotlivých druhů, ale mají podobné vlastnosti. Obecně vykazují lišejníky antibakteriální, protirakovinné, antiproliferativní a antioxidantní vlastnosti. Dále jsou lišejníky používány jako součást antibiotik, kde je využívána zejména kyselina usnová, deriváty kyseliny pulvinové – kyselina vulpinová, kyselina lichesterinová, deriváty orcinolu a depsidony a také jako součást léků proti HIV (Shrestha & St. Clair, 2013).

3.8.1 Kyselina usnová

Kyselina usnová [2,6 – diacetyl - 7,9 – dihydroxy - 8,9b – dimethyl - 1,3 (2H, 9bH) – dibenzo - furandion] je jedním z nejstudovanějších a nejrozšířenějších sekundárních metabolitů lišejníků, který se vyskytuje ve dvou enantiomerech zejména v rodech *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Romalina* a *Evernia*. Je to jeden z mála metabolitů, který je využíván komerčně v krémech, ústních vodách, zubních pastách, deodorantech či jako konzervační látka. Kyselina usnová vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči lidským a rostlinným patogenům, dále antivirovou, antiprotozoální, antiproliferativní, protizánětlivou a analgetickou aktivitu (Ingólfssdóttir, 2002).



Obr. 10: Kyselina usnová.

Puklérka islandská (*Cetraria islandica* (L.))

Puklérka islandská, známá také jako lišejník islandský je využíván zejména v lidovém lékařství. Obsahuje chemické látky jako je kyselina protolichesterinová, lichesterinová, protocetrarová a kyselina fumarprotocetrarová. Puklérka islandská vykazuje antitrypanozomální aktivitu, příznivě působí při plicním onemocnění, zejména tlumí kašel, dále je účinná při problémech s ledvinami a močovým měchýřem, při mírných zánětech ústní sliznice a hltanu a také bývá používána v lidovém léčitelství při léčbě rakoviny (Igoli et al., 2014; Malhotra et al., 2008).



Obr. 11: Puklérka islandská (Převzato od Rob Hille).

3.9 Cytotoxicita

Cytotoxicita je schopnost chemické látky zabíjet buňky a bývá hojně stanovována v souvislosti s vývojem nových léčiv. Testování bývá prováděno kvůli nežádoucím cytotoxickým účinkům léků. Následkem cytotoxicity může dojít k nekróze buněk, čímž dochází ke ztrátě integrity membrány a následné buněčné lýze. Další možností je snížení životaschopnosti buněk, kdy přestávají aktivně růst a dělit se. A v neposlední řadě dochází k programované buněčné smrti – apoptóze.

3.10 Použité metody

3.10.1 Extrakce

Extrakce je proces, během kterého je možné získat chemické látky, nejčastěji z přírodního materiálu. Důležitým faktorem je vhodný výběr rozpouštědla v závislosti na tom, které látky chceme extrahovat. Extrakci můžeme rozdělit do dvou základních skupin v závislosti na tom, z čeho extrahujeme. Extrakce z kapaliny do kapaliny je založena na vzájemné nemísitelnosti kapalin a využívá se nejčastěji vodný vzorek a organické rozpouštědlo. Příkladem může být třepání v dělicí nálevce nebo odstředování. Extrakce z pevné fáze do kapaliny slouží k získání analytu z pevné látky nejčastěji homogenizací a následným použitím vhodného rozpouštědla, kterým může být například methanol či ethanol. Příkladem je macerace, kdy používáme studené rozpouštědlo, ale jde o časově náročnou metodu, kdy nedochází k dokonalé extrakci. Mezi další metody řadíme perkolaci, extrakci zpětným tokem, tlaková kapalinová extrakce, extrakce superkritickou tekutinou, ultrazvukovou extrakci či mikrovlnnou extrakci (Zhang et al., 2018).

3.10.2 Pasážování buněk

Pasážování je metoda, která umožňuje pěstování buněčných kultur *in vitro*. Kdyby nedocházelo k pasážování, buňky by se začaly shlukovat a následně odumírat v důsledku nedostatku živin. Příjem živin je zajištěn z kultivačního média, které obsahuje anorganické soli (zajištění hlavních iontů nezbytných pro základní fyziologické funkce buňky), sérum, které je zdrojem organických látek, zdroj energie (nejčastěji glukosa), antibiotikum (zamezuje kontaminaci bakteriálními kulturami) a acidobazický indikátor (díky němu jsme schopni na základě změny pH identifikovat, kdy je potřeba vyměnit médium, tedy kdy je potřeba buňky pasážovat).

3.10.3 Nrf2

Nrf2 je transkripční faktor lokalizovaný v cytoplazmatické membráně, který je hlavním regulátorem genů kódujících antioxidantní enzymy druhé fáze a antioxidantní stresové proteiny, které reagují na elektrofilní látky a oxidační stres. Jestliže nedochází ke stimulaci Nrf2 těmito faktory, pak je Nrf2 neaktivní a po asociaci s doménou Keap 1 je degradován (Kobayashi et al., 2004).

Mnohé přírodní látky slouží jako aktivátory transkripčního faktoru Nrf2. Jestliže je Nrf2 aktivován fosforylací, pak dochází k indukci cytoprotektivních enzymů, a tím je možné potlačit oxidativní stres či proliferaci buněk, což může zabránit vzniku nádoru. Naopak inhibitory tohoto transkripčního faktoru mohou sloužit při boji s rezistencí vůči chemoterapeutikům. (Jaiswal, 2004; Surh et al., 2008).

Nrf2 assay pak byla prováděna na buněčné linii EpRE - LUX, což je uměle vyvinutá buněčná linie s luciferázovým reportérem, který byl vložen v blízkosti elektrofilně citlivého prvku (genu EpRE). Transkripce tohoto genu je pak řízena exprese luciferázy. Jestliže dochází k aktivaci transkripce (prostřednictvím Nrf2), pak dochází k expresi luciferázy a je možné detekovat luminiscenci.

3.10.4 Mikrodiluční metoda

Mikrodiluční metoda slouží ke zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů v mikrotitrační jamce. Látka na mikroorganismy může působit bakteriostaticky (zastaví se či zpomalí růst mikroorganismů) nebo bakteriocidně (mikroorganismus je trvale usmrcen), což znamená, že daná látka vykazuje antimikrobiální aktivitu.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Včela medonosná (*Apis mellifera* (L.)) – mrtví jedinci získaní v roce 2018 od včelaře (Jan Šimíček, Luboměř) z jeho osobního chovu
- Mravenec obecný (*Lasius niger* (L.)) – odchyt na mezi v obci Luboměř
- Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus* (L.)) – odchyt u stromu v obci Spálov
- Slunéčko východní (*Harmonia axyridis* (Pallas)) – odchyt v obci Luboměř
- Sklípkan kadeřavý (*Brachypelma albopilosum/Tliltocatl albopilosum* (Mendoza)) – svlečky a zamrazení jedinci mlád'at sklípkana získaní ze zájmového chovu
- Muchomůrka červená (*Amanita muscaria* (L.)) – sběr ve smíšeném lese na území obce Luboměř
- *Cladonia coniocraea* (Flörke) – sběr na mezi v obci Luboměř, určení – Jan Vondrák
- *Cladonia fimbriata* (L.) – sběr na mezi v obci Luboměř, určení – Jan Vondrák
- EpRE – LUX – buněčná linie s luciferázovým reportérem
- BJ – buněčná linie z lidských primárních fibroblastů
- *Enterococcus faecalis* – CCM 4224, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Staphylococcus aureus* - CCM 3953, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Streptococcus mutans* - CCM 7409, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Bacillus cereus* - CCM 2010, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Actinomyces odontolyticus* - CCM 4740, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Clostridium perfringens* - CCM 4435, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Escherichia coli* - CCM 3954, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Pseudomonas aeruginosa* - CCM 3955, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně
- *Candida albicans* – ATCC90028, kmen z České sbírky mikroorganismů v Brně

4.2 Použité chemikálie

- Methanol, VWR International s.r.o., Radnor, USA
- Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- DMSO (Dimethyl sulfoxide), Merck, Darmstadt, Germany
- EMEM medium (M0643), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- NaHCO₃, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
- DMEM medium (D5523), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Fetal bovine serum (ID number: S00D41000B), Biowest, Riverside, USA
- L-Glutamine solution (G7513-100ML), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Penicillin-Streptomycin (P4333-100ML), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Trypsin solution from porcine pankreas (T4549-100ML), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- PBS (fosfátový) pufr 10x, na 1 l destilované vody:
 - 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 2 g KH₂PO₄, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 80 g NaCl, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
 - 2 g KCl, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
- EDTA, 1 l roztoku:
 - 8 g NaCl, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
 - 1 g glucose, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - 2 g KCl, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
 - NaHCO₃, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
 - 0,2 g EDTA, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Lyzační pufr
 - Tris, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - DTT (DL-Dithiothreitol), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - DCTA (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid monohydrate), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Flash mix
 - Tricine (N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - ATP disodium salt, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - MgSO₄ · 7 H₂O, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
 - (MgCO₃)₄ · Mg(OH)₂ · 5 H₂O, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

- D-Luciferin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Kyselina lipoová, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Resazurin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- NaOH, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
- KCl, Penta s.r.o., Praha, Česká republika
- Chlorid sodný min 99,8 %, CELLPURE ® pro buněčné kultury I 84003 P-Lab

4.3 Příprava roztoků:

Příprava 500 ml EMEM/DMEM media:

- 440 ml EMEM/DMEM (zásobní roztok EMEM rozpuštěn v 1l destilované vody společně s 2,2 g/l NaHCO₃)
- 50 ml fetálního séra
- 5 ml antibiotika (penicilin-streptomycin)
- 5 ml glutaminu

Příprava lyzačního pufru na 3 desky:

- 36,3 mg 10 mM Tris
- 9,24 mg 2 mM DTT
- 21,9 mg 2 mM DCTA
- rozpuštěno v 30 ml destilované vody a upraveno na pH 7,8 (0,1M HCl)

Příprava Flash mixu na 3 desky:

- 107,4 mg 20 mM Tricin
- 15,6 mg 1,07 mM (MgCO₃)₄ · Mg(OH)₂ · 5 H₂O
- 40,44 mg 2,67 mM MgSO₄ · 7 H₂O
- 82,8 mg 5 mM ATP
- 30 µl 9,4 mM luciferin (v DMSO rozpuštěn)
- úprava na pH 7,8 (0,1M NaOH)

4.4 Kultivační půdy

- Brain heart infusion broth – BHI (kat. č. M210-100G, HiMedia)
- Columbia agar s 7% ovčí krví (kat. č. PB5008A, Oxoid)
- Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (kat. č. PO0161, Oxoid)
- Anaerobe blood agar (WILKINS CHALGREN) (kat. č. PB0111, Oxoid)

4.5 Přístrojové vybavení

- Lyofilizátor FreeZone 2,5 L, LABCONCO, Kansas City, USA
- Analytická váha, OHAUS PIONEER, Parsippany, USA
- Kávový mlýnek KM1310S, Tarrington House,
- Oscilační kulový mlýnek MM400, Retsch® & Co. KG, Haan, Germany
- Ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner, VWR International s.r.o., Radnor, USA
- Automatické pipety labopette®, Hirschmann-Laborgeräte
- Dusíková odparka TurboVap, Biotage
- Mikrocentrifuga Micro Star 17, VWR International s.r.o., Radnor, USA
- Odsávací vakuová pumpa, FTA-2i, bioSan, USA
- Odsávací vakuová pumpa, BVC control
- Minitřepačka Vortex V-1 plus, bioSan, USA
- Multidetekční reader infinite M200 PRO, TECAN
- Třepací inkubátor Thermo shaker, Grant-bio
- Multikanálová automatická pipeta Eppendorf Xplorer, Eppendorf
- Mikroskop, Olympus CK2,
- Mikroskop, Nikon
- Flowbox, Alpina
- CO₂ Inkubátor, Sanyo Galenkamp
- Biohazard Clean Air flow-box (Schoeller instruments)
- DEN-1B McFarland denzitometr (bioSan), USA
- Laboratorní inkubátor (termostat) Ecocell (BMT)
- MIC inokulátor (ježek) kalibrovaný na 1 µl (na zakázku, Trios), Kennewick, USA
- LASTM – Látaľův anaerobní systém, Trios s.r.o., Kennewick, USA

4.6 Metody

4.6.1 Extrakce

Vzorky byly rozděleny na jednotlivé části – muchomůrka červená na klobouk a třeň (třeň a prsteneček), mláďata pavouka sklípkana kadeřavého na hlavohrud', nohy a zadeček. Vzorky (včela, ruměnice, slunéčko, *C. coniocraea* a *C. fimbriata*) byly ponechány po dobu 48 hodin vysušit v lyofilizátoru. Včela medonosná, ruměnice pospolná, slunéčko východní, muchomůrka červená, *C. coniocraea* a *C. fimbriata* byly homogenizovány v kávovém mlýnku či třecí misce. Mravenci obecní byli homogenizováni pomocí kapalného dusíku v třecí misce. Ze svleček sklípkana kadeřavého byly odpreparovány jednotlivé chlupy z oblasti zadečku.

Do mikroskopavek se vzorky byl přidán 1 ml extrakčního činidla (methanol a 0,1% kyselina mravenčí). Vzorky byly 10 min homogenizovány na kulovém oscilačním mlýnku s kovovými, popřípadě skleněnými kuličkami (v závislosti na typu vzorku) při frekvenci 27 Hz, a následně 10 min sonifikovány na ultrazvukové lázni. Extrakty byly centrifugovány na centrifuze při 20 160 g po dobu 7 minut. Supernatanty byly odpařeny na dusíkové odparce a odparky byly následně rozpuštěny v 150 μ l DMSO. Vzorek byl uchováván v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro následné testování.

4.6.2 Pasážování buněk

Při práci bylo nutné pracovat za sterilních podmínek ve flowboxu, aby nedocházelo ke kontaminacím. Pomocí Pasteurovy pipety, bylo odsáto staré médium z kultivační nádoby s buňkami. Následně bylo přidáno 5 ml 1x PBS pufru, aby došlo k promytí buněk a pufr byl opět odsán. K buňkám byly přidány 2 ml trypsinu s EDTA (1:1), aby došlo k uvolnění buněk (krátce byly ponechány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v inkubátoru). Po uvolnění buněk byl trypsin neutralizován 8 ml média, ve kterém byly buňky důkladně odděleny pomocí pipetování. V kultivační nádobě byl ponechán pouze určitý podíl buněk, který byl kultivován v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zbytek byl odstraněn.

Buňky bylo potřeba pasážovat 2x – 3x týdně v závislosti na použité buněčné linii a také přidávat jednou týdně antibiotikum (Penicillin-Streptomycin).

4.6.3 Nrf2 assay

Nrf2 assay byla prováděna jako třídenní experiment na buněčné linii EpRE - LUX.

První den experimentu bylo vysázeno 20 000 buněk/ jamku do 96 jamkové destičky (150 μ l/jamku) předem připravených buněk, které následně byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.

V druhý den experimentu bylo odsáto staré médium a k buňkám bylo přidáno 150 μ l EMEM média s 1 % glutaminu, bez fetálního séra a antibiotika na jamku. K médiu s buňkami byly následně přidány testované látky, které byly médiem naředěny na čtyři různé koncentrace stejně jako kyselina lipoová, která sloužila jako pozitivní kontrola. DMSO a médium s buňkami pak sloužilo jako negativní kontrola a médium bez buněk jako BLANC. Rozložení na desce s jednotlivým ředěním je uvedeno v *Tab. 4*. Připravené desky s buňkami byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C.

Tab. 4: Rozložení látek na desce (ve 3 opakováních po 4 koncentracích, negativní kontrola a blanc po 4 opakováních pouze v 1 koncentracích).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μ M LipA			200x ředěný extrakt			200x ředěný extrakt			200x ředěný extrakt		
B	10 μ M LipA			2000x ředěný extrakt			2000x ředěný extrakt			2000x ředěný extrakt		
C	1 μ M LipA			20000x ředěný extrakt			20000x ředěný extrakt			20000x ředěný extrakt		
D	0,1 μ M LipA			200000x ředěný extrakt			200000x ředěný extrakt			200000x ředěný extrakt		
E	200x ředěný extrakt			200x ředěný extrakt			200x ředěný extrakt			DMSO	Medium s buňkami	Medium bez buněk
F	2000x ředěný extrakt			2000x ředěný extrakt			2000x ředěný extrakt					
G	20000x ředěný extrakt			20000x ředěný extrakt			20000x ředěný extrakt					
H	200000x ředěný extrakt			200000x ředěný extrakt			200000x ředěný extrakt					

Třetí den experimentu bylo odsáto staré médium, buňky byly promyty 100 μ l 1x PBS pufrem, který byl následně odsát. K buňkám bylo přidáno 50 μ l/jamku lyzačního pufre, a ponecháno stát 15 minut v lednici a následně 2 hodiny v – 80 °C. Jakmile byla deska vytažena z – 80 °C byla nechána rozmraznout na třepačce temperované na 37 °C po dobu asi 10 minut. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l Flash mixu a byla změřena luminiscence na multidetekčním readeru v časech 0, 2, 5 a 10 minut.

4.6.4 Stanovení cytotoxicity

Stanovení cytotoxicity bylo prováděno v podobě třídenního testu na buněčné linii BJ.

První den experimentu bylo vysázeno 20 000 buněk/ jamku 96 jamkové destičky (150 μ l/jamku) předem připravených buněk, které následně byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.

V druhý den experimentu bylo odsáto staré médium a k buňkám bylo přidáno 150 μ l DMEM média s 1 % glutaminu, bez fetálního séra a antibiotika na jamku. K médiu s buňkami byly následně přidány testované látky, které byly médiem naředěny na čtyři různé koncentrace stejně jako kyselina lipoová, která sloužila jako pozitivní kontrola. DMSO a médium s buňkami pak sloužilo jako negativní kontrola a médium bez buněk jako BLANC. Rozložení na desce s jednotlivým ředěním je uvedeno v *Tab. 4*. Připravené desky s buňkami byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C.

Třetí den experimentu bylo odsáto staré médium s testovanými látkami a k buňkám bylo přidáno 20 μ l/jamku resazurinu (5x naředěný do 1x PBS pufru). Následně byla změřena fluorescence na multidetekčním readru při emisní vlnové délce 598 nm a excitační vlnové délce 535 nm v časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 minut.

4.6.5 Testování antimikrobiální aktivity látek mikrodiluční metodou

Mikroorganismy byly uchovávány ve sbírce mikroorganismů Ústavu mikrobiologie LF UP a FNOL při -80 °C v tzv. kryozkumavkách, ze kterých byly následně oživeny. Bakteriální kultura byla nejprve sterilní bakteriologickou kličkou z kryozkumavky vyočkována na příslušný agar a poté kultivována v termostatu při 37 °C (kvasinky při 30 °C) po dobu 24 hodin (kvasinky a anaerobní bakterie po dobu 48 hodin). Tato kultura byla poté připravena k testování.

Byla připravena mikrotitrační destička, kdy do jamek a řad B - H bylo napipetováno 50 μ l BHI bujónu a do řady A 100 μ l testované látky, která byla předem naředěna 50x, aby byla koncentrace DMSO ve vzorku menší než 5 % (DMSO je antibakteriální). Následně bylo provedeno dvojkové ředění a to tak, že z jamek řady A bylo multikanálovou pipetou nasáto 50 μ l, které byly připipetovány do řady B (tímto postupem byla naředěna celá destička).

Následně bylo připraveno inokulum, kdy byly sterilní bakteriologickou kličkou nabrány 2-3 vykultivované kultury, které byly rozsuspendovány ve fyziologickém roztoku. Zákal byl změřen na denzitometru a hustota upravena na hodnotu 0,5 McFarland. Inokulace

byla prováděna pomocí MIC inokulátoru (tzv. ježek), který byl sterilizován v plameni, následně ponořen do připraveného inokula a byly jím inokulovány jamky mikrotitrační destičky. Inokulované destičky byly inkubovány při příslušné teplotě (viz. Tab. 5) po dobu 24 hodin.

Po inkubaci byla odečtena hodnota minimální inhibiční koncentrace. Pokud byla testovaná látka aktivní, tak byla vizuálně stanovena hodnota MBC (minimální bakteriocidní koncentrace) a MBS (minimální bakteriostatická koncentrace) tím, že byly jamky vyočkovány pomocí inokulátoru na příslušný agar (viz. Tab. 5).

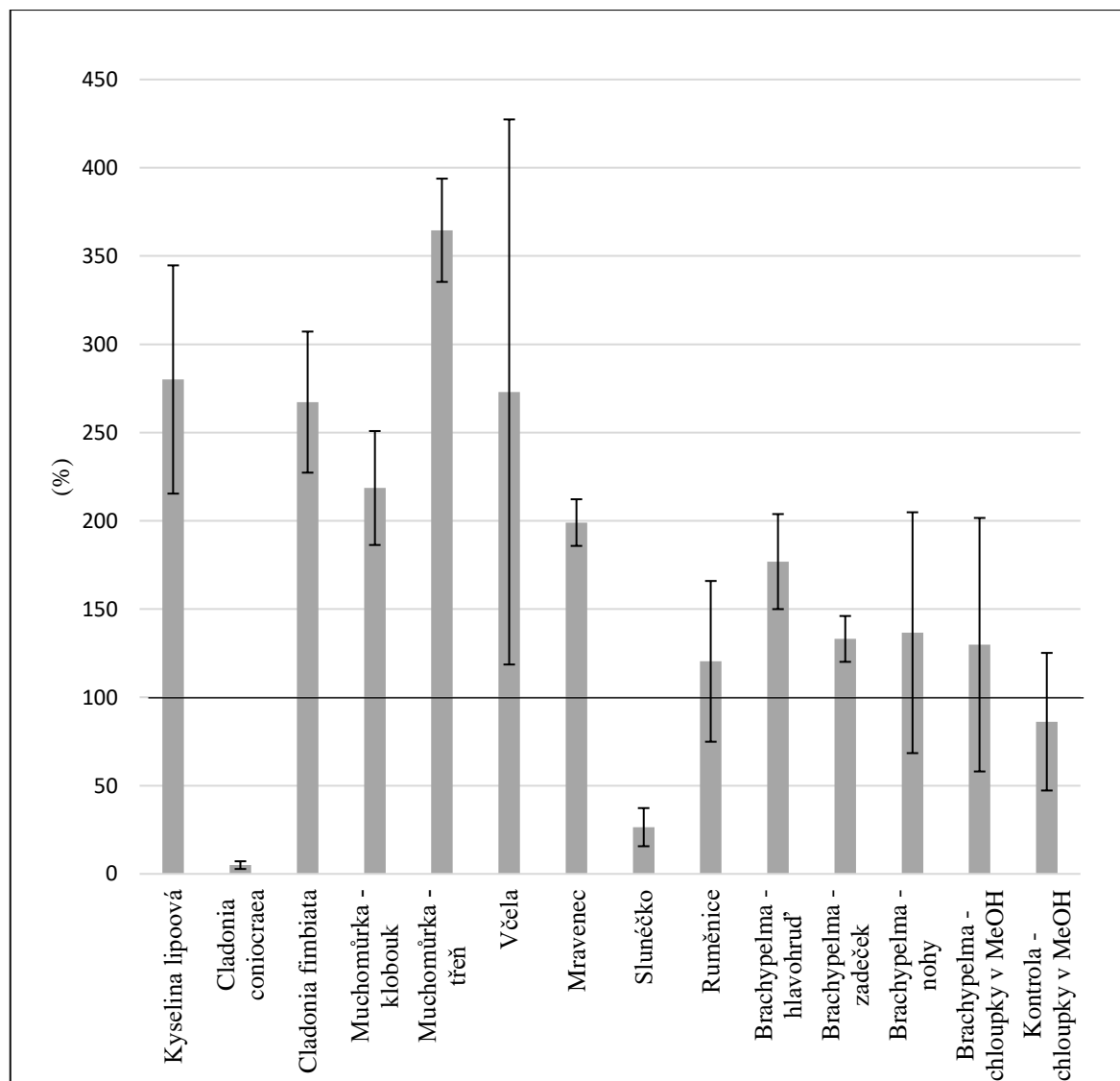
Tab. 5: Přehled podmínek kultivace daných mikroorganismů.

Mikroorganismus	Zařazení	Agar pro kultivaci	Teplota
<i>Enterococcus faecalis</i>	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Streptococcus mutans</i>	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Bacillus cereus</i>	Aerobní grampozitivní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Anaerobní grampozitivní bakterie	Anaerobní krevní agar	37 °C
<i>Clostridium perfringens</i>	Anaerobní grampozitivní bakterie	Anaerobní krevní agar	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	Aerobní gramnegativní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aerobní gramnegativní bakterie	Krevní agar	37 °C
<i>Candida albicans</i>	Kvasinka	Sabouraudův agar	30 °C

5 Výsledky

5.1 Nrf2 assay

Aktivita transkripčního faktoru Nrf2 byla stanovena na buněčné linii EpRE – LUX, která byla kultivována společně s přírodními extrakty. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 12.

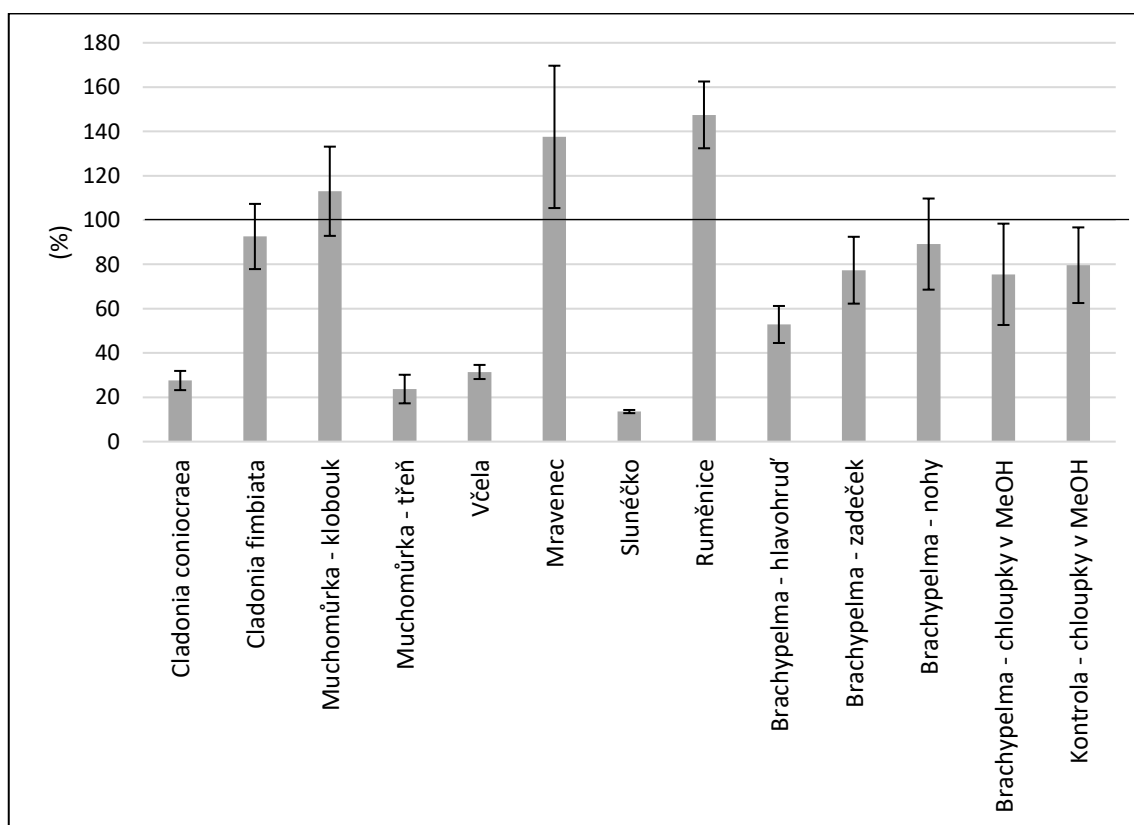


Obr. 12: Grafické vyjádření aktivity transkripčního faktoru Nrf2 po kultivaci přírodních extraktů s buněčnou linií EpRE-LUX vztažené ke kontrole (100 %). Doba působení extraktů na buňky byla 24 hodin. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n=3$). Jednotlivé koncentrace vzorků: Kyselina lipoová: $10 \mu\text{M}$; Cladonia coniocraea: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Cladonia fimbriata: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Muchomůrka - klobouk: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Muchomůrka - třeň: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Včela: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Mravenec: $3,35 \text{ mg FW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Slunéčko: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Ruměnice: $1 \text{ mg DW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Sklípkan - hlavohrud': $1,86 \text{ mg FW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Sklípkan - zadeček: $1,41 \text{ mg FW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Sklípkan - nohy: $1 \text{ mg FW} \cdot \text{ml}^{-1}$; Sklípkan - chloupky v MeOH: $0,35 \text{ mg FW} \cdot \text{ml}^{-1}$

Kultivace extraktů *C. fimbriata*, muchomůrka – klobouk, muchomůrka – třeň, včela medonosná a mravenec obecný s buněčnou linií EpRE - LUX vedla k aktivaci dráhy Nrf2. U těchto extraktů byl nárůst luminiscence >200 %. Pozitivní kontrolou byla kyselina lipová, jejíž aktivita byla 280 %. Kontrolní vzorek s DMSO vykazoval aktivitu 100 % a je v grafu znázorněn vodorovnou čarou. Extrakt z včely medonosné silně aktivoval (260 %) dráhu Nrf2, nicméně výsledek vykazoval vysokou variabilitu. U vzorků *C. coniocraea* a slunéčka východního byla aktivita velice nízká (<30 %).

5.2 Stanovení cytotoxicity

Testování viability buněk bylo provedeno na buněčné linii BJ kultivované s přírodními extrakty a výsledky jsou znázorněny na *Obr. 13*.



Obr. 13: Grafické vyjádření cytotoxicity po kultivaci přírodních extraktů s buněčnou linií BJ vztažené ke kontrole (100 %). Doba působení extraktů na buňky byla 24 hodin. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=3). Fluorescence byla měřena při emisní vlnové délce 598 nm a excitační vlnové délce 535 nm. Jednotlivé koncentrace vzorků: Cladonia coniocraea: 1 mg DW · ml⁻¹; Cladonia fimbriata: 1 mg DW · ml⁻¹; Muchomůrka - klobouk: 1 mg DW · ml⁻¹; Muchomůrka - třeň: 1 mg DW · ml⁻¹; Včela: 1 mg DW · ml⁻¹; Mravenec: 3,35 mg FW · ml⁻¹; Slunéčko: 1 mg DW · ml⁻¹; Ruměnice: 1 mg DW · ml⁻¹; Sklípkan - hlavohrud': 1,86 mg FW · ml⁻¹; Sklípkan - zadeček: 1,41 mg FW · ml⁻¹; Sklípkan - nohy: 1 mg FW · ml⁻¹; Sklípkan - chloupky v MeOH: 0,35 mg FW · ml⁻¹

Výsledky stanovení cytotoxicity jsou znázorněny na *Obr.13*. Kontrolní vzorek s DMSO vykazoval aktivitu 100 % a je v grafu znázorněn vodorovnou čarou. Viabilita buněk kultivovaných s extrakty *C. coniocraea*, muchomůrka – třeň, včely medonosné a slunéčka východního byla snížena o více než 60 %. Naproti tomu vzorek ruměnice pospolné a mravence obecného zvyšuje viabilitu buněk o 130 – 150 %. Viabilita buněk se pohybovala v rozmezí od 10 do 150 %, ale většina extraktů neměla na viabilitu významný vliv.

5.3 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita byla určena prostřednictvím mikrodiluční metody na mikroorganismech *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Pomocí tohoto testování byla stanovena minimální bakteriocidní koncentrace, minimální bakteriostatická koncentrace a minimální inhibiční koncentrace. Výsledky jsou znázorněny v *Tab. 6*.

Tab. 6: Stanovení citlivosti mikroorganismů vůči přírodním extraktům mikrodiluční metodou. Doba inkubace: 24 hodin.

Vzorek	Mikroorganismus	MBC ¹ [mg/ml]	MBS ² [mg/ml]	MIC ³ [mg/ml]
<i>Cladonia coniocraea</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,01	0,51	0,51
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,01	NA ⁴	1,01
	<i>Streptococcus mutans</i>	1,01	0,51	0,51
	<i>Bacillus cereus</i>	1,01	0,25	0,25
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,25	0,13	0,13
	<i>Clostridium perfringens</i>	0,51	0,13	0,13
Včela medonosná	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	4,03	4,03
	<i>Streptococcus mutans</i>	1,01	NA	1,01
	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2,01	0,50	0,50
	<i>Clostridium perfringens</i>	2,01	NA	2,01
Sklípkan - hlavohruď	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	5,64	5,64
Sklípkan - zadeček	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	3,72	3,72
<i>Cladonia fimbriata</i>	-	NA	NA	NA
Muchomůrka - klobouk	-	NA	NA	NA
Muchomůrka - třeň	-	NA	NA	NA
Mravenec	-	NA	NA	NA
Slunéčko	-	NA	NA	NA
Ruměnice	-	NA	NA	NA
Sklípkan - nohy	-	NA	NA	NA
Sklípkan - chloupky v MeOH	-	NA	NA	NA
Kontrola - chloupky v MeOH	-	NA	NA	NA

MBC¹ = minimální bakteriocidní koncentrace

MBS² = minimální bakteriostatická koncentrace

MIC³ = minimální inhibiční koncentrace

NA⁴ = neaktivní

Aktivitu vykazovaly vzorky *C. coniocraea*, včela medonosná, sklípkan – hlavohruď a sklípkan – zadeček, a to pouze vůči grampozitivním bakteriím. Minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly v koncentracích od 0,13 do 5,64 mg/ml. Nejlépe fungoval proti všem grampozitivním patogenům vzorek *C. coniocraea*. Obecně byly účinnější extrakty vůči anaerobním bakteriím.

6 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo najít látky získané z poměrně netradičních přírodních vzorků, které by aktivovaly dráhu transkripčního faktoru Nrf2 a nesnižovaly viabilitu buněk. Takovéto vzorky by bylo vhodné podrobit dalšímu testování, neboť by mohly být vhodné pro vývoj nových léčiv zaměřujících se na snížení oxidativního stresu, a tím i snížení rizika vzniku nádoru (Surh et al., 2008). Dalším cílem bylo najít látky z přírodních vzorků, které by vykazovaly antimikrobiální aktivitu, a díky tomu byly vhodné pro další výzkum jakožto potencionální antibiotika či látky působící proti rostlinným škůdcům.

Muchomůrka červená v předkládané práci aktivovala transkripční faktor Nrf2 a zároveň vzorek muchomůrka – třeň působil cytotoxicky. Muchomůrka červená obsahuje v klobouku barvivo betalain, což je poměrně neočekávané a jeho význam v muchomůrce je zatím neznámý (Strack et al., 2003). Bylo zjištěno, že betalainy aktivují dráhu transkripčního faktoru Nrf2. Betalainy se aktivně účastní na vychytávání volných radikálů, jsou silnými antioxidanty, a tím mohou zabránit vzniku rakoviny či kardiovaskulárních chorob (Gengatharan et al., 2015). Muchomůrka červená obsahuje, zejména v klobouku (v červené a žluté vrstvě), muscimol a kyselinu ibotenovou, které jsou příčinou toxicity této houby. Jedná se o toxiny, které jsou strukturou velice podobné kyselině glutamové a kyselině gama-aminomáselné, což jsou významné neurotransmitery (Johnston, 2014; Michelot & Melendez-Howell, 2003; Satora et al., 2005). Toxicita muchomůrky červené tedy spočívá v jejích účincích na nervovou soustavu, a z toho důvodu pravděpodobně nevykazovala během testování cytotoxicitu na buněčné linii BJ, získané z lidských primárních fibroblastů. Jelikož ale byla ve směsi třeně a prstence muchomůrky stanovena cytotoxicita, je možné, že tato houba obsahuje další látky podílející se na její toxicitě, které se nevyskytují v klobouku.

Mravenec obecný v této bakalářské práci nevykazoval cytotoxicitu a zároveň aktivoval transkripční faktor Nrf2. Mravenec obecný má ve svém těle celou řadu exogenních žláz, kdy jednou z nich je Dufourova žláza, která produkuje látky složené ze směsí alkanů s dlouhým řetězcem a alkenů, některých terpenových uhlovodíků a sloučenin, jako jsou alkoholy, aldehydy, ketony a estery. Tyto sloučeniny jsou využívány mravenci jako feromony a to stopovací, teritoriální nebo obranné (Billen et al., 2009). Právě ketony by mohly být chemickou látkou, díky které byly výsledky testu Nrf2 assay pozitivní, neboť ketony jsou tzv. Michealovy akceptory, které aktivují dráhu transkripčního faktoru Nrf2 (Keum & Choi, 2014). Zvýšená sekrece těchto látek mohla být způsobena obrannou reakcí

na odchyt a následnou extrakci. Hojně se vyskytující látkou v sekretu je také undekan a to až z 42 % (Attygalle et al., 1987). U něj ale zatím nebylo prokázáno, že by aktivoval dráhu transkripčního faktoru Nrf2. Vzhledem k tomu, že dle výsledků nevykazoval vzorek extraktu z mravence cytotoxicitu, bylo by zajímavé provést další testování, které by umožnilo odhalit konkrétní látky, které by potencionálně mohly mít příznivé účinky na lidský organismus.

Vzorek sluněčka východního působil vysoce cytotoxicky, což mohlo být způsobeno obrannou sloučeninou harmonin ((17 R ,9 Z)-1,17-diaminooctadec-9-en), která je přítomna v hemolymfě a některé výzkumy uvádějí, že vykazuje antiproliferativní a cytotoxickou aktivitu (Alam et al., 2002).

Dalším vzorkem, který významně snižoval viabilitu buněk byl vzorek lišejníku *C. coniocraea*, což je pozoruhodné vzhledem k tomu, že vzorek *C. fimbriata* vykazoval pouze slabou cytotoxicitu, ačkoliv se jedná o stejný rod, a tudíž lze předpokládat, že obsahují podobné metabolity. U lišejníků by bylo vhodné provést měření znovu se vzorky z jiných míst, neboť je důležité brát v potaz fakt, že mohlo dojít ke vstřebání některých látek od okolních rostlin. Lišejníky totiž obsahují také houbovou složku, která je známá schopností vstřebávat látky z okolního prostředí rozpuštěných například ve vodě. V lišejnících rodu *Cladonia* byla stanovena přítomnost kyseliny usnové, která vykazovala antimikrobiální a antiproliferativní aktivitu (Ingólfssdóttir, 2002; Shrestha & St. Clair, 2013). Je tedy možné, že vzorek *C. coniocraea* obsahoval kyselinu usnovou, kdežto vzorek *C. fimbriata* nikoliv, poněvadž nevykazoval ani významnou cytotoxicitu, ale ani antimikrobiální aktivitu.

Vzorek včela medonosná působil cytotoxicky, a také aktivoval transkripční faktor Nrf2. Jednalo se o vzorek mrtvých včel, které přirozeně umírají na podzim. Je tedy možné, že některé látky mohly být degradovány. V jedovém včelím vaku vytvářejí jed, tzv. apitoxin jehož hlavní složkou je melittin, který vykazuje cytotoxické účinky (Y. J. Lee et al., 2007). Právě melittin s nejvyšší pravděpodobností zůstal v těle včely a byl zodpovědný za cytotoxické účinky i během našeho testování. Včely také vytvářejí propolis, který je vyráběn mísením rostlinných pryskyřic s hlavovými výměšky včel. Bylo dokázáno, že propolis vykazuje antioxidační účinky a obsahuje mimo jiné také flavonoidy a fenolické látky, které jsou aktivátory dráhy transkripčního faktoru Nrf2 (Magesh et al., 2012; Miorin et al., 2003).

Všechny vzorky získané ze sklípkana kadeřavého vykazovaly mírnou cytotoxicitu, která byla s nejvyšší pravděpodobností způsobena neurotoxinem brachyinem, který inhibuje

proliferaci nádorových buněk (Zhong et al., 2014). Neurotoxin se pravděpodobně v nejvyšší míře vyskytuje v hlavohrudí, a proto byla cytotoxicita nejpatrnější právě ve vzorku sklípkan – hlavohrud'.

Ruměnice pospolná využívá pro svou obranu výměšek, který obsahuje defensiny (Von Nussbaum et al., 2006). Během testování v rámci bakalářské práce zvyšovala viabilitu buněk. V literatuře nebyla nalezena informace o případné cytotoxicitě defensinů izolovaných z ruměnice pospolné.

Během testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou byla stanovována minimální inhibiční koncentrace. Vzorky sklípkan – hlavohrud' a sklípkan - zadeček byly aktivní vůči mikroorganismu *Staphylococcus aureus* a vzorky *C. coniocraea* a včela medonosná byly aktivní vůči většině testovaným grampozitivním bakteriím.

Minimální inhibiční koncentrace vzorku *C. coniocraea* byla nejnižší vůči mikroorganismu *Actinomyces odontolyticus* a *Clostridium perfringens*, neboť se jedná o anaerobní bakterie, které jsou celkově citlivější na antimikrobiální látky. Vzorek *C. coniocraea* vykazoval aktivitu pouze vůči grampozitivním bakteriím, nikoliv vůči gramnegativním. Některé lišejníky rodu *Cladonia* obsahují kyselinu usnovou, která působí antibakteriálně (Ingólfssdóttir, 2002).

Minimální inhibiční koncentrace vzorku včely byla nejnižší vůči anaerobním grampozitivním bakteriím *Actinomyces odontolyticus* a *Clostridium perfringens*. Aktivita vůči grampozitivním bakteriím by mohla být způsobena přítomností peptidu včelího defensinu – 1, který je obsažen v hemolymfě, v hlavě a hrudních žlázách včel. Včelí defensin – 1 podle některých studií vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím, a to zejména *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* (Kwakman & Zaat, 2012). Stejně tak i během našeho testování byla stanovena antimikrobiální aktivita právě na bakterii *Staphylococcus aureus*. Dále bylo zjištěno, že stejné účinky vykazuje i propolis, ve kterém jsou obsaženy také výměšky hlavových žláz (Miorin et al., 2003). Je tedy možné, že se na antimikrobiální aktivitě podílí i látky obsažené v tomto hlavovém výměšku.

7 Závěr

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat rešerši zabývající se problematikou mikroorganismů a antimikrobiálních látek. Cílem experimentální části bylo extrahovat přírodní látky a stanovit na těchto extraktech antimikrobiální a cytotoxickou aktivitu, a také zjistit, zda nějaký z přírodních extraktů aktivuje dráhu transkripčního faktoru Nrf2. Všechny tyto cíle byly v rámci bakalářské práce naplněny.

Během testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou se podařilo najít zajímavý potenciální přírodní zdroj antimikrobiálních látek vůči řadě patogenům – lišejník *Cladonia coniocraea*. Je to dobrý výchozí bod pro frakcionaci, izolaci aktivních složek a chemickou charakterizaci. Tyto získané látky by mohly být využity v medicíně, kosmetice, potravinářství a dále jako součást antimikrobiálních nátěrů či postřiků.

Extrakty z klobouku muchomůrky červené a mravence obecného zvyšovaly viabilitu buněk, ale také aktivovaly transkripční faktor Nrf2. Proto by mohly být vhodnými zdroji látek, které by mohly pomoci člověku snižovat oxidativní stres, a tím chránit tělo před řadou onemocnění včetně rakoviny.

Tato problematika je v současnosti velmi intenzivně studována. Objev nových zdrojů potenciálně účinných struktur je proto významným přínosem pro další výzkum zabývající se chemopreventivními a antimikrobiálními látkami.

8 Literatura

- Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najjar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., Ferretti, J. J. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.172501299>
- Alam, N., Choi, I. S., Song, K. S., Hong, J., Lee, C. O., & Jung, J. H. (2002). A new alkaloid from two coccinellid beetles *Harmonia axyridis* and *Aiolocaria hexaspilota*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.3.497>
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Allen, M. J., Edberg, S. C., & Reasoner, D. J. (2004). Heterotrophic plate count bacteria - What is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.017>
- Allwood, A. C., Rosing, M. T., Flannery, D. T., Hurowitz, J. A., & Heirwegh, C. M. (2018). Reassessing evidence of life in 3,700-million-year-old rocks of Greenland. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0610-4>
- Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2019). *Pseudomonas syringae*: Enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000715>
- Attygalle, A. B., Vostrowsky, O., Bestmann, H. J., & Morgan, E. D. (1987). New chemicals from the dufour gland of the formicine ant *Lasius niger* (Hymenoptera:Formicidae). *Insect Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90163-6)
- Baguley, B. C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9321-2>
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.1029>
- Bata, Á., & Lásztity, R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00050-3)
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Billen, J., David Morgan, E., Drijfhout, F., & Farmier, K. (2009). Unusual structural and chemical characteristics of the Dufour gland in the ant *Meranoplus diversus*. *Physiological Entomology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00659.x>
- Boonen, J., Malysheva, S. V., Taevernier, L., Diana Di Mavungu, J., De Saeger, S., & De Spiegeleer, B. (2012). Human skin penetration of selected model mycotoxins. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.012>
- Brock, T. D. (1985). Life at high temperatures. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.230.4722.132>

- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Brütsch, T., Jaffuel, G., Vallat, A., Turlings, T. C. J., & Chapuisat, M. (2017). Wood ants produce a potent antimicrobial agent by applying formic acid on tree-collected resin. *Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1002/ece3.2834>
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Chaisakul, J., Hodgson, W. C., Kuruppu, S., & Prasongsook, N. (2016). Effects of animal venoms and toxins on hallmarks of cancer. *Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.7150/jca.15309>
- Conti, M. E., & Cecchetti, G. (2001). Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment - A review. *Environmental Pollution*. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00224-4)
- Cotty, P. J., Bayman, P., Egel, D. S., & Elias, K. S. (1994). Agriculture, Aflatoxins and *Aspergillus*. In *The Genus Aspergillus*. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0981-7_1
- Decad, G. M., & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of gram negative bacteria. XII. Molecular sieving function of cell wall. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.128.1.325-336.1976>
- FLEMING, A. (1944). THE DISCOVERY OF PENICILLIN. *British Medical Bulletin*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071032>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7)
- Holten, K. B., & Onusko, E. M. (2000). Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician*.
- Igoli, J., Gray, A., Clements, C., Kantheti, P., & Singla, R. (2014). Antitrypanosomal Activity & Docking Studies of Isolated Constituents from the Lichen *Cetraria islandica*: Possibly Multifunctional Scaffolds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140324122323>
- Ingólfssdóttir, K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00383-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00383-7)
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatal, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S. D., Overbeek, R., Kyrpides, N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01582>

- Jacoby, G. A., & Munoz-Price, L. S. (2005). The New β -Lactamases. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmra041359>
- Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>
- Johnston, G. A. R. (2014). Muscimol as an Ionotropic GABA Receptor Agonist. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1245-y>
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Keum, Y. S., & Choi, B. Y. (2014). Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules190710074>
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7130-7139.2004>
- Krzywańskiak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Koaścielniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1914-9>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Lee, S. K., Chou, H., Ham, T. S., Lee, T. S., & Keasling, J. D. (2008). Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.014>
- Lee, Y. J., Kang, S. J., Kim, B. M., Kim, Y. J., Woo, H. D., & Chung, H. W. (2007). Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.036>
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Line, M. A. (2002). The enigma of the origin of life and its timing. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-21>
- Magesh, S., Chen, Y., & Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21257>
- Malhotra, S., Subban, R., & Singh, A. (2008). Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *Journal of Alternative Medicine*.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>

- Mendoza, J., & Francke, O. (2019). Systematic revision of Mexican threatened tarantulas *Brachypelma* (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), with a description of a new genus, and implications on the conservation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 82–147. <https://doi.org/10.1093/zoolinlean/zlz046>
- Michelot, D., & Melendez-Howell, L. M. (2003). *Amanita muscaria*: Chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research*. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007305>
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.43.4.727>
- Miorin, P. L., Levy, N. C., Custodio, A. R., Bretz, W. A., & Marcucci, M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x>
- Montecucco, C., & Molgó, J. (2005). Botulinal neurotoxins: Revival of an old killer. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.12.006>
- Nathwani, D., & Wood, M. J. (1993). Penicillins: A Current Review of their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.174-229.1999>
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00204-08>
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Röhrich, C. R., Ngwa, C. J., Wiesner, J., Schmidtberg, H., Degenkolb, T., Kollwe, C., Fischer, R., Pradel, G., Vilcinskas, A. (2012). Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0760>
- Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2017). *Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy* (No. Ed. 7; G. Samuelsson & L. Bohlin, Eds.). London: CRC Press Inc.
- Satora, L., Pach, D., Butryn, B., Hydzik, P., & Balicka-Ślusarczyk, B. (2005). Fly agaric (*Amanita muscaria*) poisoning, case report and review. *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.005>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>

- Schindler, J. (2010). *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing as.
- Sefton, A. M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262040-00001>
- Seufferheld, M. J., Alvarez, H. M., & Farias, M. E. (2008). Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00501-08>
- Shrestha, G., & St. Clair, L. L. (2013). Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9283-7>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>
- Sperandeo, P., Martorana, A. M., & Polissi, A. (2017). Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.006>
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)
- Surh, Y. J., Kundu, J. K., & Na, H. K. (2008). Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088302>
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C., & Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>
- Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Mingeot-Leclercq, M. P., & Tulkens, P. M. (2010). Mechanisms of action. In *Infectious Diseases: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00130-1>
- Von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., & Häbich, D. (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.200600350>
- Yocum, R. R., Waxman, D. J., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L. (1979). Mechanism of penicillin action: Penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.6.2730>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zhong, Y., Song, B., Mo, G., Yuan, M., Li, H., Wang, P., Yuan, M., Lu, Q. (2014). A novel neurotoxin from venom of the Spider, *Brachypelma albopilosum*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110221>

Zhou, Q., Li, K., Jun, X., & Bo, L. (2009). Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.037>