

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



Antimikrobiální aktivita extraktů konopí a chmele proti vybraným plísním a bakteriím způsobujícím onemocnění kůže

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Válová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 11.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. za pomoc s realizací experimentu a cenné rady při psaní této práce, a také svým nejbližším za podporu při studiu a vypracovávání této práce.

Antimikrobiální aktivita extraktů konopí a chmele proti vybraným plísním a bakteriím způsobujícím onemocnění kůže

Souhrn

Kožní infekce způsobené bakteriemi a dermatofyty jsou v populaci nejrozšířenější. Problémem však nejsou pouze kožní onemocnění jako taková, ale i jejich léčba, která velmi často vyžaduje použití antibiotik. Antibiotika bývají mnohdy nevhodně zvolena, nadužívána nebo podávána nevhodnou formou. V důsledku toho se mezi původci těchto nemocí často rozvíjí antimikrobiální rezistence k jednomu nebo i více druhům antibiotik, která vede k neúčinnosti léčby. Příliš časté či dlouhodobé užívání antibiotik může mít negativní dopad i na lidský organismus. Proto je potřeba zkoumat další možnosti léčby a dát prostor účinným látkám obsaženým například v rostlinách.

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit antimikrobiální aktivitu konopných a chmelových extraktů připravených různými metodami proti vybraným plísním a bakteriím způsobujícím onemocnění kůže.

Celkem bylo získáno sedm extraktů (tři konopné a čtyři chmelové) ve třech různých rozpouštědlech – voda, ethanol, dimethylether (DME). Antimikrobiální aktivita extraktů byla testována *in-vitro* pomocí mikrodiluční metody na vybraných mikroorganismech způsobujících onemocnění kůže (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*).

Výsledky experimentu potvrdily, že chmelové a konopné extrakty vykazují antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům způsobujícím onemocnění kůže a že způsob extrakce a použité rozpouštědlo mají vliv na výslednou antimikrobiální aktivitu extraktů. Extrakty působily spíše antibakteriálně než antifungálně. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zjištěna u DME extraktů (konopný dosáhl u *S. pyogenes* minimální inhibiční koncentrace 2 µg/ml), naopak nejnižší aktivitu vykazovaly vodné extrakty obou rostlin (konopný extrakt ve sledovaných koncentracích působil jako neúčinný u všech patogenů – MIC >512/>1024). Nejvíce rezistentními mikroorganismy vůči všem testovaným extraktům byly *C. albicans* a *P. aeruginosa* – ta reagovala pouze na antibiotikum tetracyklin.

Klíčová slova: chmel, konopí, antimikrobiální aktivita, protiplísňová aktivita, extrakční činidla

Antimicrobial activity of cannabis and hop extracts against selected bacteria and fungi causing skin diseases

Summary

Skin infections caused by bacteria and dermatophytes are the most common in population. The problem is not only skin diseases but also their treatment which often requires the use of antibiotics. The antibiotics are frequently prescribed incorrectly, overused or applied in an inappropriate dosage form. That is the reason why the antimicrobial resistance has been developing among the skin disease agents to one or more antibiotics which has led to an inefficient treatment. If the antibiotics are used too often or long term, all of this has a negative impact on a human organism. Therefore, it is necessary to investigate other possibilities of treatments and give an opportunity to active substances which are contained in some plants for example.

The aim of this diploma thesis has been to evaluate the antimicrobial activity of cannabis and hop extracts prepared by various methods against selected moulds and bacteria causing skin diseases.

Seven extracts were obtained (three from cannabis and four from hop) from three different solvents – water, ethanol, dimethylether (DME). The antimicrobial activity of extracts was tested *in-vitro* through microdilution method on selected microorganisms causing skin diseases (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*).

The results of the experiment have confirmed that hop and cannabis extracts have antimicrobial activity towards the microorganisms causing skin diseases. The way of the extraction and the used solvent have the influence on the final antimicrobial activity of the extracts. The extracts have had greater effect on bacteria than moulds. The highest recorded antimicrobial activity has been found out at the DME extracts (the cannabis extract achieved minimal inhibitory concentration of 2 µg/ml in *S. pyogenes*), on the other hand the lowest activity has been proved at water extracts of both plants (the cannabis extract in tested levels of the concentration was inactive at all of the pathogens – MIC >512/>1024). The most resistant microorganisms against all the tested extracts were *C. albicans* and *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* reacted only to tetracycline antibiotic.

Keywords: hop, cannabis, antimicrobial activity, antifungal activity, extraction reagents

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Vědecké hypotézy a cíl práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Významné mikroorganismy způsobující kožní onemocnění	9
3.1.1	Bakterie.....	9
3.1.2	Kvasinky.....	14
3.1.3	Plísně (dermatofyty)	15
3.2	Léčba bakteriálních a plísňových onemocnění kůže	18
3.2.1	Problematika antimikrobiální rezistence	19
3.2.2	Alternativní možnosti léčby bakteriálních a plísňových kožních infekcí ...	20
3.3	Využití konopí a chmelu jako ATB agens	23
3.3.1	Konopí seté.....	23
3.3.2	Chmel otáčivý.....	25
4	Materiál a metody	27
4.1	Rostlinný materiál.....	27
4.2	Příprava extraktů	27
4.2.1	Ethanolové, vodné a dimethyletherové extrakty	27
4.3	Testování antimikrobiální aktivity.....	30
4.3.1	Testované mikroorganismy	30
4.3.2	Příprava kultivačních médií a agarů	30
4.4	Testování antimikrobiální a antifungální aktivity mikrodiluční metodou..	32
4.4.1	Příprava inokula.....	32
4.4.2	Mikrodiluční metoda	32
5	Výsledky	34
6	Diskuze	37
7	Závěr.....	41
8	Seznam literatury	42
9	Seznam obrázků	46

1 Úvod

Onemocnění kůže je v celosvětovém měřítku velmi častým problémem. Lidé se s problémy s kůží mnohdy potýkají již od dětství. Kožní infekce způsobené bakteriemi a dermatofyty jsou v populaci právě těmi nejrozšířenějšími. Jelikož výčet patogenů a jimi způsobená onemocnění v této práci nezahrnuje závažné stavy podléhající povinně hlášeným infekčním nemocem, nelze uvést konkrétní statistiky výskytu těchto onemocnění. Problémem však nejsou pouze kožní onemocnění jako taková, ale i jejich léčba. Bakteriální infekce kůže často vyžadují kromě lokální aplikace různých léčivých mastí, krémů a past také celkovou léčbu pomocí antibiotik, které jsou mnohdy nevhodně zvoleny, užívány v nadměrné nebo naopak nedostatečné míře, nebo aplikovány nevhodnou formou. V důsledku toho se mezi původci těchto nemocí často rozvíjí antimikrobiální rezistence k jednomu nebo i více druhům antibiotik, která vede k neúčinnosti léčby. Příliš časté či dlouhodobé užívání antibiotik může mít negativní dopad na lidský organismus, kdy může docházet například k poruchám krvetvorby nebo narušení střevní mikroflóry, což může vést k narušení imunitního systému. Poškozena mohou být také játra a ledviny, výjimkou nejsou ani vzniklé alergie na antibiotické preparáty (například penicilin). U dermatofytů již také byla zpozorována rezistence k antimykotickým preparátům, které nebyly používány dle dodaného návodu, byly nevhodně skladovány či používány po době expirace. Při opakované léčbě již tyto preparáty nebyly účinné. Také kvasinky rodu *Candida* vykazují jistou rezistenci při léčbě jimi způsobených onemocnění. Proto je potřeba zkoumat další možnosti léčby, pokusit se vyhnout běžně používaným léčivům a dát prostor účinným látkám obsaženým například v rostlinách. Konopí je zkoumáno pro své široké spektrum pozitivních účinků již poměrně dlouhou dobu. Chmel, který je konopí příbuzný, bývá často přehlížen i přesto, že vykazuje antimikrobiální aktivitu. Ta byla dosud využívána především v pivovarnickém průmyslu. V léčbě kožních onemocnění zatím chmelu nebyl přikládán větší význam.

2 Vědecké hypotézy a cíl práce

Chmelové a konopné extrakty vykazují antimikrobiální aktivitu vůči mikroorganismům způsobujícím onemocnění kůže. Způsob extrakce a použité rozpouštědlo mají vliv na výslednou antimikrobiální aktivitu chmelových a konopných extraktů.

Cílem práce bude vyhodnotit antimikrobiální aktivitu konopných a chmelových extraktů připravených různými metodami proti vybraným plísním a bakteriím způsobujícím onemocnění kůže.

3 Literární rešerše

3.1 Významné mikroorganismy způsobující kožní onemocnění

3.1.1 Bakterie

3.1.1.1 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* v současné době zahrnuje asi 40 druhů a poddruhů. Pro člověka mají z hlediska patogenity největší význam koaguláza-negativní druhy *S. epidermidis* a *S. saprophyticus* a koaguláza-pozitivní druh *S. aureus*. Jedná se o fakultativně anaerobní, sférické, gram-pozitivní, nepohyblivé a nesporulující koky, které jsou ve většině případů neopouzdřené. Jejich průměr se pohybuje okolo 1 μm (Bednář et al. 1996).

Stafylokoky vykazují značnou odolnost vůči vlivům zevního prostředí. Obzvláště za přítomnosti bílkovin mohou odolat vysychání až po dobu několika týdnů – např. v zaschlém hnisu (Bednář et al. 1996). Rostou při teplotách v rozmezí 18 až 40 °C. Jsou rezistentní také k vyšším koncentracím soli – například 10% NaCl (Murray et al. 2013). Díky těmto vlastnostem je některým druhům umožněno přechodné či rezidentní osídlení určitých kožních oblastí (Bednář et al. 1996).

U stafylokokových infekcí je celkem běžná recidiva, výjimkou není ani chronický průběh onemocnění. Zdrojem infekce je téměř vždy člověk, buďto jako zdravý přenašeč, nebo nemocný s otevřenou zánětlivou ránou. Přenos probíhá nepřímo, přímým stykem nebo vzdušnou cestou. Výjimkou není ani endogenní infekce vlastním kmenem. Nejčastěji se vyskytujícími stafylokokovými infekcemi jsou pyodermie (hnisavá onemocnění kůže) (Bednář et al. 1996).

Staphylococcus aureus

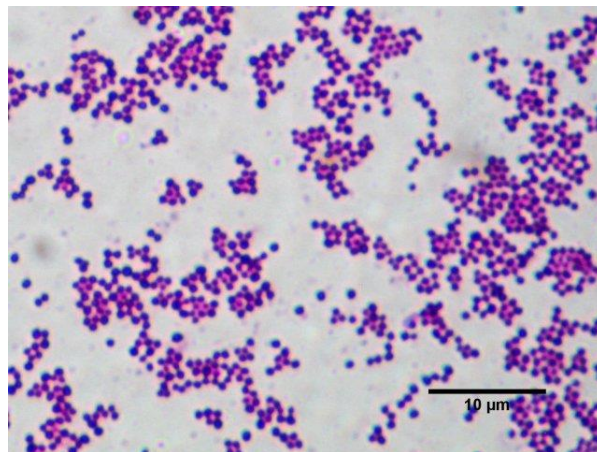
Jako jeden z biochemicky nejaktivnějších bakteriálních druhů, je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic. Mnohé z jeho produktů, jako jsou toxiny, exoenzymy či řada komplexních látek buněčné stěny, se uplatňují jako faktory virulence (vlastnost vyjadřující úroveň patogenity). Spolu se streptokoky se řadí mezi nejčastější původce pyogenních (hnisavých) infekcí. Název tohoto druhu je odvozen od žluté či zlatavé barvy kolonií, která je dána vznikem karotenoidních barviv během jejich růstu (Murray et al. 2013).

S. aureus (viz Obrázek 1) je patogenní pro prakticky celé spektrum teplokrevných živočichů včetně člověka. Pokud nedojde k oslabení organismu nebo vystavení velké dávce

virulentního kmene, je lidský organismus vůči stafylokokové infekci značně odolný (Bednář et al. 1996). K rozvoji abscesu v ráně běžně stačí inokulace sto zárodky této bakterie. Pokud se v ráně nachází i nějaké cizí těleso (např. tříska, katetr, spojka, protetická chlopeč nebo kloub), pro vznik nemoci stačí podstatně menší množství stafylokoků (Murray et al. 2013). Chirurgické zákroky, diabetes, úrazy, maligní onemocnění či snížená imunita mohou být významnými predisponujícími faktory způsobující stafylokokové infekce. Větší náchylnost k napadení stafylokokem vykazují nedonošení novorozenci, kojenci a senioři (Bednář et al. 1996).

Infekce vyvolané tímto patogenem jsou způsobeny produkcí toxinů nebo přímou invazí a zničením tkáně kdy dojde k překonání přirozené bariéry hostitele, což umožňuje snazší průnik patogenu hlouběji do okolních tkání, kde se může pomnožit. (Murray et al. 2013). Ve většině případů se invazivní onemocnění projevují abscesovými ložisky, nebo se mohou šířit jako flegmonózní zánět – tedy bez ohraničení (Honeyman et al. 2011).

S. aureus je původcem těchto kožních onemocnění: syndromu opařené kůže (dětské onemocnění kůže vizuálně podobné opaření 2. stupně), impetiga (povrchová pyodermie projevující se puchýřkovitou vyrážkou), folikulitidy (zánětu vlasových váčků), furunklu (zánětlivé ložisko vlasových folikulů) a karbunklu (hnisavé ložisko vzniklé splynutím několika blízkých furunklů) (Honeyman et al. 2011).



Obrázek 1 *Staphylococcus aureus*

Zdroj: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html>

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicilin-rezistentní *S. aureus* je známý především jako původce závažných nozokomiálních nálezů, tedy infekcí souvisejících s hospitalizací pacientů v nemocničním prostředí, což může mít za následek abscesy a furunkulózu, stejně tak jako jiné infekce.

Znepokojivý je také jeho zvýšený výskyt v komunitách, kde jsou lidé v blízkém kontaktu (školky, školy, věznice, vojenské jednotky, ale i kontaktní sporty), jelikož přenos na druhé probíhá přímým kontaktem, aerosolem i kontaminovanými předměty. Lidé mohou být buďto zdravými hostiteli MRSA, nebo u nich infekce probíhá, aniž by splňovali typické rizikové faktory. Právě odtud mohou být MRSA kmeny zavlečeny do nemocničních zařízení, kde způsobují závažnější infekce (Weller et al. 2015). Nemocniční kmeny MRSA jsou prokazatelně rezistentnější k většímu množství antimikrobiálních přípravků než kmeny komunitní, u kterých je zatím zachována vyšší míra citlivosti (Lovečková 2013). Prevence vznikajících rezistentních kmenů je spojena s důkladnou hygienou, izolací pacientů, antiseptickými látkami a omezením antibiotik (Weller et al. 2015).

Nejen, že infekce způsobené MRSA mají delší průběh a vedou k vyšším nákladům na léčbu než infekce vyvolané stafylokoky citlivými na methicilin, ale co je důležitější, mají vyšší mortalitu. Nákladnost léčby je dána nutností najít vhodné antibiotikum podle kultivace a průběžnou kontrolou citlivosti rezistentních kmenů, jelikož může vzniknout odolnost i k dalším běžně používaným antibiotickým preparátům. MRSA infekce jako nozokomiální nákazy komplikující jiná závažná onemocnění mohou kvůli vysoké míře rezistence kmenů vůči mnoha druhům antibiotik zapříčinit i úmrtí pacientů. Včasné rozpoznání MRSA infekcí je rozhodující pro zajištění okamžitého zahájení vhodné antibiotické léčby (Baddour 2010).

3.1.1.2 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* je různorodou sbírkou gram-pozitivních, kataláza-negativních koků uskupených typicky v párech či řetězcích (Melter & Malmgren 2014; Murray et al. 2013). Většina je fakultativně anaerobní, některé druhy rostou pouze v atmosféře obohacené oxidem uhličitým (tzv. kapnofilní růst) (Murray et al. 2013).

Klasifikace jednotlivých druhů tohoto rodu je komplikovaná, jelikož se používají tři různá vzájemně se prolínající schémata, a to dělení dle sérologických vlastností, dle hemolytického vzorce a dle biochemických (fyziologických) vlastností. Zjednodušeně lze streptokoky rozdělit do dvou skupin: 1) β -hemolytické (klasifikováni podle Lancefieldové) a 2) α -hemolytické a γ -hemolytické (určování biochemickým testováním). Druhou skupinu lze souhrnně označit jako viridans streptococci, kdy název je odvozen od latinského „*viridis*“ (zelená), odkazující na zelený pigment vznikající částečnou hemolýzou krevního agaru. Některé druhy zařazené do této skupiny mohou být β -hemolytické stejně tak jako α -hemolytické a nehemolytické, což

vede ke klasifikaci těchto bakterií oběma způsoby – dle Lancefieldové i jako viridans streptococci (Murray et al. 2013).

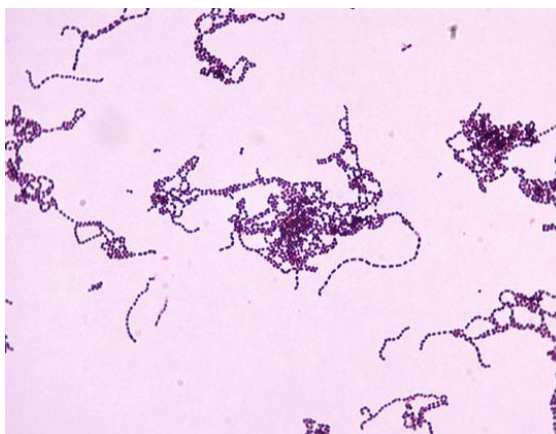
Nejčastějším typem streptokokových infekcí jsou infekce pyogenické (hnisavé) (Melter & Malmgren 2014).

Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes (viz Obrázek 2) patří do skupiny β -hemolytických koků. Je patogenní především pro člověka, člověk je také jediný přirozený zdroj infekce. Způsobuje faryngitidu (zánět nosohltanu), spálu, infekce kůže a podkoží (např. erysipel – akutní infekční onemocnění kůže a podkoží; celulitida – obdoba erysipelu postihující hlubší kožní vrstvy), systémové infekce, streptokokový toxický šokový syndrom a poststreptokokové následky (Bednář et al. 1996; Melter & Malmgren 2014).

Velmi často se objevuje bezpříznakové nosičství, zejména u dětí a mladých dospělých, které je však zpravidla přechodné. Onemocnění vzniká pouze za předpokladu, že hostitel nemá protilátky proti danému infekčnímu kmenu. Ke hnisavým formám streptokokových nákaz se řadí impetigo, erysipel a různé formy pyodermií (Bednář et al. 1996).

V příčinné souvislosti s infekcí *S. pyogenes* vznikají onemocnění nazývaná jako sterilní následky, které se objevují již v nepřítomnosti *S. pyogenes* – revmatická horečka, poststreptokoková glomerulonefritida (zánětlivé poškození glomerulů – základních filtračních jednotek ledvin) a chorea minor (také Tanec svatého Víta či Sydenhamův syndrom – neurologická porucha vyznačující se bezděčnými nekontrolovatelnými záškuby nebo kroutivými pohyby). Zejména u neléčených infekcí jsou poststreptokokové následky spojeny s přetrvávající přítomností streptokokových antigenů (Bednář et al. 1996). Poststreptokokové následky jsou v podstatě imunopatologickou zánětlivou reakcí, jež vzniká v důsledku molekulové mimikry mezi epitopy (antigenní determinanty – konkrétní oblasti antigenů, na které se vážou protilátky) M-proteinu *S. pyogenes* a antigeny (látky schopné vyvolat imunitní odpověď) bazální membrány glomerulů či struktur myokardu. M-protein je hlavním faktorem virulence, protilátky proti němu zkříženě reagují s vlastními antigeny a jako autoprottilátky způsobují sterilní zánět v postižené tkáni (Dallos et al. 2011). Před rozvojem sterilních následků po akutní fázi infekce probíhá fáze latence (Bednář et al. 1996).



Obrázek 2 *Streptococcus pyogenes*

Zdroj: <https://www.infectiousdiseasadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/streptocococcus-pyogenes/>

3.1.1.3 Rod *Pseudomonas*

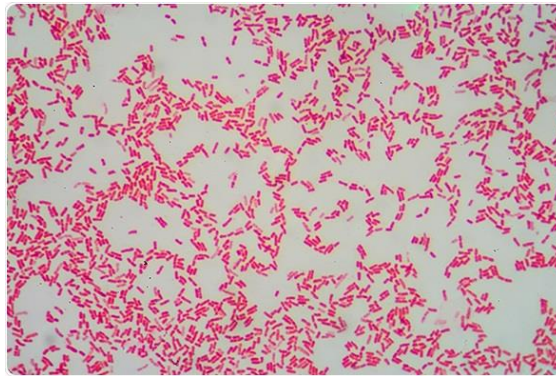
Rod *Pseudomonas* zahrnuje gram-negativní striktně aerobní tyčky, které se pohybují pomocí polárních bičíků umístěných na jednom nebo obou koncích. Snadno se množí ve volné přírodě – např. v odpadních vodách, kde se běžně vyskytují. Dále se s nimi můžeme setkat ve střevním traktu zvířat i lidí. Rostou v rozmezí teplot od 4 do 42 °C, vyhovuje jim vlhké prostředí. Některé druhy jsou specifické tvorbou pigmentu. Vyznačují se schopností rychle získat rezistenci vůči antibiotikům. Nejvýznamnějším druhem je *Pseudomonas aeruginosa* (Cornelis 2008).

Pseudomonas aeruginosa

Jedná se o homogenní druh s jasnou morfologií, biochemickou a antigenní charakteristikou. U hostitelů se sníženou imunitou kolonizuje hlavně sliznice močových cest a respiračního traktu. Může se vyskytovat také v nemocničním prostředí, a to v hojném množství. Obzvláště na resuscitačních odděleních, jednotkách intenzivní péče a na novorozeneckých odděleních kontaminuje katetry, dýchací přístroje atp. Je tedy častým původcem nosokomiálních nákaz. *Pseudomonas aeruginosa* (viz Obrázek 3) tvoří modrozelený pigment pyocyanin (metylhydrofenazin), rozpustný v chloroformu a ve vodě (Rehm 2008).

Infekce vyvolané bakterií *Pseudomonas aeruginosa* mohou napadnout jakoukoliv tkáň či orgán. Je patogenem chronických infekcí u pacientů s cystickou fibrózou, může pacienta napadnout sám nebo společně s bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* u pacientů

s chronickou plicní chorobou (Melter & Malmgren 2014). Z povrchové kolonizace mohou velmi snadno vzniknout systémová onemocnění (Bednář et al. 1996).



Obrázek 3 *Pseudomonas aeruginosa*

Zdroj: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20150526/Type-IV-pili-influence-swarming-of-Pseudomonas-aeruginosa-an-overview.aspx>

3.1.2 Kvasinky

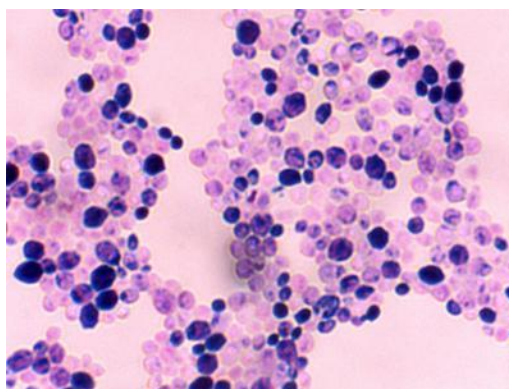
3.1.2.1 Rod *Candida*

Rod *Candida* je od poslední čtvrtiny 20. století nejběžnějším lidským houbovým patogenem a tuto pozici si drží i ve 21. století. Sdružuje přibližně 150 heterogenních příbuzných rodů, které rostou většinou v podobě jednobuněčných kvasinek. Některé druhy mohou růst i v jiných formách jako pseudohyfy nebo hyfy (např. *Candida albicans*). Jednotlivé poddruhy tohoto rodu můžeme najít v širokém spektru specifických prostředí s relativně malým počtem druhů částečně spojovaným s kolonizací a onemocněním u lidí. Infekce způsobené tímto rodem jsou nazývány kandidózy. Mohou napadnout kůži, sliznice nebo celé orgány, avšak pouze po mimořádném přemnožení – v těle se totiž běžně vyskytují (*C. albicans*) – z důvodu slabé imunity, při užívání hormonální antikoncepce či antibiotik (Calderone & Clancy 2012). Kožní infekce způsobené tímto rodem vznikají na oblastech pokožky, které jsou navlhčeny okluzí (forma aplikace masti na kůži, kdy je nanesena pod plastovou fólii – nepropouští vodu, kůže je zvlhčena a může se zapařit) nebo macerací (Heitman et al. 2006).

Candida albicans

Candida albicans (viz Obrázek 4) je původcem většiny kvasinkových onemocnění. Běžně se vyskytuje v ústní dutině, trávicím ústrojí či pohlavních orgánech. Je schopna způsobit

onemocnění v podobě povrchových infekcí sliznic až po systémové, život ohrožující onemocnění u neutropenických hostitelů, tedy jedinců s nízkou hodnotou neutrofilů (nejčastějším typem bílých krvinek). Nedostatek bílých krvinek způsobuje snížení imunity a tím dává prostor pro snazší propuknutí onemocnění (Heitman et al. 2006). Kandidózy na povrchu kůže lze léčit relativně snadno oproti vzácnějšímu celkovému napadení organismu, které může být až smrtelné (Calderone & Clancy 2012).



Obrázek 4 *Candida albicans*

Zdroj: <https://www.lifepersona.com/candida-albicans-benefits-diseases-and-their-symptoms-treatments>

3.1.3 Plísňe (dermatofyty)

Dermatofyty jsou specializovaní parazité keratinu, ke kterým náleží anamorfní rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Jedná se o skupinu hub, které způsobují infekce kůže, nehtů a vlasů (Campbell et al. 2013).

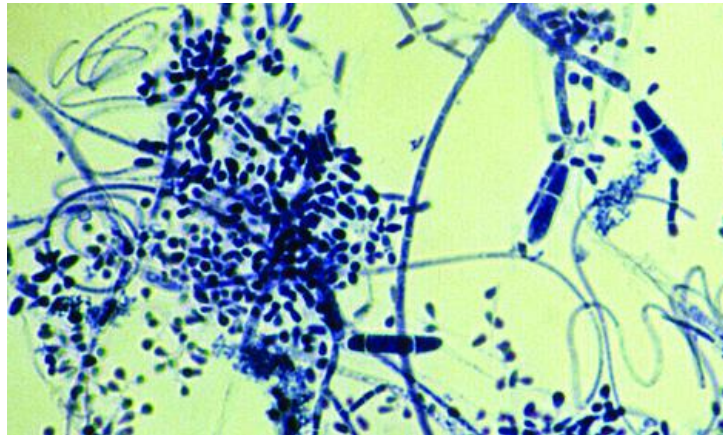
3.1.3.1 Rod *Trichophyton*

Rod *Trichophyton* v současné době zahrnuje 16 druhů s téměř dvěma sty poddruhy. Řadí se mezi ně parazitické kmeny, které způsobují již zmíněné infekce nehtů, vousů a kůže včetně pokožky hlavy. Vytvářejí hladkostěnná mikrokonidia a makrokonidia. Zástupci rodu *Trichophyton* jsou původci infekcí nazývaných *tinea*, které se pojmenovávají podle oblasti, kterou napadají (např. *tinea pedis* – infekce nohou) (Sciortino 2017).

Trichophyton interdigitale

Trichophyton interdigitale (viz Obrázek 5) je pomalu rostoucím (7-12 dní) původcem antropofilních a zoofilních infekcí. Mikrokonidie mívají kapkovitý tvar na rozdíl

od makrokonidií, které většinou chybí. Vytváří bílé kolonie se žlutým okrajem a oranžovým reverzem. Způsobuje například *tinea pedis* (atletická noha), *tinea unguium* neboli onychomykózu (mykóza nehtové ploténky nohou i rukou) a *tinea corporis* (mykóza postihující obličej, trup, horní a dolní končetiny) (Hubka et al. 2014).



Obrázek 5 *Trichophyton interdigitale*

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

3.1.3.2 Rod *Epidermophyton*

Infekce způsobené tímto rodem napadají pouze kůži a nehty. Od rodů *Trichophyton* a *Microsporum* se liší absencí mikrokonidií (Sciortino 2017).

Epidermophyton floccosum

Epidermophyton floccosum (viz Obrázek 6) je antropofilním druhem, který může zapříčinit malé epidemie v uzavřených kolektivech používajících společné hygienické zařízení. Pomalu rostoucí žlutohnědé kolonie se paprscitě rozbíhají a mohou mít nazelenalý podtón. Reverz je žlutozelený až hnědooranžový. Způsobuje *tinea cruris* (mykóza třísel, zevních pohlavních orgánů a hýždí), *tinea pedis*, *tinea corporis* a onychomykózu (de Hoog et al. 2001).



Obrázek 6 *Epidermophyton floccosum*

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

3.1.3.3 Rod *Microsporum*

Rod *Microsporum* je v současné době omezen pouze na tři druhy, a to *M. audouinii*, *M. canis* a *M. ferrugineum*. Ostatní geofilní a zoofilní druhy, dříve zařazované k rodu *Microsporum*, byly přesunuty do rodů *Lophophyton*, *Nannizzia* a *Paraphyton* (de Hoog et al. 2016).

Microsporum canis

Microsporum canis (viz Obrázek 7) je zoofilní dermatofyt rozšířený po celém světě. Je častým původcem dermatofytózy *tinea corporis* u lidí, zejména u dětí. Napadá vlasy, kůži a výjimečně nehty. Hlavním zdrojem nákazy jsou psi a kočky. Ploché kolonie bílé až krémové barvy s hustým vláknitým povrchem se paprskovitě rozšiřují. Reverz je jasně zlatožlutý až hnědožlutý, nicméně se mohou objevit i jako bezpigmentové kmeny. Je nejčastějším původcem *tinea capitis* (de Hoog et al. 2001).



Obrázek 7 *Microsporum canis*

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

3.2 Léčba bakteriálních a plísňových onemocnění kůže

Terapie kožních onemocnění způsobených bakteriemi a plísněmi probíhá několika způsoby podle typu infekce (Cornbleet 2016).

Méně závažná bakteriální onemocnění kůže lze vyléčit hygienickým opatřením a předepsáním různých antimikrobiálních hojivých mastí (např. s obsahem kyseliny salicylové či ureou) a antiseptických či dezinfekčních roztoků zabraňujících šíření infekce. U závažnějších infekcí již přichází na řadu celková terapie pomocí antibiotik, která lze aplikovat injekčně nebo ve formě tablet. Mnohdy je zapotřebí i chirurgický zákrok, zejména vytvoří-li se na kůži větší abscesy (furunkl), které je nutné zbavit hnisu prostřednictvím chirurgického rozříznutí. Po zákrocích tohoto typu není výjimkou lokální aplikace antibiotik jako doplnění celkové antibiotické léčby. U vážných případů někdy bývá nezbytná i amputace postižené části, což je typické např. pro celulitidu (flegmónu). Z farmak se při léčbě kožních pyodermií mohou uplatnit také antihistaminika, která zmírňují zánět a ulevují od svědění (Guay 2003).

Antimikrobiální přípravky jsou významnou součástí léčby kožních onemocnění. Díky diagnóze a výsledkům mikrobiologických vyšetření umožňují kauzální léčebný zásah, který má ve většině případů významný klinický efekt, pokud jsou dodrženy všechna potřebná bezpečnostní opatření. Rozlišujeme antibiotika s cidním nebo statickým účinkem. Baktericidní preparáty účinkují rychleji (zpravidla do 48 hodin), bakteriostatické mají nástup účinku obvykle během 3-4 dnů. Při snížené obranyschopnosti pacienta a u závažných klinických stavů jsou upřednostňovány bakteriocidní látky, mezi které patří hlavně betalaktamy (monobaktamy, peniciliny, karbapenemy a cefalosporiny), cyklické lipopeptidy (daptomycin), aminoglykosidy (netilmicin, amikacin, gentamicin) nebo glykopeptidy (teikoplanin, vankomycin). Cidní účinky vykazují i často užívané chinolony či co-trimoxazol. Tetracyklíny a makrolidy jsou zástupci bakteriostatických léčiv, po jejichž účinku se imunitní systém musí vypořádat s potlačenými mikroby. Pro zajištění optimálního léčebného efektu je v některých případech nezbytná kombinace antimikrobiálních přípravků, aby došlo např. k rozšíření antibakteriálního spektra, oddálení vzniku rezistence nebo bylo dosaženo synergického účinku (Lovečková 2012).

Při antibiotické léčbě je stále větším problémem antimikrobiální rezistence patogenů. Ta je více rozebrána v podkapitole 3.2.1. Stafylokoky mají pozoruhodnou schopnost vyvinout si odolnost proti většině antibiotik. Jsou rezistentní např. k antibiotiku penicilin. Kvůli problémům s penicilin-rezistentními stafylokoky byly vyvinuty polosyntetické peniciliny (methicilin, nafcilin, oxacilin, dicloxacilin), vůči kterým se však stafylokoky také staly odolnými. Až donedávna byl vankomycin jediné antibiotikum, které zůstalo plošně účinné proti stafylokokům

rezistentním vůči methicilinu. Objevily se však další kmeny *S. aureus* rezistentní i vůči vankomycinu (Murray et al. 2013). Při MRSA nákazách se volí preparáty jako clindamycin nebo doxycyklin. U závažných stavů způsobených bakteriálními exoprodukty (stafylokokový a streptokokový syndrom toxického šoku, stafylokokový syndrom opařené kůže) je vyžadována razantní aplikace antistafylokokových či betalaktamových antibiotik, a to ve vysokých dávkách (Lovečková 2012). Orální léčba stafylokokových infekcí může zahrnovat trimethoprim-sulfamethoxazol či dlouho působící tetracykliny, jako jsou doxycyklin, minocyklin, clindamycin nebo linezolid. Někdy se však objevuje rezistence i na clindamycin. Použití linezolidu je zase limitováno jeho cenou a toxicitou. Pro intravenózní terapii se volí vancomycin, jehož akceptovatelné alternativy jsou daptomycin, tigeceyklin nebo linezolid (Murray et al. 2013).

Terapie plísňových kožních infekcí (dermatomykóz, dermatofytóz) trvá poměrně dlouhou dobu, velmi často se objevuje i recidiva (Cornbleet 2016). Nejčastěji je na postiženou kůži aplikována lokální léčba ve formě roztoků, krémů či past. U závažnějších infekcí kůže lze podávat léky ve formě tablet. Antimykotika se běžně používají po dobu 2-3 týdnů u kožních onemocnění a až 5 měsíců u onemocnění nehtů (Eldridge et al. 2014). Celková léčba antimykotiky u kandidóz se řídí lokalizací, rozsahem i celkovým stavem pacienta (Lovečková 2012). Během léčby je samozřejmostí dodržování hygienických zásad, omezení kontaktu s dalšími lidmi, aby nedocházelo k dalším přenosům, a nošení prodyšného oděvu či obuvi (Eldridge et al. 2014).

3.2.1 Problematika antimikrobiální rezistence

Jedním z významných medicínských problémů je v současnosti narůstající rezistence mikrobů k antimikrobiálním látkám, a to zejména ve zdravotnických zařízeních (Lovečková 2012). Jedná se o přirozený proces, který podporuje fakt, že např. bakterie se velice snadno přizpůsobují nepříznivému prostředí, což je dáno jejich rychlou genetickou variabilitou (Mandell et al. 2015). V současné době lze najít i takové bakteriální druhy, které jsou tzv. panrezistentní – tedy odolné vůči všem známým antibiotikům. Jedním z nejběžnějších rezistentních kmenů je Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), který byl izolován již v roce 1961 (Lowy 2003). U dermatofytů již také byla zpozorována rezistence k antimykotickým preparátům, které nebyly používány dle dodaného návodu, byly nevhodně skladovány či používány po době expirace. Při opakované léčbě již tyto preparáty nebyly účinné

(Mandell et al. 2015). Také kvasinky rodu *Candida* vykazují jistou rezistenci při léčbě jimi způsobených onemocnění. Vyšší počet rezistentních druhů (zejména *C. glabrata*), což je spojováno nejčastěji s podáváním různých azolů (např. flukonazol) v profylaxi, byl zaznamenán hlavně v hematologických a transplantacích centrech (Mallátová et al. 2011).

Šíření rezistence je zapříčiněno selekčním tlakem používaných antibiotik. Vznik rezistence je připisován mutaci, přenesení genu pro rezistenci nebo genu, který kóduje produkci betalaktamázy. Přenos probíhá pomocí plazmidu (malá kruhovitá molekula DNA) nebo transpozónu (segment DNA schopný změnit lokalizaci v genomu – „pohyblivý gen“) (Lovečková 2012).

Na rezistenci má do jisté míry vliv předepisování nevhodných typů antibiotik, nevhodná aplikační forma a také jejich aplikace v nadměrné nebo naopak nedostatečné míře na základě zažitých dávkovacích schémat, která nereflektují např. pacientovu tělesnou hmotnost ani minimální inhibiční koncentrace patogenů (Sköld 2011). Nejčastěji se chybuje podáním antibiotika v případech neinfekčních či virových onemocnění. Nesprávné je také nasazení antibiotik před odběrem biologického materiálu (např. stěr z rány), jelikož pak není možné prokázat etiologické agens. Dalším chybným krokem může být předčasná změna preparátu, který ještě nezačal účinkovat, výměna za medikament spadající do stejné skupiny, použití širokospektrého antibiotika u onemocnění s užším spektrem nebo nezohlednění zdravotního stavu pacienta (snížená funkčnost jater, ledvin atp.) (Lovečková 2012). Špatně podávaná antibiotika mohou způsobit potíže i samotnému pacientovi, zejména co se týče narušení přirozené střevní mikroflóry nebo poruch krvetvorby, což může vést k narušení imunitního systému. Poškozena mohou být také játra a ledviny, výjimkou nejsou ani vzniklé alergie na antibiotické preparáty (např. penicilin) (Sköld 2011).

Předpokladem úspěšné léčby je správná klinická diagnóza, znalost původu konkrétního onemocnění a vhodně zvolená antibiotika (Mandell et al. 2015). K zahájení antimikrobiální léčby by mělo dojít pouze za předpokladu, že se jedná o infekční stav, který byl vyvolán mikroby, které lze daným léčivem skutečně postihnout (Lovečková 2012).

3.2.2 Alternativní možnosti léčby bakteriálních a plísňových kožních infekcí

Přírodní bylinné léky z rostlin pro léčbu kožních nemocí se stávají čím dál více populárními, a to hned kvůli několika výhodám, jako jsou méně často se vyskytující vedlejší

účinky nebo lepší snášenlivost pacienty. Byliny jsou bohatým zdrojem aktivních látek a mohou být bezpečnější a cenově příznivější pro léčbu kožních onemocnění od vyrážek až po rakovinu kůže. Díky dlouhé historii používání se staly přijatelnými. Mimoto, bylinné léky poskytují racionální způsob léčby mnoha onemocnění, která jsou odolná nebo neléčitelná konvenčním způsobem. V letech 1995-2012 probíhalo několik výzkumných prací, při kterých bylo identifikováno 31 rostlin, které mají pozitivní účinky při léčbě různých kožních onemocnění (Tabassum & Hamdani 2014). Níže jsou vypsané ty nejzajímavější z nich.

Byla zkoumána například antifungální aktivita vodných extraktů cibule (*Allium cepa*) a česneku (*Allium sativum*). Studie *in vitro* ukázala, že účinky těchto dvou rostlin mohou být slibné při léčbě chorob způsobených patogenními mikroorganismy rodů *Candida*, *Malassezia* a dermatofyty (Tabassum & Hamdani 2014).

Také aloe vera, která je často užívána ve formě nápoje, vykazovala velmi dobré výsledky u kožních onemocnění. Je účinná i při léčbě vrásek, strií nebo pigmentací. Zdá se, že je schopna urychlovat hojení ran zlepšením krevního oběhu v daném místě a předchází odumírání buněk v okolí rány. Gel z aloe vera má vlastnosti, které jsou škodlivé pro určité typy bakterií a hub.

Měsíček lékařský (*Calendula officinalis*) je již dlouho používán v lidové léčbě a více než 35 vlastností je připisováno odvarům a tinkturám z jeho květů. Použití je vhodné na popáleniny (včetně spálení od slunce), modřiny nebo kožní a vnitřní zánětlivá onemocnění různého původu. Extrakty měsíčku lékařského urychlují hojení žilních vředů dolních končetin a zlepšují syntézu kolagenu v subepidermální pojivové tkáni (Tabassum & Hamdani 2014).

Echinacea (*Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*) může být aplikována ve formě tablet, šťávy či čaje pro léčbu různých kožních onemocnění, např. vředů, ran, popálenin a dalších (Tabassum & Hamdani 2014).

Rostlinné extrakty z pryšce (*Euphorbia walachii*, *Euphorbia hirta*, *Euphorbia tirucalli*) vykazovaly větší aktivitu proti grampozitivním bakteriím a plísním. Nejlepší antimikrobiální aktivita byla prokázána u *E. tirucalli*. Studie podpořila lidové použití *E. hirta* a *E. tirucalli* proti některým kožním onemocněním způsobeným oxidačním stresem nebo mikroorganismy (Tabassum & Hamdani 2014).

Šrucha zelná (*Portulaca oleraceae*) je bylina s přirozenými chladičnými vlastnostmi, které zklidňují pokožku, ulevují od kožních zánětů a vyrážek při popáleninách. Lokální aplikace vodného extraktu na pokožku má antibakteriální a protiplísňové účinky. Obklad z čerstvé byliny nebo extrahovaná šťáva se používají k léčbě popálenin, bolesti v uchu, zánětů, kožních vředů, svědivé kůže, ekzémů či abscesů (Tabassum & Hamdani 2014).

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*), známý také jako mateřídouška, může zmírnit příznaky celulitidy a infekcí kůže způsobených bakteriemi, které mohou vést k bolesti, citlivosti, otoku, horečce, zimnici a zarudnutí kůže. Může také nabídnout antifungální a antibakteriální účinky. Nicméně, University of Maryland Medical Center varuje, že u tymiánu nebyl prokázán specifický přínos proti celulitidě, navíc tato rostlina může zvýšit riziko krvácení (Tabassum & Hamdani 2014).

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) je další léčivou rostlinou, která se dá zevně použít k léčbě kožních problémů. Zejména třezalkový olej lze využít při popáleninách, zánětlivých onemocněních kůže a dalších kožních poraněních (Martin & Martinová 2014).

3.3 Využití konopí a chmelu jako ATB agens

3.3.1 Konopí seté

Konopí seté (*Cannabis sativa*) (viz Obrázek 8) je jednoletá dvoudomá kvetoucí semenná bylina řadící se do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*), jejíž původ sahá do střední severovýchodní Asie. Vzhled této rostliny je ovlivněn podmínkami prostředí. Charakterizuje ji dlouhý štíhlý stonek, jehož kořenový systém zasahuje do hloubky až 40 cm. Složení listů se během dozrávání mění, u plně vzrostlých rostlin je obvyklých 9 až 11 listů (Tandon & Mathur 2017).



Obrázek 8 *Cannabis sativa*

Zdroj: <http://www.pharmapoint.cz/herbar/konopi-neni-jen-droga/>

3.3.1.1 Biologicky aktivní látky konopí

Do roku 2014 bylo v konopí identifikováno 545 různých látek. Více než 150 z nich tvoří hlavní biologicky aktivní sekundární metabolity – kanabinoidy, asi 140 terpenoidy a zbytek doplňují aminokyseliny, proteiny, flavonoidy, alkoholy, mastné kyseliny, cukry, hydrogenuhličitan, aldehydy, ketony, glykosidy, pigmenty a další (Giese et al. 2015). Koncentrace aktivních látek závisí na mnoha faktorech, jako jsou odrůda, stáří rostliny, typ rostlinného pletiva, podmínky růstu, doba sklizně a stejně tak i podmínky skladování (Ali et al. 2012).

Kanabinoidy jsou v rostlině konopí produkovány systémem žláz v podobě tekuté olejovité pryskyřice, někdy též nazývané jako živice. Podle chemické struktury je můžeme zařadit do deseti základních typů, a to: kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), delta-9-tetrahydrokanabinol (delta-9-THC), kanabinol (CBN), delta-8-tetrahydrokanabinol (delta-8-THC), kanabicyclol (CBL), kanabielsoin (CBE), kanabinodiol (CBND) a kanabitriol (CBTL). Existují však i smíšené formy. Ke každému typu lze přiřadit několik kanabinoidů, které jsou odlišné např. délkou postranního řetězce. V jedné konopné rostlině lze obvykle nalézt pouze tři až čtyři kanabinoidy ve významném množství (např. CBC kolem 20 %, CBD až 95 % z celkového množství kanabinoidů), ostatní jsou obsaženy pouze ve stopovém množství, nebo se v rostlině nevyskytují vůbec (Appendino et al. 2008).

Konopí seté obsahuje esenciální olej (silici), který je svým složením příbuzný silici chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*). Jeho složení již bylo předmětem mnoha výzkumů, kdy bylo zjištěno, že vykazuje bakteriostatické účinky. Hlavními sloučeninami konopné silice jsou α -pinen, myrcen, trans- β -ocimen, α -terpinolen, trans-caryophyllen a α -humulen, jejichž množství závisí na kultivaru, což také ovlivňuje antimikrobiální aktivitu (Novak et al. 2001). Také terpeny jsou nezbytnou součástí konopné rostliny vytvářející charakteristickou vůni a podílejí se i na chuti a barvě. Jedná se o silně aromatické těkavé nenasycené uhlovodíky, které jsou součástí silic. V rostlinách vznikají pro ochranu před plísněmi, bakteriemi a hmyzem. Pokud jsou terpeny denaturovány oxidací, vznikají terpenoidy, které oproti terpenům mají navíc funkční skupinu (alkoholovou, karboxylovou, aldehydickou či ketonickou). U některých terpenů byly též prokázány léčivé účinky. Nejčastěji se vyskytujícími terpeny v konopných rostlinách jsou pinen, myrcen, limonen, humulen, linalool, karyofylen a terpinolen (Ibrahim et al. 2019).

Ali et al. (2012) uvádí, že kanabidiol byl shledán jako složka konopného oleje účinná proti gram-pozitivním bakteriím a kvasinkám. Dále také uvádí, že chemotypy *C. sativa* vypěstované v severních zeměpisných šířkách mají vyšší poměr kanabidiolu k tetrahydrokanabinolu, což má za následek silnější antimikrobiální aktivitu. Olej z konopných semen je vhodný pro léčbu mnoha kožních onemocnění, jeho použitím se kůže zesiluje a lépe pak odolává bakteriálním, plísnovým i virovým infekcím. Prášek z listů konopí setého se aplikuje při obvazování ran a vředů. Zevní aplikace se uplatňuje pro zmírnění bolesti při svědivých kožních onemocněních. Kanabinoidy, flavonoidy a terpeny působí ve vzájemné synergii (Tabassum & Hamdani 2014).

3.3.2 Chmel otáčivý

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*) (viz Obrázek 9) je dvoudomá vytrvalá liánovitá rostlina řadící se stejně jako konopí seté do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Pravotočivá lodyha bývá 6-9 metrů vysoká a má bohatý kořenový systém, kdy hlavní křulové kořeny sahají do hloubky dvou až šesti metrů. Z lodyhy v oblasti kolének vyrůstají třílaločné až pětialočné řapíkaté listy (Zanoli & Zavatti 2008).



Obrázek 9 *Humulus lupulus*

Zdroj: <https://laidbackgardener.blog/tag/humulus-lupulus-aureus/>

3.3.2.1 Biologicky aktivní látky chmelu

V chmelových šištících (samičí oplodí) byly identifikovány hlavní chemické sloučeniny zahrnující terpeny, hořké kyseliny a chalkony. Chmel je též bohatý na flavonolové glykosidy (flavonoly), jako např. kempferol, kvercetin, kvercitrin a rutin, a na katechiny katechingalát a epikatechingalát. V esenciálním chmelovém oleji byly rozpoznány stovky terpenoidů, primárně seskviterpeny β -karyofylen, farnesen a humulen, a monoterpen myrcen. Hořké kyseliny (deriváty floroglucinolu), obvykle dělené na alfa a beta kyseliny, jsou v chmelu přítomné jako komplexní směs v různém složení a koncentraci. Alfa kyseliny jsou rozhodujícími sloučeninami v pivovarnickém průmyslu dodávající pivu typickou hořkou chuť, přispívající ke stabilitě pивní pěny a stejně tak vyvíjející antibakteriální aktivitu. Při vysokém pH a vysoké teplotě alfa kyseliny izomerují na odpovídající iso-alfa-kyseliny, které jsou rozpustnější a hořčejší. Kromě esenciálního oleje a hořkých kyselin bylo v chmelových šištících identifikováno také několik prenylflavonoidů. Nejdůležitějším z nich je chalkon xantohumul (XH), který může být přeměněn v důsledku tepelného zpracování a zvýšení hodnoty pH

na prenylflavanon isoxantohumul (IX). I další chalkony vyskytující se v 10-100krát nižší koncentraci než XH isomerují na odpovídající flavanony. Sloučenina známá jako desmetylxantohumul (DMX) je považována za předchůdce většiny flavonoidů přítomných v chmelu. Během vývoje od květenství po zralé šišťice dochází k postupnému zvyšování hladin alfa a beta hořkých kyselin, DMX a XH. Rychlost akumulace závisí na odrůdě chmelu a klimatických podmínkách (Zanoli & Zavatti 2008).

U chmelu otáčivého byly prokázány antibakteriální i antifungální účinky. Největší účinnost byla pozorována u gram-pozitivních bakterií, zejména pak u rodů *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* a *Streptomyces* (Martin & Martinová 2014). Antibakteriální aktivita je připisována zejména humulonu a lupulonu – hořčinám obsaženým v šišticích. Hořké kyseliny naopak vykazují antifungální aktivitu vůči kvasince *Candida albicans* a rodům *Trichophyton*, *Fusarium* a *Mucor*. Vybrané humulony o minimální inhibiční koncentraci (MIC) 100 µg/ml byly aktivnější než lupulony s MIC vyšší než 200 µg/ml vůči rodům *Trichophyton* a *Mucor* (MIC 3,13 µg/ml), ale méně účinné proti rodu *Staphylococcus* (MIC 6,25 µg/ml). Také prenylchalkony byly studovány z hlediska antifungální aktivity, kdy neúčinnějšími činidly byly stanoveny 6-prenylnaringenin (6-PN) a XH vůči rodu *Trichophyton* (MIC = 3,13 µg/ml) a bakterii *Staphylococcus aureus* (MIC = 6,25 µg/ml), které však byly prakticky neaktivní vůči jiným lidským patogenním houbám (např. *C. albicans* nebo rod *Fusarium*). Esenciální oleje získané hydrodestilací a chloroformové extrakty různých odrůd chmelu vykazují antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním bakteriím (např. *S. aureus*), ale nemají žádný vliv na gram-negativní bakterie (např. *E. coli*) a kvasinku *C. albicans*. Xantohumul, jako složka chmelu s antiinfekčními vlastnostmi, je popisován jako antiinfekční agens účinné proti gram-pozitivním bakteriím (*S. aureus*, *Str. mutans*), virům (cytomegalovirus, herpes simplex virus typ 1 a 2, HIV 1), houbám (*Trichophyton* spp.) a maláriálním prvokům (*Plasmodium falciparum*) (Zanoli & Zavatti 2008).

4 Materiál a metody

Pomocí modifikované mikrodiluční metody byla v rámci experimentu testována antimikrobiální a antifungální aktivita tří extraktů konopí a čtyř extraktů chmelu proti vybraným mikroorganismům způsobujícím onemocnění kůže.

4.1 Rostlinný materiál

Konopí bylo vypěstováno na katedře rostlinné výroby Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze v roce 2017. Chmelové extrakty, použité k testování antimikrobiální a antifungální aktivity, byly získány z odrůdy Žatecký poloraný červeňák. Konopné extrakty byly získány z medicínální odrůdy Meclov, charakteristické vysokým obsahem THC.

4.2 Příprava extraktů

Před samotnou extrakcí byl rostlinný materiál homogenizován pomocí elektrického mlýnku (A11 basic, IKA, SRN). Pro náš experiment bylo z plodenství chmele a ze samičího květenství konopí připraveno celkem sedm extraktů, a to ve 3 různých rozpouštědlech.

4.2.1 Ethanolové, vodné a dimethyletherové extrakty

Homogenizovaný chmel a konopí byly smíchány s 80% ethanolem v poměru 1:10, s destilovanou vodou v poměru 1:15 a byly třepány na třepáče (Heidolph, SRN) po dobu 24 hodin. Ethanolové extrakty byly následně odpařeny pomocí rotační vakuové odparky (typ: Hei-VAP Advantage, Heidolph, SRN) (viz Obrázek 10), teplota vodní lázně byla 40 °C. Vodné extrakty byly následně lyofilizovány. Vodný extrakt chmelu byl připraven ve dvojím provedení – filtrovaný a nefiltrovaný.



Obrázek 10 Odpařování extraktu na vakuové rotační odparce

Zdroj: vlastní

Nehomogenizovaný chmel o navážce 32,3 g a konopí o navážce 47 g byly převedeny do extraktoru (Essential Oils Extractor – E.O.E.) (viz Obrázek 11) (Dexso Professional, Dexso, CH) a pomocí dimethyletheru (DME) ve formě hnacího plynu ve spreji (viz Obrázek 12) extrahovány na teflonovou podložku (viz Obrázek 13 a 14). Pro každý extrakt byly použity dva kusy DME spreje (1 l).



Obrázek 11 Extraktor oleje

Zdroj: vlastní



Obrázek 14 Dimethylether ve spreji

Zdroj: vlastní



Obrázek 13 Zleva chmelový a konopný DME extrakt

Zdroj: vlastní



Obrázek 12 Detail chmelového (vlevo) a konopného DME extraktu

Zdroj: vlastní

Převedením extraktů do dimethylsulfoxidu (DMSO) (Penta, CZ) byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 51,2 mg/ml, které byly skladovány v mrazáku při -20 °C k dalšímu použití. Rozpuštění extraktů probíhalo pomocí ultrazvukové lázně (Bandelin, CZ).

4.3 Testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální a antifungální účinky extraktů byly sledovány u tří typů plísní, jedné kvasinky a devíti bakterií způsobující kožní onemocnění. Testování všech extraktů proběhlo ve třech nezávislých opakováních.

4.3.1 Testované mikroorganismy

Antifungální účinek extraktů byl sledován celkem proti třem kmenům dermatofytních plísní, a to *Trichophyton interdigitale* CCM 8377, *Microsporum canis* CCM 8353 a *Epidermophyton floccosum* CCM 8339. Kmeny byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů (CCM).

Antimikrobiální účinek extraktů byl sledován proti kvasince *Candida albicans* CCM 90028, sedmi kmenům bakterií rodu *Staphylococcus aureus*: SA 3953, SA 4300, SA 33592, SA 29213, MRSA 2 (methicilin-rezistentní *S. aureus*), TRSA 2 (tetracyklin-rezistentní *S. aureus*), EMRSA 15 (epidemický, methicilin-rezistentní *S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* 27853 a *Streptococcus pyogenes* 4425.

Testované kmeny SA, EMRSA a PA byly zakoupeny od firmy Oxoid (Basingstoke, UK), kmen SP a dermatofytní plísně byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů (CCM), klinické izoláty TRSA a MRSA byly získány z nemocnice Motol (Praha, CZ).

4.3.2 Příprava kultivačních médií a agarů

Pro testování nárůstu bakterií byl použit kultivační bujón Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid, CZ). MHB bujón byl připraven rozmícháním v destilované vodě dle návodu uvedeném na obalu a následně sterilizován v autoklávu.

Pro testování nárůstu kvasinky a plísní bylo použito tekuté médium RPMI. Médium bylo připraveno smícháním RPMI-1640 média (Sigma-Aldrich, CZ) a MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina) (VWR, CZ) v destilované vodě dle návodu a následně bylo upraveno pH roztoku pomocí 1M NaOH na hodnotu 7. Hotové médium bylo sterilizováno pomocí membránové filtrace (0,2 µm).

Pro kultivaci plísni byly použity dva různé agary, Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid, CZ). Agary byly připraveny smícháním s destilovanou vodou dle návodu na obalu, sterilizovány v autoklávu a rozlity do Petriho misek.

4.4 Testování antimikrobiální a antifungální aktivity mikrodiluční metodou

Testování bylo prováděno ve sterilním prostředí, které zajistil laminární kabinet (typ: Biostar, Telstar, E). Sterilní byly též všechny použité nástroje a média.

4.4.1 Příprava inokula

Bakteriální inokulum o koncentraci 0,5 McFarlanda bylo připraveno pomocí densitometru (typ: DEN-1B, Biosan, LV) naředěním den staré bakteriální suspenze kultivované při 37 °C do MHB bujónu. Hotová inokula byla použita pro kultivaci v mikrotitračních destičkách. Inokulum kvasinky bylo připraveno stejným způsobem, avšak do RPMI média.

Fungální inokulum je poněkud problematické vzhledem k různé velikosti hyf. Reálná koncentrace KTJ (kolonie tvořících jednotek) dermatofytů byla zjišťována výsevem na agarové plotny pomocí Spiral Plateru (easySpiral Pro, Interscience, F). Inokula všech dermatofytů byla získána seškrábáním mycelia z týden starých kultur a jeho rozpuštěním ve známém množství fyziologického roztoku (složení na 1 l: destilovaná voda, 8,5 g NaCl (Dorapis, CZ), Tween 1 g (Carl Roth, SRN)). Získaná suspenze byla naředěna ve fyziologickém roztoku pomocí densitometru na hodnotu 0,5 McFarlanda, což pro *Trichophyton interdigitale* představuje 4-6 log KTJ/ml, pro *Epidermophyton floccosum* 5-6 log KTJ/ml a pro *Microsporium canis* 1-3 log KTJ/ml.

4.4.2 Mikrodiluční metoda

Jedná se o standardní kvantitativní metodu, jejímž cílem bylo stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých extraktů dle CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (CLSI 2009).

Při testování dermatofytních plísní byly extrakty konopí a chmelu rozředěny ze zásobní koncentrace 51,2 mg/ml na počáteční koncentraci 1024 µg/ml, která byla pomocí multikanálové pipety dvojkově rozředěna až do koncentrace 2 µg/ml. Růstovým médiem bylo RPMI médium. Do každé jamky bylo pomocí multikanálové pipety aplikováno 50 µl připraveného inokula dermatofytů.

Při testování kvasinky byla počáteční koncentrace extraktů 1024 µg/ml dvojkově rozředěna až po koncentraci 8 µg/ml. Růstovým médiem bylo RPMI médium. U bakteriálních kmenů byla výchozí koncentrace extraktů 512 µg/ml (kromě SA 29213, u které byla počáteční koncentrace

1024 µg/ml) dvojkově rozředěna až po koncentraci 4 µg/ml (i u SA 29213). Růstovým médiem byl MHB bujón. Inokulum kvasinky i bakteriální inokula byly přelity do Petriho misek a pomocí inokulačního ježka aplikovány do mikrotitračních destiček.

Jako pozitivní kontrola bylo u bakterií použito antibiotikum tetracyklin (Sigma-Aldrich, CZ) a u kvasinky antimykotikum tiokonazol (Sigma-Aldrich, CZ). Zásobní roztoky o koncentraci 32 µg/ml byly připraveny pomocí 70% ethanolu. Koncentrace pro testování kvasinky a SA 29213 začínala na 512 µg/ml a byla dvojkově rozředěna až na koncentraci 2 µg/ml. U ostatních kmenů bakterií byla počáteční koncentrace 32 µg/ml dvojkově rozředěna po koncentraci 0,125 µg/ml.

V mikrotitračních destičkách byla zahrnuta také kontrola čistoty (pouze čisté růstové médium) a kontrola nárůstu (inokulované růstové médium bez extraktů).

Destičky naočkované bakteriemi a kvasinkou byly dány do termostatu, kde se inkubovaly po dobu cca 24 hodin při teplotě 37 °C. Destičky s inokuly dermatofytů se inkubovaly po dobu 5-6 dnů. Při nejasném nárůstu byly konkrétní koncentrace jednotlivých extraktů vysety na Petriho misky s PDA či SDA agarem a po několika dnech byly sledovány výsledky nárůstu.

5 Výsledky

Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny ze tří nezávislých opakování, které byly provedeny mikrodiluční metodou.

Tabulka 1 Antibakteriální aktivita extraktů proti vybraným bakteriím

Bakterie	DECH	EECH	VECHN	VECHF	DEK	EEK	VEK	Tetracyklin (ATB)
SA 33592	64	128	>512	>512	8	64	>512	>32
SA 3953	16	64	256	128	8	64	>512	0,25
SA 43300	128	128	>512	>512	8	128	>512	>32
SA 29213	32	512	>1024	>1024	4	128	>1024	4
TRSA 2	32	128	>512	>512	8	64	>512	0,5
MRSA 2	64	256	>512	>512	8	128	>512	0,25
EMRSA 15	64	128	>512	>512	8	64	>512	0,5
SP 4425	4	32	128	>512	2	16	>512	0,25
PA 27853	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	32

Pozn.: Uvedené hodnoty (minimální inhibiční koncentrace – MIC) jsou v jednotkách [$\mu\text{g/ml}$].

SA – *Staphylococcus aureus*, TRSA – tetracyklin-rezistentní *S. aureus*, MRSA – methicilin-rezistentní *S. aureus*, EMRSA – epidemický, methicilin-rezistentní *S. aureus*, SP – *Streptococcus pyogenes*, PA – *Pseudomonas aeruginosa*

DECH – dimethyletherový (DME) extrakt chmelu, EECH – ethanolový extrakt chmelu, VECHN – vodný extrakt chmelu nefiltrovaný, VECHF – vodný extrakt chmelu filtrovaný, DEK – DME extrakt konopí, EEK – ethanolový extrakt konopí, VEK – vodný extrakt konopí

Z výsledků v Tabulce 1 vyplývá, že nejvíce rezistentní bakterií vůči všem testovaným extraktům byla PA 27853. Proti této bakterii bylo účinné pouze antibiotikum tetracyklin (dále jen ATC) v koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$. Naopak největší antimikrobiální účinnost extraktů byla zaznamenána u bakterií SA 3953 a SP 4425, na které pozitivně působily všechny extrakty i antibiotika s výjimkou VEK a u SP 4425 také VECHF.

Je patrné, že nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazoval DEK. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) tohoto extraktu se pohybovala nejčastěji na hodnotě 8 $\mu\text{g/ml}$, nejnižší MIC, a to 2 $\mu\text{g/ml}$, byla zaznamenána u bakterie SP 4425, naopak v námi testovaných koncentracích

nebyl tento extrakt vůbec účinný pro PA 27853 a u VEK nebyla zpozorována žádná antimikrobiální aktivita.

ATC bylo účinné proti všem bakteriím vyjma SA 33592 a SA 43300. Nejnižší MIC 0,25 µg/ml vyšla hned u tří bakterií, a to SA 3953, MRSA 2 a SP 4425.

Zajímavé je také srovnání stejných rozpouštědel u obou zkoumaných rostlin. Z výsledků vyplývá, že jednotlivá rozpouštědla uvolňují z konopí i chmelu poměrově stejné množství účinných látek, např. ethanolové extrakty obou rostlin vykazovaly podobné nebo dokonce stejné antimikrobiální účinky u jednotlivých patogenů. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zjištěna u DME extraktů, oproti tomu vodné extrakty, ať už filtrované či nefiltrované, vykazovaly nejnižší antimikrobiální aktivitu. Významnější účinky vodných extraktů byly pozorovány pouze u SA 3953, kdy byly MIC VECHN 256 µg/ml a VECHF 128 µg/ml, a dále také u a SP 4425, kdy MIC VECHN byla 128 µg/ml.

Jak můžeme v Tabulce 1 vidět u VECH, zřejmě i samotná filtrace může snížit obsah účinných látek v extraktu. VECHN vykazoval antimikrobiální aktivitu jen u dvou bakterií, nicméně tentýž extrakt po filtraci (VECHF) působil antimikrobiálním účinkem pouze na jedinou bakterii z našeho výběru.

Tabulka 2 Antifungální aktivita extraktů proti vybraným dermatofytům

Dermatofyty	DECH	EECH	VECHN	VECHF	DEK	EEK	VEK	Tiokonazol (antimykotikum)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	512	>1024	>1024	>1024	64	1024	>1024	–
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1024	>1024	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	–
<i>Microsporum canis</i>	512	>1024	>1024	>1024	512	1024	>1024	–
<i>Candida albicans</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>512

Pozn.: Uvedené hodnoty (minimální inhibiční koncentrace – MIC) jsou v jednotkách [µg/ml].

DECH – dimethyletherový (DME) extrakt chmelu, EECH – ethanolový extrakt chmelu, VECHN – vodný extrakt chmelu nefiltrovaný, VECHF – vodný extrakt chmelu filtrovaný, DEK – DME extrakt konopí, EEK – ethanolový extrakt konopí, VEK – vodný extrakt konopí

Z výsledků v Tabulce 2 je patrné, že nejrezistentějším mikroorganismem je kvasinka *C. albicans*, která nereagovala na žádný z testovaných extraktů, ani na antimykotikum tiokonazol. Výsledky u plísní jsou vcelku srovnatelné, dermatofyty měly pozitivní odezvu na DECH i DEK a také u dvou ze tří případů na EEK. Nejvyšší antifungální aktivita byla prokazatelně u DEK u plísně *T. interdigitale*, kde se MIC dostala na nejnižší hodnotu 64 µg/ml. U ostatních výsledků se hodnoty koncentrací nedostaly pod hranici 512 µg/ml.

Z výsledků můžeme konstatovat, že extrakty z konopí a chmelu působily spíše antibakteriálně než antifungálně. Nejúčinněji působily DME extrakty, naopak nejnižší antimikrobiální aktivitu vykazovaly vodné extrakty obou rostlin.

6 Diskuze

Léčba kožních onemocnění způsobených bakteriemi a dermatofyty je v současné době stále obtížnější. To je zapříčiněno neustále se zvyšující rezistencí patogenů na běžně používaná léčiva, zejména antibiotika. Jak uvádí Sköld (2011), na rezistenci má do jisté míry vliv předepisování nevhodných typů antibiotik, nevhodná aplikační forma a také jejich aplikace v nadměrné nebo naopak nedostatečné míře na základě zažitých dávkovacích schémat, která nereflektují např. pacientovu tělesnou hmotnost ani minimální inhibiční koncentrace patogenů. Podle Lovečkové (2012) se nejčastěji chybí podáním antibiotika v případech neinfekčních či virových onemocnění, čímž se léčba stává neúčinnou. I z důvodu možného negativního dopadu antibiotik na lidský organismus je tendence tyto nahrazovat jinými druhy léčiv a léčebných preparátů, například využití potenciálu účinných látek z rostlin. Například esenciální oleje jsou nejoblíbenější volbou pro léčbu plísňových kožních infekcí.

Cílem této práce bylo zjistit, zda konopné a chmelové extrakty získané různými metodami vykazují antimikrobiální aktivitu vůči vybraným mikroorganismům způsobujícím onemocnění kůže. Existuje celá řada studií zkoumajících široké spektrum účinků konopí (*Cannabis sativa*), chmelu (*Humulus lupulus*) však z hlediska antimikrobiální aktivity zatím nebyla věnována větší pozornost (vyjma pivovarnického průmyslu).

Námi uskutečněný experiment provedený pomocí mikrodiluční metody poukázal na to, že jednotlivá rozpouštědla uvolňují z konopí i chmelu poměrově stejné množství účinných látek, např. ethanolové extrakty obou rostlin vykazovaly podobné nebo dokonce stejné antimikrobiální účinky u jednotlivých patogenů. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zjištěna u dimethyletherových (DME) extraktů, oproti tomu vodné extrakty, ať už filtrované či nefiltrované, vykazovaly nejnižší antimikrobiální aktivitu. Jak uvádí výrobce DME aerosolu Dexso (2014), použitím tohoto produktu lze získat čistší extrakty než extrakcí v ethanolu, při jedné extrakci lze bezpečnějším způsobem dosáhnout vyššího výtěžku než při použití butanu a extrakce je rychlejší a levnější než při použití CO₂. Další výhodou je možnost provádění extrakce při nízkém tlaku a nízkých teplotách, důsledkem čehož jsou extrakty více kvalitní. Extrakční kapacita je díky bipolaritě DME silnější než u jiných rozpouštědel, což umožňuje širokospektrální extrakci v jednom kroku (Dexso 2014). V našem experimentu tedy mohlo být pomocí DME extrahováno např. širší spektrum lipofilních sloučenin, které jsou obsaženy v obou zkoumaných rostlinách (např. kanabinoidy v konopí) a vykazují antimikrobiální aktivitu, než pomocí vody či ethanolu. Proto byly DME extrakty neúčinnější. U vodných

extraktů mohla být příčinou nízké antimikrobiální účinnosti úplná nerozpustnost či velmi nízká rozpustnost složek esenciálních olejů testovaných rostlin ve vodě.

Staphylococcus aureus, jako patogen s největším počtem poddruhů v námi testovaném výběru, byl nejvíce citlivý na DME konopný extrakt, kdy MIC u všech zástupců nepřesáhla 8 µg/ml, u SA 29213 dokonce 4 µg/ml. Taktéž DME chmelový extrakt vykazoval vyšší antimikrobiální účinnost než ethanolové a vodné extrakty obou rostlin. MIC v tomto případě byla 16 µg/ml u SA 3953, 32 µg/ml u SA 29213 a TRSA 2, 64 µg/ml u SA 33592, MRSA 2 a EMRSA 15. Nejhorší reaktivita byla zaznamenána u SA 43300 s MIC 128 µg/ml. Konopné ethanolové extrakty dosáhly u těchto bakterií MIC v rozmezí 64-128 µg/ml, širší rozsah MIC byl sledován u ethanolového extraktu chmelu (64-512 µg/ml). Vodné extrakty byly o poznání méně účinné nebo nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu v námi testovaných koncentracích. Jako jediný zástupce *S. aureus* na ně reagoval SA 3953 ve filtrované i nefiltrované úpravě s tím, že senzitivnější byl na filtrovaný extrakt (MIC 128 µg/ml oproti 256 µg/ml).

Streptococcus pyogenes projevil nejvyšší citlivost ze všech sledovaných patogenů. Opět jsme sledovali nejvyšší aktivitu vůči DME extraktům jak u konopí, tak u chmelu (MIC 2 µg/ml a 4 µg/ml). Ethanolové extrakty obou rostlin vykazaly nižší účinnost oproti DME extraktům s tím, že reakce byla opět silnější u konopí než u chmelu (MIC 16 vs. 32 µg/ml). Jako jeden ze dvou testovaných bakterií (společně s SA 3953) interagoval s vodným chmelovým extraktem, ale narozdíl od SA 3953 pouze s nefiltrovaným (MIC 128 µg/ml).

Pseudomonas aeruginosa byla rezistentní ke všem rostlinným extraktům ve zkoumaných koncentracích.

Téměř u všech testovaných bakterií bylo účinné antibiotikum tetracyklin, a to v poměrně nízkých koncentracích (nejčastěji 0,25 až 0,5 µg/ml), u SA 29213 bychom se těmito hodnotám pravděpodobně také mohli přiblížit, ale jelikož výchozí koncentrace byla vyšší než u ostatních bakterií z důvodu pozdějšího testování, v mikrotitrační destičce nebyl dostatek místa na další ředění. MIC 4 µg/ml byla nejnižší hodnotou, kterou jsme testovali. Nejvyšší MIC 32 µg/ml jsme zaznamenali u PA 27853, v tomto případě však bylo antibiotikum to jediné, co na tuto bakterii účinkovalo. U SA 33592 a SA 43300 nebyla reakce na antibiotikum v testovaných koncentracích pozorována.

Trichophyton interdigitale reagoval ze všech dermatofytů nejlépe. Nejvyšší aktivitu jsme opět pozorovali u DME extraktů (MIC konopí 64 µg/ml, chmel 512 µg/ml). Ze zbylých extraktů byl účinný už pouze ethanolový konopný extrakt (MIC 1024 µg/ml), ostatní ve sledovaných koncentracích nereagovaly.

Epidermophyton floccosum byl citlivý pouze k DME extraktům obou rostlin, a to v MIC 1024 µg/ml.

Microsporum canis stejně jako *E. floccosum* reagoval pouze na DME extrakty, a to v MIC 512 µg/ml u konopí i chmelu.

U dermatofytů byla nejrezistentnějším patogenem kvasinka *Candida albicans*, která neinteragovala s žádným z testovaných extraktů, stejně jako s antimykotikem tiokonazol. Podle Orchard & van Vuuren (2017) je *C. albicans* vysoce rezistentním patogenem, avšak některé esenciální oleje proti ní vykazovaly pozoruhodnou účinnost (ta je v článku definována hodnotou 2,00 mg/ml a méně), např. z pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis*), který byl extrahován v 0,1% ethanolu a vykázal hodnotu 3,75 µg/ml.

Konopí má všeobecně vyšší antimikrobiální účinnost, než chmel, avšak oproti chmelu je konopí mnohem hůře dostupné. Kvůli zákonu o omamných a psychotropních látkách č. 167/1998 Sb. je práce s extraktem z konopí bez odpovídajících povolení značně omezena. Složky vykazující antimikrobiální aktivitu stejně tak mohou spadat do kategorie zakázaných látek a je proto velmi složité s nimi nakládat v našich podmínkách. Spousta studií kvůli limitovanému obsahu THC (0,3 %) pracuje pouze s odrůdami technického konopí, proto jejich výsledky mnohdy nemohou být plošně aplikovatelné. Jediným dostupným kultivarem s vysokým obsahem THC byl pro naši studii Meclov, který vznikl ve spolupráci Meclovské zemědělské a.s. a Fakulty agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů ČZU. Námi získané hodnoty MIC potvrdily velký potenciál této odrůdy pro využití jako ATB agens.

Flavonoidy obsažené v chmelu prokázaly vysokou antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů (např. *S. aureus*, *Str. mutans*, několik zástupců *Trichophyton* spp.). Tyto vlastnosti jsou připisovány hlavně xantohumolu, který se vyskytuje téměř výhradně v lupulinových žlázách chmelových šištic (Gerhäuser 2005). Přesto však námi testovaná odrůda Žatecký poloraný červeňák neprojevila výraznější účinky než konopí.

Účinky rostlinných silic mohou být ovlivněny mimo jiné materiálem použitého laboratorního nádobí. Hammer et al. (2013) prokázal, že hodnoty MIC mohou být ovlivněny interakcí určitých látek s některými druhy plastů. Například u čajovníkových silic pozoroval výrazně vyšší MIC při použití plastových kultivačních misek než při použití skleněných. V našem experimentu bylo použito plastové laboratorní nádobí, a tak je možné, že při opakování výzkumu s použitím laboratorního skla by mohlo být dosaženo ještě lepších výsledků.

Jak zmínili Orchard & van Vuuren (2017), antimikrobiální aktivita může být ovlivněna i velikostí inokula. V mnoha různých srovnávaných člancích se velikost bakteriálního inokula

pohybovala v rozmezí 5×10^2 až 5×10^8 KTJ/ml. Pokud je koncentrace příliš nízká, účinek silic se zesiluje, to však nereflektuje jejich skutečný účinek. Pokud je inokulum příliš husté, účinky silic jsou slabší a inokulum se stává náchylnějším ke křížové kontaminaci. Cílem budoucích studií by mělo být udržení velikosti inokula na doporučených 5×10^6 KTJ/ml. Naše bakteriální inokula měla před aplikací inokulačním ježkem do mikrotitračních destiček velikost $1,5 \times 10^8$ KTJ/ml, po zaočkování byla výsledná velikost $1,5 \times 10^5$ KTJ/ml, což jsou standardní koncentrace, které jsou běžně testovány. Získané hodnoty MIC extraktů vůči testovaným bakteriím jsou tedy směrodatné.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vyhodnotit antimikrobiální aktivitu konopných a chmelových extraktů připravených různými metodami proti vybraným plísním a bakteriím způsobujícím onemocnění kůže.

Na základě výzkumu bylo prokázáno, že extrakty konopí a chmelu skutečně vykazují antimikrobiální aktivitu vůči patogenům způsobujícím onemocnění kůže. Byly pozorovány významné rozdíly v účinnosti mezi konopnými a chmelovými extrakty, kdy konopné extrakty (vyjma vodného) dosahovaly nižších hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC) u sledovaných mikroorganismů. Na základě těchto skutečností byly přijaty vědecké hypotézy.

Můžeme konstatovat, že extrakty působily spíše antibakteriálně než antifungálně. Také použitá rozpouštědla výrazně ovlivnila antimikrobiální aktivitu jednotlivých extraktů. Je patrné, že jednotlivá rozpouštědla uvolňují z konopí i chmelu poměrově stejné množství účinných látek, např. ethanolové extrakty obou rostlin vykazovaly podobné nebo dokonce stejné antimikrobiální účinky u jednotlivých patogenů. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zjištěna u dimethyletherových (DME) extraktů, oproti tomu vodné extrakty, ať už filtrované či nefiltrované, vykazovaly nejnižší antimikrobiální aktivitu. Nejvyšší antibakteriální aktivitu vykazoval DME konopný extrakt. MIC tohoto extraktu se pohybovala nejčastěji na hodnotě 8 $\mu\text{g/ml}$, nejnižší MIC, a to 2 $\mu\text{g/ml}$, byla zaznamenána u bakterie SP 4425, naopak v námi testovaných koncentracích nebyl tento extrakt vůbec účinný pro PA 27853. Nejvyšší antifungální aktivita byla prokazatelně u DME konopného extraktu u plísně *T. interdigitale*, kde se MIC dostala na nejnižší hodnotu 64 $\mu\text{g/ml}$. U ostatních výsledků dermatofytů se hodnoty koncentrací nedostaly pod hranici 512 $\mu\text{g/ml}$.

Z výsledků vyplývá, že konopí i chmel mají velký potenciál stát se novodobými antibiotiky pro léčbu kožních onemocnění.

8 Seznam literatury

- Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA. 2012. Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L.. *Chinese Medicine* **3**:61-64.
- Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. 2008. Antibacterial Cannabinoids from Cannabis sativa: A Structure–Activity Study. *Journal of Natural Products* **8**:1427-1430.
- Baddour MM. 2010. MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) Infections and Treatment. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Triton, Praha.
- Calderone RA, Clancy CJ. 2012. *Candida and Candidiasis*, 2nd edition. ASM Press, Washington, DC.
- Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. 2013. *Identification of Pathogenic Fungi*, 2nd edition. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, 3rd edn*. CLSI document M07-A8.
- Cornbleet T. 2016. Common Skin Diseases. *Postgraduate Medicine* 47 DOI: 10.1080/00325481.1970.11697519.
- Cornelis P. 2008. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Dallos T, Jankó V, Mozolová D, Jakubíková J, Kovács L. 2011. Sérologická diagnostika postreptokokových následkov v pediatrickej praxi. *Pediatrica pre prax* **3**:94-98.
- de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch Ch, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. 2016. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia* **182**:5-31.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. 2001. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edition. Universitat Rovira, Reus.
- Dexso. 2014. Dimethyl Ether D.M.E. Near Zero Impurities. Dexso, Swiss. Available from <https://www.dexso.com/d-m-e> (accessed April 2019).

- Eldridge ML, Chambers CJ, Sharon VR, Thompson GR. 2014. Fungal Infections of the Skin and Nail: New Treatment Options. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **12**:1389-1405.
- Gerhäuser C. 2005. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**:827-831.
- Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. 2015. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *Journal of AOAC International* **6**:1503-1522.
- Guay DRP. 2003. Treatment of Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **4**:1259-1275.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* **4**:853-860.
- Heitman J, Filler SG, Edwards JE, Mitchel AP. 2006. *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. ASM Press, Washington.
- Honeyman AL, Friedman H, Bendinelli M. 2011. *Staphylococcus aureus Infection and Disease*. Springer, New York.
- Hubka V, Čmoková A, Škořepová M, Mallátová N, Dobiášová S, Lysková P, Mencl K, Janouškovcová H, Buchta V, Větrovský T, Kolařík M. 2014. Současný vývoj v taxonomii dermatofytů a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů. *Československá dermatologie* **89**:151-165.
- Ibrahim EA, Wang M, Radwan MM, Wanas AS, Majumdar CHG, Avula B, Wang Y-H, Khan IA, Chandra S, Lata H, Hadad GM, Abdel Salam RA, Ibrahim AK, Ahmed SA, ElSohly MA. 2019. Analysis of Terpenes in *Cannabis sativa* L. Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. *Planta Medica* **5**:431-438.
- Lovečková Y. 2012. Antibiotika v dermatologii z pohledu mikrobiologa. *Dermatologie pro praxi* **2**:73-75.
- Lovečková Y. 2013. Problematika MRSA v dermatologii z pohledu mikrobiologa. *Dermatologie pro praxi* **3**:132-133.

- Lowy FD. 2003. Antimicrobial Resistance: the Example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **9**:1265-1273.
- Mallátová N, Hamal P, Kocmanová I, Buchta V, Mencl K. 2011. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgraduální medicína* **5**:51-65.
- Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. 2015. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Martin J, Martinová D. 2014. Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem. *Praktické lékárenství* **6**:226-228.
- Melter O, Malmgren A. 2014. *Principles and Practicals in Medical Microbiology*. Karolinum, Praha.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2013. *Medical Microbiology*, 7th edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia.
- Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz CHM. 2001. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* **16**:259-262.
- Orchard A, van Vuuren S. 2017. Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* DOI: 10.1155/2017/4517971.
- Rehm BHA. 2008. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sciortino CV. 2017. *Atlas of Clinically Important Fungi*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ.
- Sköld O. 2011. *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Tabassum N, Hamdani M. 2014. Plants used to treat Skin Diseases. *Pharmacognosy Reviews* **15**:52-60.
- Tandon CH, Mathur P. 2017. Antimicrobial Efficacy of *Cannabis sativa* L. (Bhang): A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **1**:94-100.

Weller RB, Hunter HJA, Mann MW. 2015. *Clinical Dermatology*. Wiley Blackwell, Chichester.

Zanoli P, Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L.. *Journal of Ethnopharmacology* **3**:383-396.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Obrázek 2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	13
Obrázek 3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Obrázek 4 <i>Candida albicans</i>	15
Obrázek 5 <i>Trichophyton interdigitale</i>	16
Obrázek 6 <i>Epidermophyton floccosum</i>	17
Obrázek 7 <i>Microsporum canis</i>	17
Obrázek 8 <i>Cannabis sativa</i>	23
Obrázek 9 <i>Humulus lupulus</i>	25
Obrázek 10 Odpařování extraktu na vakuové rotační odparce.....	28
Obrázek 11 Extraktor oleje.....	28
Obrázek 12 Dimethylether ve spreji.....	29
Obrázek 13 Zleva chmelový a konopný DME extrakt	29
Obrázek 14 Detail chmelového (vlevo) a konopného DME extraktu	29