

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE,  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**

---

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK ROSTLIN XVIII.  
ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA NĚKTERÝCH SEKUNDÁRNÍCH  
METABOLITŮ 2.**

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT METABOLITES XVIII.  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME SECONDARY  
METABOLITES 2.**

**Hradec Králové, červen 2009**

**Mgr. Jana Váňová**

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Děkuji Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za cenné informace a odborné vedení, Pharm.Dr. Petru Jílkovi, CSc. za možnost provést experimenty v laboratoři katedry biologických a lékařských věd a paní Idě Dufkové za laskavost a přípravu laboratorních pomůcek a materiálu.

Tato práce vznikla v souvislosti s řešením grantu NAZV č. QH71284/2007 (Stanovení biologických a manažerských parametrů pro vysokou úroveň užitkovosti prasat), z jehož prostředků byla finančně podpořena.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně, pouze s použitím literatury a zdrojů uvedených v části Literatura a dosažené výsledky jsou původní.

Hradec Králové 18. května 2009

Mgr. Jana Váňová

## OBSAH

Vysvětlivky	6
<b>I. ÚVOD</b>	7
<b>II. CÍL PRÁCE</b>	11
<b>III. TEORETICKÁ ČÁST</b>	13
<b>3.1</b> Problematika průjmových onemocnění u selat	14
<b>3.2</b> Problematika průjmových onemocnění u telat	16
<b>3.3</b> Agens podílející se na vzniku průjmových onemocnění	18
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	18
3.3.2    Kmen <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
3.3.3    Kmen <i>Escherichia coli</i> O55	20
3.3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
<b>3.4</b> Interakce přírodních látek s mikroorganismy	23
<b>3.5</b> Směsi (látky) s antimikrobiálním účinkem	24
3.5.1    Silice	24
3.5.1.1 <i>Anisi stellati etheroleum</i>	24
3.5.1.2 <i>Caryophylli etheroleum</i>	26
3.5.1.3 <i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	27
3.5.1.4 <i>Citri etheroleum</i>	28
3.5.1.5 <i>Coriandri etheroleum</i>	30
3.5.1.6 <i>Eucalypti etheroleum</i>	31
3.5.1.7 <i>Geranii etheroleum</i>	32
3.5.1.8 <i>Lavandulae etheroleum</i>	33
3.5.1.9 <i>Melaleucae etheroleum</i>	34
3.5.1.10 <i>Origani etheroleum</i>	37
3.5.1.11 <i>Terebinthinae rectificatum etheroleum</i>	38
3.5.1.12 <i>Thymi etheroleum</i> (red x white)	39
3.5.2    Extrakty	41
3.5.2.1 <i>Hydrastidis canadensis extractum siccum</i>	41
3.5.2.2 <i>Leuzeae extractum fluidum</i>	42
3.5.2.3 <i>Ocimi extractum fluidum</i>	45

3.5.2.4	<i>Rosmarini extractum fluidum</i>	47
3.5.2.5	<i>Thymi extractum fluidum</i>	48
3.5.3	Obsahové složky	48
3.5.3.1	Berberin sulfát	48
3.5.3.2	Karvakrol a tymol	50
3.5.3.3	Piperin	53
3.5.3.4	<i>trans</i> -cinnamaldehyd	55
<b>IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>		57
4.1	Antimikrobiální aktivita vybraných rostlinných extraktů	58
4.1.1	Materiál pro stanovení	58
4.1.2	Metody použité pro stanovení	59
4.2	Antimikrobiální aktivita vybraných silic a jejich složek I	60
4.2.1	Materiál pro stanovení	60
4.2.2	Metoda použitá pro stanovení	61
4.3	Antimikrobiální aktivita vybraných silic a jejich složek II	62
4.3.1	Materiál pro stanovení	62
4.3.2	Metoda použitá pro stanovení	63
4.4	Antimikrobiální aktivita vybraných silic, jejich složek a suchého extraktu	63
4.4.1	Materiál pro stanovení	63
4.4.2	Metoda použitá pro stanovení	65
<b>V. VÝSLEDKY</b>		66
Fotodokumentace		73
<b>VI. DISKUZE</b>		76
<b>VII. LITERATURA</b>		83
ABSTRAKT		103

## Vysvětlivky

ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofostát
CFU	Colony Forming Units (kolonie tvořící jednotky)
COX-2	Cyklooxygenasa typu 2 - enzym podílející se na tvorbě prozánětlivých látek.
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> Nemoc, jejíž příčina není zcela objasněna. Může se objevit při onemocnění PMWS, po něm nebo samostatně. Přisuzována je PCV 2, ale uvažuje se i původci <i>Pasturella multocida</i> . Projevuje se kožními lézemi, vysokými teplotami. Vyskytuje se zejména u selat ve věku 8-18 týdnů.
PCV 2	Porcine Circovirus type 2
PDNS	Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome
PHE	Porcine Hemorrhagic Enteropathy – akutní forma PPE s typickou hemorragií. Objevuje se u selat ve věku 4-12 měsíců i starších. Končí náhlým úmrtím.
PMF	Proton Motive Force (protonová hnací síla)
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
PPE	Porcine Proliferative Enteropathy – ileitida selat. Prasečí cirkovirus typu 2 je příčinou PMWS, pravděpodobně i PDNS a jiných onemocnění s podobným klinickým obrazem (na rozdíl od PCV1, který nesouvisí s žádnými zdravotními problémy prasat s obdobným průběhem nemoci). Syndrom způsobený PCV 2 virem u selat. Dochází k výraznému váhovému úbytku, značnému zvětšení lymfatických uzlin, objevuje se těžké dýchání, průjem, žloutenka.
USP	United States Pharmacopoeia (americký lékopis)
VGP	Virový glykopeptid – existuje typ 1 a typ 2, souvisí se spalničkami.

## I. ÚVOD

Jednou z příčin významných ekonomických ztrát v chovech hospodářských zvířat jsou infekce gastrointestinálního traktu. Výsledkem jsou zvýšené úhyny, větší náklady na léčbu a snížené přírůstky. To vše souvisí s vyššími náklady na produkci chovů. Důležitá jsou proto preventivní opatření v oblasti zootechnických podmínek, kam lze zahrnout i použití antimikrobiálních látek v krmivech<sup>1</sup>. Veterinární antibiotika jsou velmi účinným nástrojem pro kontrolu infekčních onemocnění u lidí i zvířat. Je podstatné, aby všechny země měly zaveden takový systém, aby veterinární antimikrobiální léčivé přípravky byly vyráběny, distribuovány, prodávány, předepisovány a používány zodpovědně, a aby tento systém byl náležitě prověřován.

Dosažitelnost veterinárních antibiotik, která jsou zásadní pro kvalitu života a zdraví zvířat a následně i zdraví lidí, je závislá na odpovědném používání antimikrobiálních léčivých přípravků. Mezi zásady správné antibiotické praxe lze zahrnout:

- 1) rozumné, střídme a nákladově efektivní používání antibiotik,
- 2) účinnou antibiotickou terapii a profylaxi, klinickou a epidemiologickou bezpečnost,
- 3) dodržování doporučených postupů pro antibiotickou terapii a profylaxi.

Mezioborová spolupráce lékařů, veterinářů, farmakologů a farmaceutů, uživatelů antibiotik, společností a výrobců, distributorů a prodejců antibiotik, mohou zajistit dlouhodobé zachování účinnosti antimikrobiálních léčiv pro humánní a veterinární terapii<sup>2</sup>.

Od roku 2006 již nejsou povoleny pro používání žádné antibiotické růstové stimulanty. Začíná se ale diskutovat o tom, zda zákaz růstových stimulantů byl skutečně opodstatněný. V období po zákazu došlo totiž k nárůstu spotřeby antibiotik pro terapeutické účely a ani nebyl zaznamenán pokles hladiny rezistence u humánních patogenů.

Největším problémem jsou meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, které vyvolávají zejména obtížně léčitelné nosokomiální infekce u lidí. U zvířat jsou zaznamenány spíše kolonizace mezi domácími zvířaty a u koní, poslední dobou však i u jatečných zvířat. Klon izolovaný z prasat byl zjištěn i u některých humánních infekcí, což vede k domněnce o transferu rezistentních genů.



Úroveň rezistence u enterobakterií se liší mezi jednotlivými státy. Vysoká hladina rezistence byla zaznamenána např. ve Španělsku nebo Nizozemsku u *E. coli* izolovaných z prasat, naopak nulová hladina je hlášena z Rakouska či Dánska. Obecně lze konstatovat, že je v rámci Evropy prokázán nárůst rezistence u enterobakterií (zejména *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*). Rychle se přenáší i geny, které kódují beta-laktamasy. Rezervoárem těchto genů mohou být i potravinová zvířata<sup>3</sup>.

Je pochopitelné, že z oblasti terapie chorob hospodářských zvířat nelze antibiotika zcela vyloučit. V případě profylaktického podávání antibiotik je tomu ovšem trochu jinak. Jelikož i při podávání antibiotik za účelem růstově-stimulačním nebo profylaktickým hrozí vznik rezistence bakteriálních kmenů, je zapotřebí hledat jejich náhradu jinde.

Jednou z mnoha možností mohou být fyto-genní zdroje (silice, soli organických kyselin, mastné kyseliny, organické kyseliny, různé druhy koření, extrakty z léčivých rostlin a jejich kombinace apod.). Ačkoliv z hlediska účinnosti se u všech náhražek dá tvrdit, že někdy fungují a někdy ne, získávají si tyto neantibiotické stimulatory růstu všeobecnou oblibu. Celá řada pozitivně hodnocených výsledků výzkumů stojí v opozici proti výsledkům jiných výzkumů, které žádný vliv neprokázaly<sup>4</sup>.

Předpoklad, že rostlinné složky by mohly zlepšit palatabilitu krmiva nebyl dosud potvrzen studii zabývajícími se vývojem krmiv.

Ačkoliv mnoho výzkumů testovalo oxidativní a antimikrobiální účinek látek *in vitro*, počet experimentů *in vivo* je stále dost omezený. To samé se týká domněnky, že rostlinné složky mohou specificky podporovat činnost trávicích enzymů a vstřebávání živin. Nicméně omezený počet experimentálních porovnání rostlinných krmných additiv s antibiotiky a organickými kyselinami naznačuje podobné efekty na trávicí systém, jako např.:

- snížený počet bakteriálního osídlení střev,
- sníženou fermentaci produktů,
- sníženou činnost lymfatického systému spojeného s trávením,
- zvýšené preceakální trávení živin, které je pravděpodobným odrazem celkového zlepšení rovnováhy střeva.

Zdá se, že některé rostlinné složky podporují sekreci střevní mukózy. Takové účinky mohou vysvětlovat značný počet výzkumů v praxi v rámci chovu prasat a drůbeže, které podávají informace o zlepšení produktivity chovů po aplikaci fyto­genních krmných additiv. Celkově vzato, hodnotné výsledky nepřímo dokazují, že tyto látky mohou doplňovat řadu neantibiotických stimula­torů růstu u hospodářských zvířat. Avšak stále se postrádá systematický přístup v rámci účinnosti a bezpečnosti rostlinných složek používaných jako krmná additiva např. u vepřového dobytka nebo drůbeže <sup>5</sup>.

Tato rigorózní práce se zaměřila na potvrzení antimikrobiálního efektu vybraných rostlinných extraktů, silic jejich složek a dalších látek, za účelem stanovit jejich minimální inhibiční koncentraci (popř. minimální baktericidní koncentraci) a porovnat výsledky s experimenty jiných výzkumů. Při práci byl použit mnou navržený postup analýzy.

## **II. CÍL PRÁCE**

Cílem této rigorózní práce bylo:

- 1) provést rešerži informačních zdrojů zabývajících se problematikou rezistence patogenních mikroorganismů vůči terapii antibiotiky ve veterinární oblasti a problematikou průjmových onemocnění v chovech hospodářských zvířat,
- 2) vytvořit informativní přehled o zkoumaných rostlinných extraktech, o silicích a jednotlivých složkách, které dle jiných studií vykazují antibakteriální účinek vůči infekčním agens způsobující průjmová onemocnění v chovech hospodářských zvířat,
- 3) připravit sumární extrakty z vybraných rostlin a stanovit jejich minimální inhibiční koncentraci (MIC) pro *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*,
- 4) připravit mikroemulze vybraných certifikovaných silic a jejich složek a stanovit minimální baktericidní koncentraci (MBC) pro *E. coli* (sérotyp O157:H7 a O55) po době kontaktu se zkoušenou látkou v délce 15 minut a 24 hodin,
- 5) připravit mikroemulze vybraných certifikovaných silic a jejich složek a připravit roztoky surovin v práškové formě za účelem stanovit MIC a MBC pro *E. coli* a *S. aureus* po době kontaktu se zkoušenou látkou v délce 15 minut a 24 hodin,
- 6) porovnat tvrzení jiných výzkumů se získanými výsledky mikrobiologických pokusů,
- 7) vyhodnotit získané výsledky, popř. zdůvodnit možné odchylky od výsledků jiných studií, zhodnotit interakci testovaných látek s gastrointestinálním traktem hospodářských zvířat.

### **III. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 PROBLEMATIKA PRŮJMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ U SELAT

Jedná-li se o infekční onemocnění, jsou rizikovými faktory především vysoká hustota populace v dané oblasti, vysoká početnost stáda, nedostatečná (malá) vzdálenost mezi skupinami ustájených zvířat, zvířata nakupovaná z různých zdrojů nestejné nákazové situace, nedostatečná ventilace, vysoká, ale i příliš nízká teplota a velké teplotní výkyvy, nedostatek světla a nedostatky v prevenci a kontrolních vyšetřeních <sup>6</sup>.

Tyto faktory se mohou stát zároveň zdrojem neinfekčních průjmů vlivem dyspepsie zvířat, která se vyznačuje poruchou sekrece, resorpce a motoriky slezu a střev u přežvýkavců s následným nechutenstvím, průjmy a rychle se rozvíjející dehydratací. Hlavní příčinou je nízká kvalita ošetrovatelské péče, nedostatky v napájení, v ustájení a nedodržování hygienických zásad chovu. Odstranění vyvolávajících příčin a vhodná rehydratační terapie rychle vedou k uzdravení zvířat a ztráty nebývají velké <sup>7</sup>.

#### Současná nejčastější onemocnění gastrointestinálního traktu:

Dysenterie prasat	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>
Spirochetóza kol.	<i>Brachyspira pilosicoli</i>
Koliinfekce	<i>Escherichia coli</i>
Klostridióza	<i>Clostridium perfringens</i> A; C ( <i>C.difficile</i> )
Kokcidióza	<i>Isospora suis</i>
Rotavirové průjmy	<i>Rotavirus</i> A
VGP	<i>Virus VGP</i>
PPE/ PHE	<i>Lawsonia intracellulare</i>
PMWS -PDNS	<i>PCV 2</i>
Spirochetóza kolonu	<i>Brachyspira pilosicoli</i>

#### Parazitózy:

*Ascaris suum*, *Metastrongylus* spp., *Hyostrongylus rubidus*, *Trichuris suis*, *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides ransomi*

Primární příčiny průjmu jsou:

- Virové

T.G.E. (transmissivní gastroenteritis), *Rotavirus*, *Circovirus* (PCV 2)

- Bakteriální

*E. coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens*, *Brachispyra hyodysentery*,  
*Lawsonia intracellularis* (ileitis), *Brachispyra pilosicoli*

- Protozoální

*Coccidia*, *Balantidium coli*

- Parazitární

*Ascaris suum*, *Oesophagostomum*

Colibacilosis/*E. coli*

Kolibacilóza je infekce enteropatogenními bakteriemi *E. coli*.

**Období projevu :**

- neonatální diarrhea (0-72 hodin stáří)
- mléčná diarrhea (9 dnů – do odstavu)

Onemocnění se vyskytuje u selat po narození a projevuje se jako neonatální průjem, charakteristický následnými klinickými příznaky:

- žlutý vodnatý průjem,
- dehydratace,
- mírný zánět tenkého střeva (při pitvě),
- střevní kličky vyplněné tekutinou,
- nestrávené sražené mléko v tenkém střevě.

Hlavní příčiny problémů při odstavu selat:

- absence ochranných látek a růstových faktorů obsažených v mléce,
- morfologické změny a snížení absorpční kapacity tenkého střeva,
- rozvoj enteropatogenní mikroflóry,
- přístupnost depresivních látek v krmivu,
- stres,
- mortalita selat do odstavu,

- 4-10 % ztrát v průběhu porodu,
- v závislosti na technologii mohou být ztráty v odchovu pod prasnicí 20-30 % (údaje z různých zemí světa uvádí ztráty 11-19 %) Polovina ztrát je v prvních 3-4 dnech života selat nejvíce do 36 hodin po narození <sup>6</sup>.

### 3.2 PROBLEMATIKA PRŮJMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ U TELAT

Největší nebezpečí průjmového onemocnění narozených telat existuje v období první a druhé neonatální fáze, v období přetváření střevního epitelu fetálního na postfetální. Kritické je období, kdy se novorozenec setká se zcela běžným zárodkem a zároveň třeba i s menší dietetickou závadou. Sumace těchto faktorů může u několikadenních telat vést k závažným funkčním poruchám gastroenterálního systému, případně až k úhynu.

Etiologicky přichází v úvahu mnoho faktorů, které mohou průjem vyvolat, ať už jednotlivě nebo v kombinaci.

Příčiny **neinfekčních** průjmů (alimentárních) se vyskytují při chybách v krmné technice, nebo po zařazení nevhodných krmiv a lze je řadit do tří skupin:

fermentativní diarrhoea – vzniká v důsledku mikrobiální fermentace nestrávených peptidů, popř. extrémně vysoké dávky laktózy,

putrifikační diarrhoea – vzniká jako důsledek hnilobných procesů po vysokém příjmu proteinů,

steatorrhea – vzniká jako důsledek nedostatečného trávení tuků při příliš vysokém příjmu tuků v nápoji nebo konzumaci nevhodného tuku.

Průjmy vznikající vlivem chyb v krmné technice mohou mít příčinu v příliš velkém intervalu mezi pitím a v následném příjmu velkého, těžko zpracovatelného objemu, v příliš koncentrovaném nápoji (použití sušených mléčných produktů), v nízké teplotě nápoje (nebylo dosaženo teploty bodu tání pro tuky), v nadměrném obsahu peptidů, v nadměrném množství podaného mléka. Chyby v krmné technice vedou zpravidla ke zpomalenému srážení mléka ve slezu, s následným dešetravajícím zpracováním kaseinu. Následkem toho vznikají konglomeráty ve slezu, dochází ke zpětnému toku do ještě



funkčního bacheru a k bakteriálnímu rozkladu enzymaticky nezpracovaného mléka (hnití, kvašení). V tenkém střevě se maximalizují osmoticky nebo toxicky působící produkty, zvýší se sekrece tekutin ve střevě a vede k průjmům (fermentativní diarrhoea). Často jsou tyto poruchy, které způsobují labilitu GIT komplikovány sekundární infekcí – alimentární diarrhoea.

Příčinou **infekčních** průjmů může být mnoho původců. Ve shodě s dřívějšími údaji autoři uvádějí, že nejobtížnějšími zárodky v prvních dvou týdnech života telat jsou *E. coli* (39 %), rotaviry, koronaviry (9 %) a kryptosporidie (11 %), u 35 % těžkých mikrobiálních průjmů byla příčinou smíšená infekce. Průjem vyvolaný zárodky *E. coli* lze klasifikovat jako diarrhoe s primárními poruchami sekrece. Po orálním příjmu je nezbytné, aby se bakterie dostaly do tenkého střeva. Za normálních fyziologických podmínek by byly usmrceny nízkým pH ve slezu. U novorozenců je však sekrece kyseliny chlorovodíkové ještě malá, imunoglobuliny kolostra nejsou ničeny a nejsou ovlivněny ani bakterie. Následuje akutní infekce střeva bez invaze zárodků do stěny střevní a do krevního systému.

Infekce enterotoxickými *E. coli* jsou nejnebezpečnějším onemocněním prvního týdne života, mohou se však vyskytnout případy nástupu onemocnění i ve druhém týdnu po narození. Inkubace je 24 - 48 hodin. Monoinfekce *E. coli* nepoškozuje střevní epitel, do krevního řečiště nepřecházejí ani bakterie ani toxiny. Exkrement je vodnatý, šedožlutý a může obsahovat příměs krve. Při akutním průběhu trvá onemocnění tři až šest dní <sup>8</sup>.

V roce 2008 prokázala německá studie, že u 49,5 % případů nemocných telat se jednalo o vzájemnou součinnost více původců průjmových onemocnění. Vědci analyzovali v rámci výzkumu vzorky exkrementů 265 telat postižených průjmovým onemocněním. V 55 % případů se jednalo o kryptosporidiovou a v 33,4 % o rotavirovou infekci. U 49,5 % analyzovaných vzorků trusu byla prokázána přítomnost více než jednoho původce průjmového onemocnění.

Je zajímavé, že průběh průjmových onemocnění byl u telat s prokázanou kryptosporidiovou infekcí signifikantně delší v porovnání s infekčními průjmy vyvolanými *E. coli* nebo rotaviry. V průměru průjmová onemocnění vyvolaná

kryptosporidiami u telat přetrvávala po dobu 15,8 dne, zatímco v ostatních případech to bylo 14,6 dne <sup>9</sup>.

### 3.3 AGENS PODÍLEJÍCÍ SE NA VZNIKU PRŮJMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ

#### 3.3.1 *Escherichia coli*

Fakultativně anaerobní, gramnegativní bakterie tyčkovitého tvaru jsou opatřené bičíky, které zajišťují pohyb, velikost mikroorganismů je v cca 1 µm.

Kmeny *E. coli* lze rozdělit na dvě skupiny: První představuje běžnou mikroflóru trávicího traktu a druhá nejčastější střevní patogeny prasat. I přes rozličné biochemické vlastnosti u těchto koliformních bakterií lze nalézt některé společné převládající charakteristiky. Základní diferenciací jednotlivých kmenů je založena na sérotypizaci somatických O-antigenů, kapsulárních K-antigenů, bičíkových H-antigenů a fimbriálních F-antigenů (tzv. adheziny, jejichž počet je proměnlivý)<sup>10</sup>.

Průjmová onemocnění vyvolávají jen ty kmeny *E. coli*, které mají virulentní faktory. Významné jsou kmeny, které tvoří termostabilní enterotoxin-ETEC (enterotoxické *E. coli*) s O antigeny 8, 9, 20, 101. Patogenetické jsou adhezní antigeny F5, F41, F17a F17b. Jsou zodpovědné za přilnutí k buňkám střevní výstelky. Enterotoxiny (ST-1, LT) spouští sekretní diarrehu. Při ETEC stimuluje enterotoxin ST-1 sekreci chloridu v buňkách střeva, aniž je poškozuje a dochází k jeho vylučování dovnitř střeva, následuje difúze do střeva a na základě vznikajících osmotických gradientů se dostává do střeva také voda. Vytváří se klinický obraz sekretní diarrhoe <sup>8</sup>.

Faktory virulence se liší podle toho, ke které z následujících skupin izolované kmeny *E. coli* patří. Jedná se o:

- Enterotoxigenní kmeny *E. coli* (ETEC)
- „Attaching-effacing“ kmeny *E. coli* (AEEC):
  - a)** enteropatogenní kmeny (EPEC)
  - b)** shiga-toxin produkující kmeny (STEC)
  - c)** enterohemoragické kmeny (EHEC)
- Enteroagregativní kmeny *E. coli* (EGEC) – dříve označované EaggEC <sup>11</sup>.

### 3.3.2 Kmen *E. coli* O157:H7

Patří do skupiny enterohemorragických kmenů *E. coli* (EHEC). Ty se podílejí na vzniku průjmových onemocnění sajících selat i prasat po odstavu. EHEC kmeny byly prokázány i u celé řady zdravých, nebo průjmy trpících hospod. zvířat (telat, jehňat i králíků). Nejobávanějším kmenem z této skupiny je právě O157, který tvoří verotoxin (VTEC)<sup>10</sup>.

EHEC kmeny *E. coli* jsou však vysoce patogenní rovněž pro člověka. Infekce je typickou zoonózou, při které se může nakazit v krátké době několik stovek až tisíců lidí. Přenos se uskutečňuje především tepelně nedostatečně upravenými potravinami (maso, masné výrobky, nepasterizované mléko a mléčné výrobky) nebo kontaktem s výkaly obsahujícími EHEC kmeny *E. coli*<sup>11</sup>. Proto je nutné předcházet těmto nákazám již na úrovni samotných chovů, tzn. zajistit podmínky, které by snížily pravděpodobnost výskytu průjmových onemocnění jak u zvířat, tak u člověka.

Nejdůležitějším rezervoárem *E. coli* O157:H7 je bezesporu střevní trakt zejména hovězího dobytka a ovcí, s frekvencí výskytu obvykle mezi 0,15-4 %<sup>12</sup>. Pro skot je však tento sérotyp neškodný, zvířata jsou hostiteli. Patogenní se stávají při přenosu na chov prasat. Pro telata je patogenní sérotyp K99 a pro prasata K88<sup>13, 14</sup>.

Některé kmeny patogenních *E. coli* rostou v teplotním rozmezí 7°C až 46°C s optimem mezi 35-40°C. *E. coli* O157:H7 je teplotními podmínkami omezováno o něco více, neboť minimální teplota pro růst je 8°C a maximální 44-45°C<sup>12</sup>.

Vliv na procento infikovaných zvířat ve stádě a na přežívání *E. coli* O157:H7 v trávicím traktu přežvýkavců může mít pravděpodobně i typ krmiva<sup>15</sup>. U ovcí byl testován vliv diety, změny diety a hladovění na výskyt tohoto sérotypu *E. coli*. V rámci jednoho pokusu byla zvířata krmena buď dietou s vysokým obsahem vlákniny a nízkým obsahem bílkovin (zelená píče, seno, "grass", G skupina), nebo krmivem na bázi kukuřice a granulovanou vojtěškou ("corn", C skupina), které bylo bohaté na proteiny a energii. Po jednorázové experimentální infekci byla všechna zvířata kultivačně pozitivní na *E. coli* O157:H7, avšak skupina G měla vyšší koncentraci *E. coli* O157:H7 a navíc tyto

bakterie přežívaly dvakrát delší dobu než tomu bylo u skupiny C. Počet kultivačně pozitivních zvířat vzrostl když došlo ke změně krmiva z C na G a naopak došlo k poklesu po změně z G na C. Výsledky ukazují, že úprava krmné dávky může redukovat riziko zavlečení *E. coli* O157:H7 do potravního řetězce<sup>16</sup>.

### 3.3.3 Kmen *E. coli* O55

Jedná se o jednoho z mnoha dalších zástupců kmene *E. coli*. Sérotyp O55 náleží do skupiny enteropatogenních escherichií (EPEC). Způsobuje průjmová infekční onemocnění nejen v oblasti humánní medicíny, ale je rizikem i pro mláďata hospodářských zvířat, zejména po odstavu. Jeho patogenita spočívá ve spouštění zánětlivých mechanismů. V intestinálním lumen po té dochází k poruše absorpce vody a živin a k narušení elektrolytové rovnováhy v těle. Důkazem zánětlivého procesu je přítomnost antibakteriálního proteinu kalprotektinu. Tento dimer je produkován neutrofilními granulocyty, monocyty, makrofágy a některými epitelu. Jako adhezín se podílí na přestupu leukocytů z cirkulace do místa zánětu. Po aktivaci neutrofilů a adhezi monocytů k endotelu je uvolňován, působí bakteriostaticky a ovlivňuje lokální cytokinovou odpověď. Kalprotektin je tedy spolehlivým znakem zánětu<sup>17</sup>.

Příkladem je studie, ve které byla selata infikována *E. coli* O55. Následně u nich vzrostla plazmatická hladina kalprotektinu, což souviselo se septikémií<sup>18</sup>.

Stejný sérotyp byl zaveden do amniové dutiny v 79. až 86. dni březosti prasnic po dobu 6 nebo 10 hodin. Infekce způsobila influx makrofágů, které se stanovily pomocí monoklonálních protilátek rozeznávajících kalprotektin<sup>19</sup>.

### 3.3.4 *Staphylococcus aureus*

Je jedním z mnoha zástupců rodu *Staphylococcus*, patří mezi koagulasa-pozitivní, grampozitivní bakterie. Disponuje mnoha faktory virulence, z nichž některé způsobují infekce GIT. Jedná se především o enterotoxiny, termostabilní proteiny odolné vůči trávicím enzymům hostitele, které vyvolávají zvracení a průjem. Enterokolitidu způsobuje enterotoxin B. S průjmy souvisí i přítomnost peptidoglykanu (PGN) v buněčné stěně stafylokoků. Podporuje

uvolnění cytokinů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování krevních destiček<sup>20</sup>.

Zahraniční studie dokázala, že podáním PGN myším pomocí žaludeční sondy se po absorpci PGN intestinálními buňkami aktivuje činnost mastocytů. Ty uvolňují mediátory zánětu (histamin a serotonin), které hrají vůči PGN synergickou úlohu<sup>21</sup>.

Je však popsáno jen málo případů, kdy by se *S. aureus* stal zdrojem gastroenteritidy u zvířat. Avšak u některých studií podání enterotoxinu B cestou *per os* vyústilo v diarrhoe nebo jiné disfunkční příznaky GIT. Převážně u myší a primátů (*Macaca mulatta*) se zkoumal vliv enterotoxinu B aplikovaného inhalací (aerosolová forma). U makaků vyvolala inhalace toxinu průjem a zvracení během 24 hodin, následně se dostavil útlum, dyspnoe a šok. Tři zvířata ze šesti zemřela do tří dnů<sup>22</sup>.

**Tabulka 1: Základní charakteristiky významných kmenů *E. coli* vyvolávajících průjemové onemocnění u zvířat <sup>11</sup>**

Typ <i>E. coli</i>	Klinické příznaky	Převládající séroskupiny	Patologický nález	Faktory virulence
ETEC	převažují průjemová onemocnění novorozenců u všech druhů savců	O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O128, O148, O149, O159, O173	bakterie kolonizují tenké střevo, aniž by vyvolaly patomorfologické změny	Sta, STb, LT, K88, K99, 987P, F18, F41, F1845, CS31A
ETEC u selat	vodnatý průjem	O8, O9, O45, O101, O138, O147, O149, O157		Sta, STb, LT, K99, 987P, F41, K88, F18
ETEC u skotu	vodnatý průjem u telat ve věku 0-14 dní	O8, O9, O20, O101		Sta, K99, F17, F41, F1845, CS31A
ETEC+VTEC	průjmy a nebo příznaky ED	O139, O141, O138, O157		Stx2e + kombinace různých faktorů virulence
EHEC	hemoragická kolitis u telat a selat	O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118, O145	A/E * změny různé intenzity a lokalizace	Stx1, Stx2, Stx2c
Specifikované EHEC kmeny	hemoragická kolitis a další příznaky u telat a selat	O157:H7, O157:H <sup>-</sup>		
EPEC králíků	průjem	O26, O49, O92, O128	AE a v distálních úsecích tenkého a proximálních úsecích tlustého střeva eroze i ulcerace	blíže nespecifikované toxiny
EPEC selat		O45		
EPEC telat		O26, O11, O119, O114		
NTEC	průjmy telat, selat a lidí	O,4, O6, O8, O15, O76, O78, O88, O123, O139	změny na střevech, případně na močovém aparátu	CNF1 a CNF2

### 3.4 INTERAKCE PŘÍRODNÍCH LÁTEK S MIKROORGANISMY

Antimikrobiální vlastnost silic a jejich složek byla v minulosti posuzována vždy, avšak mechanismus účinku nebyl nikdy ve velkých detailech prozkoumán<sup>23</sup>. Je velmi pravděpodobné, že jejich antibakteriální účinek nesouvisí s jedním specifickým mechanismem, nýbrž že existuje několik buněčných cílů, neboť počet různých skupin chemických složek přítomných v silicích je obrovský<sup>24, 25</sup>.

Nabízí se několik možností, kterými dochází k usmrcení mikroorganismu:

- eflux buněčného obsahu z buňky,
- degradace buněčné stěny,
- koagulace cytoplazmy,
- zničení cytoplazmatické membrány,
- zničení membránových proteinů,
- snížení počtu protonových pump.

Usuzuje se, že vlivem přítomnosti lipopolysacharidové vrstvy, která obklopuje periplazmatický prostor (čímž brání difúzi hydrofobních složek) jsou gramnegativní mikroorganismy méně citlivé k antibakteriálním látkám přírodního původu<sup>26</sup>. To však zároveň vyvrací jiná studie, která vyšší citlivost grampozitivních bakterií vůči silicím a jejich složkám nepotvrdila<sup>27</sup>. Například *Aeromonas hydrophila* jakožto nejcitlivější zástupce gramnegativních bakterií dokázal v přítomnosti testovaných látek přežít<sup>28, 29, 30, 31, 32</sup>.

V jiné studii na citlivost mikrobiálních agens po 24 hodinách expozice není zřejmý naměřený rozdíl v citlivosti mezi grampozitivními a gramnegativními organismy. Inhibiční efekt po 48 hodinách však zesílil více u gramnegativních zástupců než u grampozitivních<sup>33</sup>. Výzkum testující 50 komerčně dostupných silic na 25 druzích zárodků nevydal žádný důkaz o rozdílnosti v citlivosti mezi grampozitivními a gramnegativními organismy<sup>28</sup>.

Naproti tomu jiná studie, ve které byly provedeny stejné testovací metody se stejnými bakteriálními izoláty, ale za použití čerstvě destilované silice, odhalila, že grampozitivní bakterie byly skutečně citlivější vůči dvěma zkoušeným silicím a zároveň byly stejně citlivé vůči jiným čtyřem silicím než gramnegativní druhy<sup>34</sup>.

### 3.5 SMĚSI (LÁTKY) S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM

Do této práce byly zahrnuty takové rostliny a jejich produkty, které jsou celosvětově diskutovány jako potenciálně účinné v oblasti humánní i veterinární léčby průjmových onemocnění. Účelem bylo zjistit M a MBC pro kmeny *E. coli* a *S. aureus*. Testované vzorky lze rozdělit na:

- připravené sumární extrakty (tekuté a suché),
- silice,
- obsahové látky.

**Tabulka 2.: Seznam použitých rostlinných zdrojů**

<b>Rostlinné extrakty z:</b>	<i>Leuzea carthamoides</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Ocimum sanctum</i> , <i>Hydrastis canadensis</i>
<b>Silice</b>	<i>Eucalypti etheroleum</i> , <i>Origanum etheroleum</i> , <i>Thymi etheroleum</i> – red, <i>Thymi etheroleum</i> – white, <i>Terebinthinae etheroleum</i> , <i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i> , <i>Coriandri etheroleum</i> , <i>Anisi stellati etheroleum</i> , <i>Caryophylli etheroleum</i> , <i>Citri etheroleum</i> , <i>Geranii etheroleum</i> , <i>Lavandulae etheroleum</i> , <i>Melaleuca etheroleum</i>
<b>Účinné látky</b>	Karvakrol, tymol, <i>trans</i> -cinnamaldehyd, berberin sulfát, piperin

#### 3.5.1 SILICE

##### 3.5.1.1 *Anisi stellati etheroleum*

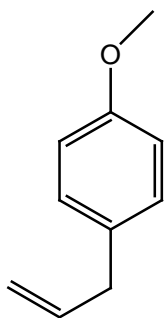
Zdrojem silice je strom *Illicium verum* Hook. fil., badyáník pravý. Jedná se o čirou, bezbarvou až nažloutlou kapalinu, která se v chladu mění na bílou tuhnoucí formu s obsahem krystalků mísitelnou s dichlormethanem, 90% ethanolem, etherem, petroletherem, toluenem, nasycenými mastnými kyselinami a s tekutým parafínem<sup>94</sup>.

Hlavní složkou, která ovlivňuje vůni a chuť silice je fenypropanderivát

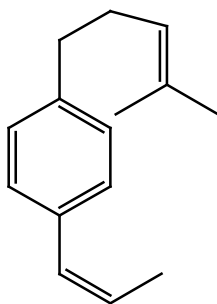


*trans*-anethol (80-90 %). Dalšími fenyylpropanovými deriváty jsou methylchavikol (syn. estragol) (max. 6,6 %), fenikulin (0,5-5 %), *cis*-anethol (max. 0,4 %) a anisaldehyd (0,4-1,7 %). Z monoterpenů jsou zastoupeny především limonen (0,4-10,4 %), linalool (0,5-2,3 %) a  $\alpha$ -pinen (0,1-2,6 %). Seskviterpenový podíl uhlovodíků sestává z  $\beta$ -bisabolenu, karyofylenu,  $\alpha$ -kopaenu a  $\beta$ -farnesenu<sup>35</sup>. U badyánu dříve typicky popisovaný 1,4-cineol nebyl později potvrzen<sup>36</sup>. Během destilace vzniká z fenikulinu Claisenovým přesmykem artefakt anisoxid<sup>37</sup>.

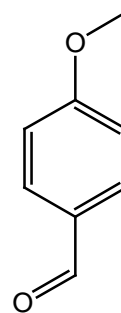
Silice a její zředěný roztok v olivovém oleji působí *in vitro* antibakteriálně<sup>38</sup>. Zvyšuje bronchiální sekreci u morčat, králíků a krys. U izolované trachey morčete antagonizuje spasmus hladkého svalstva vyvolané karbacholem, avšak u tenkého střeva nikoliv. U izolovaného tenkého střeva králíků, krys a koček snižuje silice frekvenci a amplitudu jeho zpětného pohybu a vede k relaxaci hladkého svalstva<sup>39</sup>. U člověka může anýzová silice po perorálním podání stimulovat sekreci žaludečních šťáv a podporovat trávení<sup>40</sup>.



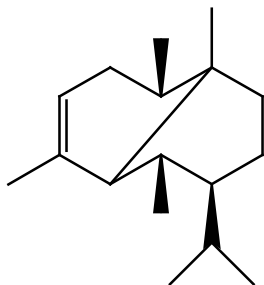
methylchavikol



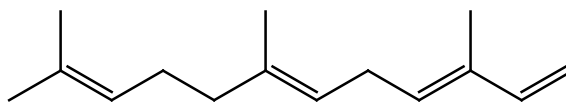
fenikulin



anisaldehyd



$\alpha$ -kopaen



farnesen

### 3.5.1.2 *Caryophylli etheroleum*

Silice se nachází v kořeni, listech, řapících, květech a plodech *Syzygium aromaticum* (L.) MERR. et L. M. PERRY, hřebíčkovce vonného.

Hlavní složkou ve všech rostlinných orgánech je eugenol, druh a množství doprovodných látek se různí.

Hřebíčková silice je čirá, bezbarvá až nažloutlá kapalina, která po čase hnědne (např. kontaminací železitými nebo mědnatými ionty). Má charakteristickou sladce kořenitou vůni a hřejivou, štiplavou až pálivě kořenitou chuť.

U listů závisí poměr eugenolu k eugenyl-acetátu zejména na stáří listů počítaného ode dne rozvinutí listů. Dva až deset dní staré listy obsahují silici s podílem eugenolu od 28 do 53 % a odpovídajícím obsahem eugenyl-acetátu od 51 do 40 %. Po dalších třech až pěti týdnech se obsah eugenolu zvyšuje na 95 %, eugenyl-acetát klesá na 1,5 %. Eugenol a celá řada dalších kapalných látek se nacházejí jen v malé části volně, neboť tvoří glykosidickou vazbu. Tento jev je známý též u jiných rostlinných druhů s obsahem silice.

Rozdělovací chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie pomohly nalézt v listech rozličné izolované látky. Hlavní složkou byl tellimagrandin II, dále byl doložen kasuariktin (2,3-hexahydroxydifenoyleglukóza). Kromě toho se v listu nachází 3,4-dihydroxyfenethylalkohol a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina<sup>94</sup>.

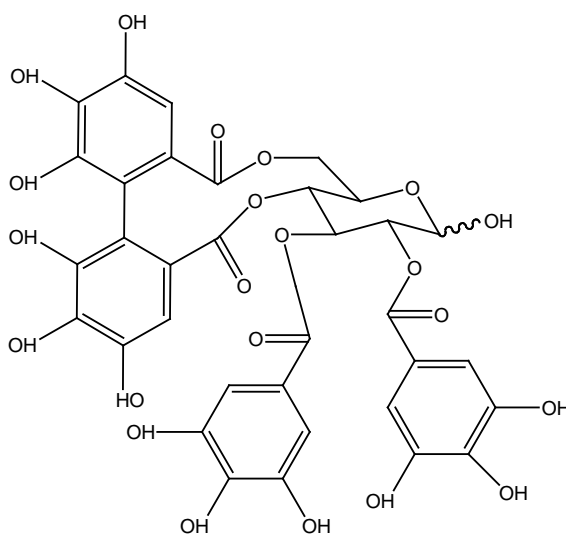
Co se obsahu a složení silice týče, jedná se u *Syzygium aromaticum* o selektovaný a vyšlechtěný chemotyp. Na Molukách, původní zemi tohoto druhu, existují divoké druhy, které poskytují tzv. „divoký hřebíček“ s obsahem silice od 3,6 do 7,5 %. Tato neobsahuje prakticky žádný eugenol, nýbrž eugenon (2,4,6-trimethoxybenzylaceton) a eugenin (methyl-5-hydroxy-7-methoxychromon) jako hlavní podíl<sup>41</sup>.

V tradičním lidovém léčitelství lze používání hřebíčkovce sledovat v případech léčby vředových chorob trávicího traktu, droga má rovněž pročišťující účinek. U zvířecích modelů myší bylo zjištěno po podání extraktu zesílení peristaltických pohybů hladkého svalstva střev, podobně jako po aplikaci standardních léčiv karcholu a metoklopramidu. Pokud se extrakt použil

společně s atropinem, působil spíše redukci střevních peristaltiky. To může naznačovat spoluúčast, zapojení cholinergního mechanismu do účinku extraktu<sup>42</sup>.

Hřebíčková silice je silně antibakteriální vůči *E. coli* (průměr inhibiční zóny v diskové metodě byl u tohoto kmene z osmi dalších testovaných kmenů největší). U *S. aureus* výrazně snižuje produkci enterotoxinů A, B i alfa-toxinu<sup>43</sup>.

Hřebíček má mnoho terapeutických využití: zmírňuje bolest, potlačuje nauzeu a vomitus, chrání proti vnitřním parazitům a hraje roli jako antimikrobiální agens proti plísním a bakteriím způsobující děložní kontrakce, je silně antiseptický<sup>44</sup>. Uplatnění nalézá také při flatulenci, žaludečních obtížích, a gastrointestinálních spasmech<sup>45</sup>.



tellimagrandin II

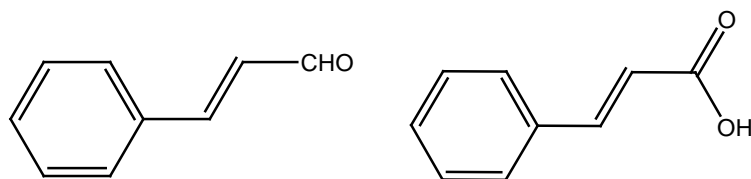
### 3.5.1.3 *Cinnamomi zeylanici etheroleum*

Silice získaná parní destilací z kůry výhonků *Cinnamomum zeylanicum* Nees., skořicovníku ceylonského, obsahuje cca 42-76 % cinnamaldehydu jako hlavní složky a pouze 4-10 % eugenolu. Uvádí se dalších 70 chemických sloučenin, mezi jinými cinnamylalkohol, kyselina skořicová, *o*-methoxycinnamaldehyd, cinnamyl-acetát v proměnlivém množství. Kumarin se nevyskytuje prakticky vůbec nebo jen v nepatrných množstvích.

Silice je neomezeně mísitelná s ethanolem, etherem, chloroformem nebo mastnými oleji, s petroletherem se mísí jen částečně, s tekutým parafínem je nemísitelná a ve vodě je prakticky nerozpustná. Chuť silice je zpočátku sladce aromatická, poté ostře palčivá. Voní příjemně po skořici (připomíná aroma skořicového aldehydu) a vzhledem se jedná o čirou, světloužlutou kapalinu<sup>94</sup>.

Komission E navrhuje použití skořice při nechutenství a při špatném trávení, avšak tato využití nejsou podpořena věrohodnými vědeckými důkazy<sup>46</sup>. U dvou studií na zvířatech bylo doloženo, že extrakt z kůry skořicovníku podávaný orálně může pomoci v prevenci před žaludečními vředy<sup>47, 48</sup>. Předběžné výsledky z laboratoří a studií na zvířatech naznačují antifungální, antibakteriální a antiparazitické vlastnosti silice i extraktu. Například byla pozorována aktivita proti *Candida albicans*, *Helicobacter pylori* a dokonce proti vším<sup>49</sup>.

V difuzním agarovém testu se skořicová silice projevila jako účinná proti rozličným bakteriím s MIC 1:2560 u *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Na antimikrobiálních a antifungálních vlastnostech se podílí obsah o-methoxycinnamaldehydu. Silice tlumí *in vitro* biosyntézu prozánětlivého prostaglandinu E<sub>2</sub> z beranního semene na 52 % již v koncentraci 37 μM/ l v porovnání se stejným testem bez inhibitoru biosyntézy<sup>94</sup>.



*trans*-cinnamaldehyd

kys. skořicová

#### 3.5.1.4 *Citri etheroleum*

Zdrojem silice je *Citrus limonum* L., citroník médský. Silice je čirá, světle žlutá až zelenožlutá kapalina nahořklé chuti a charakteristického zápachu<sup>94</sup>. Silice je mísitelná s 90% ethanolem v poměru 1:12, roztok vykazuje mírnou opalescenci. Mísitelná je také se sirouhlíkem a bezvodou kyselinou octovou<sup>50</sup>. Silice je tvořena téměř výhradně monoterpeny, přičemž 60-70 % kapalného podílu tvoří

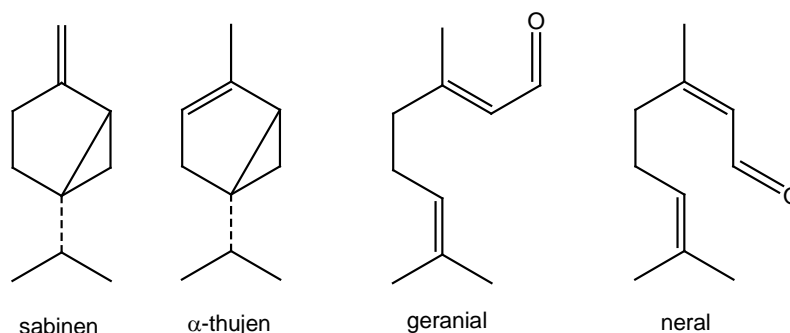
limonen. Ojedinele se koncentrace limonenu pohybuje níže (minimálně do 55 %) nebo výše (max. 75 %). Mimo jiné jsou přítomny i další monoterpenické složky: myrcen (1,2-1,7 %),  $\alpha$ -pinen (1,5-2,5 %),  $\beta$ -pinen (8-12 %), sabinen (1-2,5 %) a  $\gamma$ -terpinen (6-10 %). Koncentrace jiných monoterpenů je nižší než 1 %. Z nich je vhodné zmínit co do množství  $p$ -cymen,  $\alpha$ -terpinen, terpinolen a  $\alpha$ -thujen. Ze seskviterpenů jsou více zastoupeny *trans*- $\alpha$ -bergamoten (0,2-0,4 %),  $\beta$ -bisabolen (0,3-0,5 %) a  $\beta$ -karyofylen (0,1-0,3 %). Bylo zaznamenáno 8 dalších seskviterpenů v koncentraci do 1 %<sup>51</sup>.

Nositeli vůně silice jsou považovány monoterpenické aldehydy geranial (1-2 %) a neral (0,5-1 %), jejichž směs se nazývá citral<sup>52</sup>.

Rozbory hlavních komponent silic získaných z kůry plodu citroníku (43 míst původu) předpokládají 3 chemotypy: limonenový typ, limonen- $\beta$ -pinen- $\gamma$ -terpinenový typ a limonen-linalylacetát-linaloolový typ<sup>53</sup>.

Byl testován antimikrobiální účinek silice pomocí agarové difusní metody vůči 25 různým gram pozitivním a gram negativním bakteriím a 20 různým kmenům *Listeria monocytogenes*. K inhibici růstu inokul však došlo pouze u osmi druhů bakterií a u tří kmenů *Listeria*. Tímto byla účinnost silice vyhodnocena jako slabě antibakteriální<sup>54</sup>.

Hodnota MIC silice pro *E. coli* je 12,8 mg/ml, pro *S. aureus* činí 6,4 mg/ml<sup>55</sup>.



### 3.5.1.5 *Coriandri etheroleum*

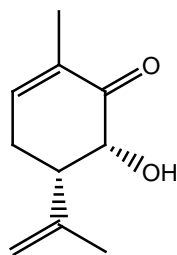
V závislosti na stádiu zrání plodů *Coriandrum sativum* L., koriandru setého se mění i složení silice.

V prvním stádiu převažují v silici monoterpenické estery reprezentované geranyl-acetátem (46,27 %) a monoterpenickými alkoholy (14,66 %), jejichž hlavním zástupcem je linalool (10,96 %). V malém množství jsou pak přítomny monoterpenické aldehydy, ethery, uhlovodíky, monoterpenické ketony, fenoly a seskviterpeny. Střední stádium zrání poskytuje silici značně odlišného chemického složení. 84,92 % detekovaných látek představují monoterpenické alkoholy (linalool 76,33 %), ketony (*cis*-hydroxykarvon 3,21 %), estery (geranyl-acetát 2,85 %) a ethery (anethol 1,41 %). Ostatní složky jsou zastoupeny v množství menším než 1 %. V silici získané z plodů *C. sativum* v konečném stádiu zrání převažují monoterpenické alkoholy a ketony. Fenoly představované jako silné antioxidanty byly nalezeny v množství (2,36 %) <sup>56</sup>.

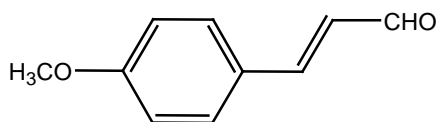
Linalool v přírodní koriandrové silici existuje převážně ve formě (+)-enantiomeru. V menší míře se vyskytuje jako (-)-linalool <sup>94</sup>.

Silice má světle žlutou barvu a obsahuje některé rozkladné produkty (terpineol, nerol a další) <sup>57</sup>. Její chuť je palčivá, nasládlá a aromatická.

Koriandrová silice není klastogenní, což znamená, že nezpůsobuje sice zlomy na chromozomech, avšak studie zaměřené na mutagenitu koření a extraktů vyvozují smíšené závěry (linalool mutagenní není). Silice působí antimikrobiálně proti širokému spektru bakterií. Iritiční vlastnosti silice se projevily u králíků, nikoliv u lidí. Nejedná se o senzitizer, ačkoliv celá rostlina jím může být <sup>58</sup>.



*cis*-hydroxykarvon



anethol

### 3.5.1.6 *Eucalypti etheroleum*

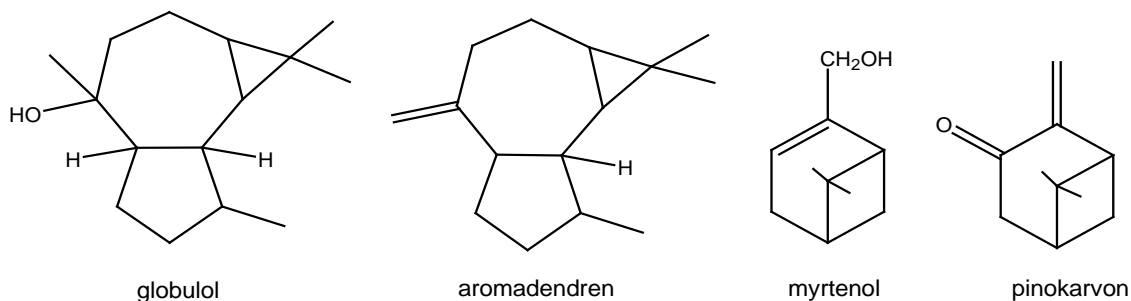
Silice se získává s listů stromu *Eucalyptus globulus* Labill., blahovičnicku kulatoplodého. Listy obsahují 1-3 % silice v závislosti na oblasti původu<sup>59</sup>.

Silice je velmi špatně rozpustná ve vodě, 1 díl je rozpustný v 5 dílech 70% ethanolu. Mísitelná je s 90% ethanolem, bezvodým ethanolem, oleji, tuky a parafíny. Voní aromaticky, kafrovitě, chutná zpočátku palčivě a kafrovitě, později chladivě. Jedná se o bezbarvou či slabě žlutě zbarvenou kapalinu<sup>94</sup>.

Přírodní silice obsahuje 45-75 % 1,8-cineolu. Navíc jsou popsány další minoritní složky jako myrtenol,  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen, pinokarvon,  $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -felandren, některé aldehydy a seskviterpeny (alloaromadendren, aromadendren, globulol a  $\alpha$ -grujunen). Dle Evropského lékopisu musí být v silici přítomno méně než 1,5 % felandrenu, méně než 0,1 % kafru a nejméně 70 % 1,8-cineolu<sup>60</sup>.

V každé komerčně produkované silici typu *E. globulus* jsou metodou kapilární plynové chromatografie či s využitím hmotnostní spektrofotometrie jako hlavní složky nalezeny: 1,8-cineol (eukalyptol) (86,8 %), *p*-cymen (2,7 %),  $\alpha$ -pinen (2,6 %), limonen (0,5 %), geraniol a kamfen<sup>94</sup>.

Byla stanovena MIC proti grampozitivním bakteriím. Pro *S. aureus* a *Enterococcus* spp. činí 2 % (v/v). Inhibiční nebo baktericidní účinek silice vůči *E. coli* je diskutabilní<sup>61</sup>. 1,8-cineol omezuje tvorbu prozánětlivých derivátů kyseliny arachidonové a cytokinů v několika *in vivo* a *ex vivo* studiích<sup>62</sup>.



### 3.5.1.7 *Geranii etheroleum*

Získává se z *Pelargonium graveolens* L'Her., pelargónie vonné. Silice má jemnou, květinovou, růže připomínající vůni. Barva silice je tmavě zelená, hnědá nebo hnědožlutá<sup>63</sup>.

Ve studii Prabuseenivasanova týmu vykazovala antibakteriální účinek při koncentraci vyšší než 12,8 mg/ml pro *S. aureus*. Pro *E. coli* byla hodnota MIC vyšší než 6,4 mg/ml. Její antibakteriální účinek je tak slabší, než u silice skořicovníku ceylonského nebo hřebíčkovce vonného<sup>55</sup>.

Byl sledován vliv přípravku s obsahem nati dříšťálu (*Berberidis herba*) a pelargónie (*Geranii herba*) na různých diarrhoidních modelech myší a zároveň kontrakce izolovaného střevního hladkého svalu morčete. S nimi se po té porovnaly přípravky s obsahem kreosotu<sup>\*)</sup> a loperamidu. Všechny čtyři uvedené látky výrazně tlumily průjem vyvolaný ricinovým olejem nebo chloridem barnatým, ale nikoli průjem způsobený pilokarpinem nebo serotoninem. *Berberidis herba* a *Geranii herba* zmírnily kontrakce tenkého i tlustého střeva vyvolané acetylcholinem, barnatými kationy nebo elektickou stimulací, a to v koncentraci  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  g/ml. U kontrakcí střeva způsobených elektrickými impulzy byl účinek kreosotu 100x silnější než u kontrakcí vyvolaných acetylcholinem nebo barnatými ionty. Účinnost loperamidu se projevila nejvíce u kontrakcí vyvolaných el. impulzem, dále u kontrakcí způsobených barnatými ionty. U acetylcholinu se projevil antiperistaltický účinek loperamidu nejméně. Takové výsledky předpokládají u *Berberidis herba* a *Geranii herba* antidiarrhoický účinek a jejich uplatnění při zvýšené střevní peristaltice. Mechanismus účinku se může lišit od mechanismu účinku loperamidu a kreosotu<sup>64</sup>.

<sup>\*)</sup> Pozn.: Kreosot je název používaný pro škálu produktů dělících se na dřevný kreosot a kreosot z uhelného dehtu. Dřevný kreosot se získává vysokoteplotním zpracováním bukového nebo jiného dřeva, anebo z pryskyřice keře *Larrea tridentata* („kreosotový keř“). Dřevný kreosot je bezbarvá až nažloutlá viskózní kapalina kouřového zápachu a spálené chuti. Na rozdíl od vzhledu a chuti je chemické složení zcela odlišné od kreosotu z uhelného dehtu. Dřevný kreosot se skládá z guajakolu, kreosolu, o-kresolu a 4-ethylguajakolu, z rostlinných fenolů, nikoli z petrochemikálií. Populární japonský protiprůjmový lék



obsahuje jako hlavní složku 133 mg dřevného kreosotu (z bukového, javorového nebo dubového dřeva) v jedné dávce pro dospělého.

### 3.5.1.8 *Lavandulae etheroleum*

Levandulovou silici poskytuje bylina *Lavandula angustifolia* Mill., levandule úzkolistá. Barva silice může být světle žlutá, žlutozelená, ale i téměř bezbarvá. Voní po levandulových květech a je štiplavé, silně hořké chuti.

60-65 % (ojediněle až 75 %) silice tvoří monoterpenický alkohol R-(-)-linalool (20-50 %) a jeho ester s kyselinou octovou R-(-)-linalyl-acetát (30-40 %). Údaje o koncentracích těchto dvou látek v silici se v literatuře značně liší. Dále lze podle zpracovaných dat v literatuře uvést jiné obsahové látky: *cis*-ocimen (3-7 %), terpinen-4-ol (3-5 %) a  $\beta$ -karyofylen, lavandulyl-acetát (2-3 %), 1,8-cineol (1-2 %), limonen (cca 1 %), geraniol, lavandulol,  $\alpha$ -pinen, kamfen (0,1-0,5 %), geranyl-acetát a neryl-acetát. Z neterpenických alifatických látek je přítomný oktan-3-on (do 3 %), okt-1-en-3-ol (0,5-1 %) a dále okt-1-en-3-yl-acetát a oktan-3-ol<sup>94</sup>.

V jedné indické studii se levandulová silice jevila jako antimikrobiálně neúčinná. Byla provedena disková difusní metoda, kdy při koncentraci silice 1:1, 1:5, 1:10 a 1:20 nezpůsobila inhibici růstu *S. aureus* a *E. coli*<sup>65</sup>.

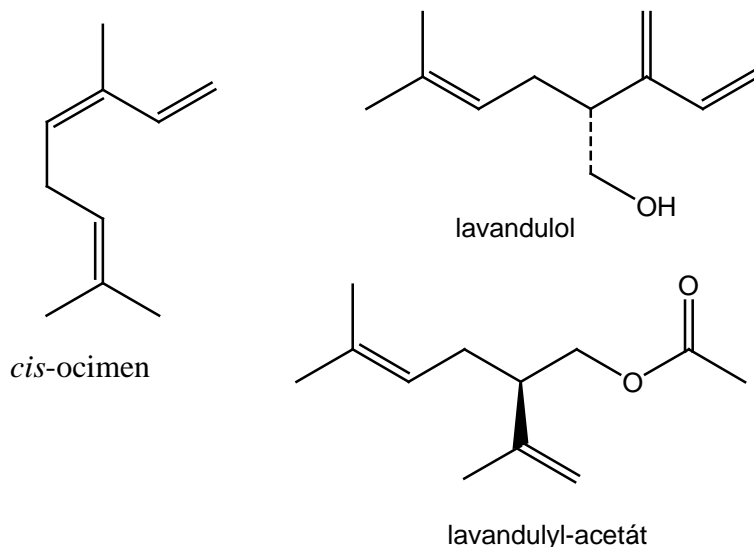
Navzdory známým antibakteriálním účinkům silice zůstává otázka jejího využití v lékařství. Hodnoty MIC se u silice *L. angustifolia* a *L. latifolia* shodovaly s hodnotami MIC u *Melaleuca etheroleum* (tea tree oil) (0,32 % (w/v) pro *S. aureus* a více než 0,32 % (w/v) pro *E. coli*)<sup>65</sup>.

Je zajímavé, že perorálním podáním silice nebo složek nejvíce v ní zastoupených (linalool, linalyl-acetát) lze ochránit zvířata před akutním vznikem žaludečních vředů vyvolaných ethanolem<sup>66</sup>.

Celosvětově probíhá rozsáhlý výzkum, jehož úkolem je izolovat a určit chemické složky silice, což by následně umožnilo identifikovat biologicky aktivní složky a determinovat jakékoliv synergické vlivy komponent vzájemně smíšených. Uvádí se, že antimikrobiální aktivita u různých druhů levandule se nepřisuzuje vždy majoritně zastoupeným složkám v silicích. Podle studie, která se zabývá vztahem mezi biologickou aktivitou a chemickými složkami levandule,

nebyl nalezen žádný vzájemný vztah mezi obsahem linaloolu či linalyl-acetátu a antibakteriálním nebo antifungálním účinkem<sup>54</sup>.

V jiné kontrolované studii byly testovány *in vitro* spasmolytické účinky silice na modelech tenkého střeva morčete a krysí dělohy. V obou případech se u hladkého svalstva potvrdil relaxační účinek. V návaznosti na mechanismus se dá říci, že účinek je zprostředkován postsynapticky pomocí cAMP<sup>67</sup>.



### 3.5.1.9 *Melaleuca etheroleum* (Tea tree oil – TTO)

Světle žlutá kapalina s příjemnou terpenickou vůní má nádech muškátového aroma a je produktem keře *Melaleuca alternifolia* Cheel, kajeputu střídavolistého. Ve vodě je prakticky nerozpustná, s 96% ethanolem, mastnými oleji a tekutým parafinem je mísitelná<sup>68</sup>.

Silice obsahuje kolem 100 terpenů, z nichž doposud bylo určeno 60. U silice terpinen-4-olového typu byly následujícími výzkumy odhaleny: terpinen-4-ol (40,1 %),  $\gamma$ -terpinen (10,4 %), 1,8-cineol (5,1 %), terpinolen (3,1 %), *p*-cymen (2,9 %),  $\alpha$ -pinen (2,6 %),  $\alpha$ -terpineol (2,4 %),  $\delta$ -kadinen (1,3 %), limonen (1,0 %) a viridifloren (1,0 %)<sup>69</sup>.

Vzhledem k lipofilní vlastnosti silice penetruje membránami a působí baktericidně a fungicidně. Byla testována *in vitro* proti různým mikroorganismům. V rámci různých studií byla hodnota MIC pro *E. coli* 0,25 % a proti *S. aureus* 0,5 %.<sup>70,71,72</sup> Hodnotila se účinnost 1,8-cineolu (MIC-hodnoty 0,5 %, 0,25 %, 1,0 %), linaloolu, terpinen-4-olu a  $\alpha$ -terpineolu (0,25 %, 0,06 %)

vůči *S. aureus*, *E. coli* a *Candida albicans*<sup>73,74</sup>. V dalším pokusu byla za použití stejné metodiky stanovena účinnost proti *S. aureus* a *Staphylococcus epidermidis* v následujícím pořadí:  $\alpha$ -terpineol < terpinen-4-ol <  $\alpha$ -pinen<sup>75</sup>.

Vědci odhalili, že expozice nízkým dávkám silice činí patogeny jako jsou MRSA, *E. coli* a *Salmonella* odolnější vůči antibiotikům a zvyšuje se schopnost způsobit mnohem vážnější infekce. Ačkoli může být TTO účinným antimikrobiálním agens, pokud je použit v náležitě vysokých koncentracích, jeho aplikace v subletálních koncentracích se může podílet na rozvoji antibiotické rezistence u humánních patogenů<sup>76</sup>. Interakce s hydrofobními strukturami bakterií hrají klíčovou úlohu v antimikrobiálním účinku uhlovodíků<sup>77</sup>.

*S. aureus* byl vlivem TTO a jeho složek usmrcen ve stacionární fázi růstu. Organismy v této fázi růstu jsou obvykle méně citlivé ke zničení než ve fázi exponenciální<sup>78</sup>, což se projevilo u *E. coli*. Ačkoli antimikrobiální agens, která působí na buněčné syntetické pochody, mají často malý vliv na mikroorganismy ve fázi stacionárního růstu<sup>79,80</sup>, výsledky naznačují, že hlavním cílem TTO není syntetický proces na makromolekulární úrovni<sup>81</sup>.

Případná neúčinnost TTO a jeho složek v oblasti lýzy *S. aureus* naznačuje, že primárním mechanismem účinku není hrubé zničení buněčné stěny. Lýza je nakonec vyvolána uvolněním autolytických enzymů z buněčné stěny vázaných na membránu vlivem TTO. To by mohlo vysvětlovat opožděnou lýzu *S. aureus* pozorovanou ještě při dodatečném přezkoumání suspenzí *S. aureus* po několika hodinách. Buňky, na které silice působila jen 30 vteřin, byly k lýze neúměrně citlivé. Zatímco za tento efekt mohla být zodpovědná aktivace autolytických enzymů, mohla být lýza způsobená i zeslabením buněčné stěny a následně rupturou cytoplazmatické stěny vlivem osmotického tlaku (spíše než specifickým účinkem na cytoplazmatickou membránu)<sup>82</sup>. Únik značného množství cytoplazmy se považuje za znamení hrubého a nevratného zničení cytoplazmatické membrány<sup>83</sup>.

U bakterií, které přežily, se objevila výrazně snížená schopnost tvořit kolonie na agarové plotně s obsahem chloridu sodného (NaCl). Tento jev byl nejvýraznější po působení 1,8-cineolu, který jako jediný ze složek TTO dokázal při poloviční MIC navodit výraznou ztrátu tolerance k soli u *S. aureus*. Původní

domněnka byla, že TTO a jeho složky působí na membránu. Zvýšená citlivost k NaCl, tvorba mesozomů a únik cytoplazmy nasvědčovaly ztrátě cytoplazmatické membrány. Na tuto myšlenku navázala práce, která doložila, že při podání TTO se u *E. coli* a *S. aureus* vyvolala ztráta draselných iontů, zastavila se respirace buněk a byl podpořen uptake propidium iodidu<sup>84</sup>.

Nelze však vyloučit možnost existence jiného mechanismu účinku. Na antimikrobiální aktivitě silice by se mohla podílet doposud neobjevená složka s jiným mechanismem účinku. Vzhledem k heterogennímu složení silice a antimikrobiálním účinkům jejich složek je nepravděpodobné, že existuje pouze jediný MÚ nebo že za antibakteriální působení silice je zodpovědná pouze jedna obsahová látka. Pro plné pochopení mechanismu je zapotřebí provést další studie.

Terpinen-4-ol a TTO byly aktivní proti kmenům odolným k mupirocinu, kyselině fusidové, vankomycinu, methycilinu a linezolidu. Frekvence mutací byla menší než  $2,9 \cdot 10^9$ <sup>85</sup>. U *E. coli* byly rovněž pozorovány destrukční účinky v oblasti homeostázy draselných iontů<sup>86</sup>, respirace, morfologie a schopnosti vylučovat propidium iodid.

Jiná studie potvrdila opět stejný efekt silice na zástupce grampozitivních a gramnegativních bakteriálních kmenů. U *E. coli* se v porovnání se *S. aureus* při léčbě TTO objevila lýza (u *S. aureus* celková lýza buňky nenastala). To vše doložilo vliv TTO na strukturní a funkční integritu bakteriálních membrán. Při studiu účinku terpinen-4-olu a 1,8-cineolu u *S. aureus* nevyvolala žádná z látek autolýzu, ale u všech byl zjištěn únik cytoplazmy a vyšší citlivost buněk k NaCl. Zajímavé je, že účinek byl pozorován u 1,8-cineolu často považovaného za slabou, okrajovou složku silice v rámci antimikrobiálního působení. Nabízí se tedy možnost, že i kdyby 1,8-cineol nebyl jednou z primárních antimikrobiálních složek, jeho úkolem by bylo zvýšit propustnost bakteriální membrány a tím usnadnit přístup jiným aktivnějším složkám. Byla provedena krátká studie se zaměřením na TTO a jeho vliv na buněčnou morfologii. Elektronová mikroskopie odhalila u *S. aureus* po podání terpinen-4-olu stejné morfologické nálezy, které se vyskytovaly i při aplikaci TTO, včetně tvorby struktur podobných mesozomům<sup>87</sup>.

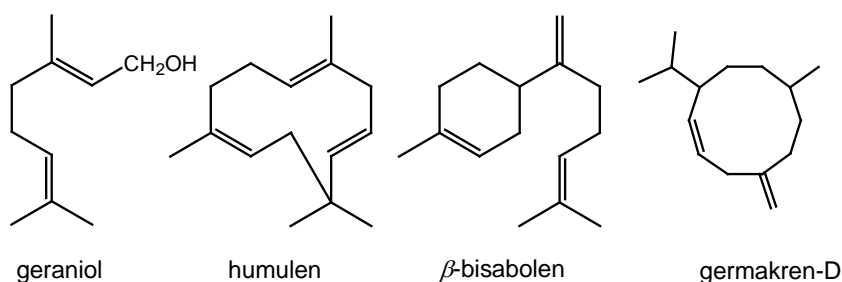
### 3.5.1.10 *Origanum etheroleum*

Silice se získává z *Origanum vulgare* L., dobromysli obecné. Rostlina je bohatá na fenolické monoterpeny, hlavně na karvakrol, obsah thymolu je nízký. Rovněž jsou přítomny dvě skupiny látek kvantitativně menšího významu: acyklické monoterpeny jako geraniol, geranyl-acetát, linalool, linalyl-acetát a  $\beta$ -myrcen a látky bornanového typu jako kamfen, kafr, borneol, bornyl- a isobornyl-acetát. Do skupiny seskviterpenických látek lze zařadit  $\beta$ -karyofylen,  $\beta$ -bisabolen,  $\beta$ -bourbonen, germakren-D, bicyklogermakren,  $\alpha$ -humulen,  $\alpha$ -muurolen,  $\gamma$ -muurolen,  $\gamma$ -kadinen, alloaromadendren,  $\alpha$ -kubeben,  $\alpha$ -kopaen,  $\alpha$ -kadinol,  $\beta$ -karyofylenoxid a germakren-D-4-ol<sup>95</sup>.

V současné době je zakázáno přidávat *Origanum herba* jako aktivní látku do krmiv zvířatům v rámci EU. Rovněž neexistují žádné zkušenosti s podáváním nati u březích a laktujících samic<sup>92</sup>.

Silice samotná voní silně aromaticky a chutná kořenitě až hořce, je bohatá na fenolické látky. Kromě vysokého podílu karvakrolu (40-70 %) obsahuje také  $\gamma$ -terpinen (8-10 %), *p*-cymen (5-10 %),  $\alpha$ -pinen (1-3 %), myrcen (1-3 %),  $\alpha$ -terpinen (1-2 %) a thymol (1-4 %). V koncentracích nižších než 1 % (v/v) se v silici nacházejí kamfen,  $\beta$ -pinen, limonen, 1,8-cineol, 1-okten-3-ol, kafr, linalool, terpinen-4-ol,  $\beta$ -karyofylen,  $\alpha$ -terpineol, borneol a bornyl-acetát<sup>94</sup>.

Na základě širokospektré antibakteriální aktivity je *O. vulgare* jedním z nejúčinnějších testovaných rostlinných inhibitorů. *O. vulgare* australského původu se ukázala jako velmi silné antibakteriální agens, které výrazně potlačuje růst jak *E. coli*, tak *S. aureus*, ale i jiných původců střevních chorob (*Salmonella enterica*, *Streptococcus faecalis*). MIC dobromyslové silice byla 0,12 % (v/v). Lihový extrakt listů má antioxidační vlastnosti, jak prokázala metoda s použitím železných iontů *in vitro*<sup>88</sup>.



### 3.5.1.11 *Terebinthinae etheroleum rectificatum*

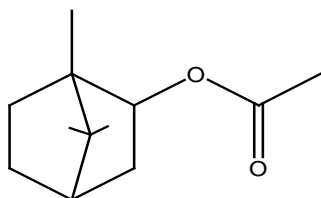
Čištěná terpentýnová silice je produktem získaným destilací oleopryskyřice z několika druhů borovic, zejména *Pinus nigra* Arn., *Pinus silvestris* L., *Pinus palustris* Mill., *Pinus pinaster* Sol. nebo *Pinus halepensis* Mill. Odstranění nepříjemného pachu a chuti silice se dosahuje její rektifikací.

Terpentýnová silice z *Pinus palustris* se skládá z 95 % z  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinenu v poměru 2:1. Zbylých 5 % sestává z monoterpenů, především z  $\delta^3$ -karenu, limonenu a terpinolenu a z terpenických acidorezistentních sloučenin (např. bornyl-acetát)<sup>94</sup>. Terpentýn je neomezeně mísitelný s bezvodým a 90% ethanolem, diethyletherem, chloroformem, petroletherem, tekutým parafínem a mastnými oleji. Chuť je ostrá, vyvolávající pocit škrábání v hrdle. Silice voní charakteristicky a jedná se o čistou, bezbarvou kapalinu<sup>89</sup>.

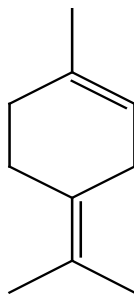
Využití této čištěné silice je ve veterinární medicíně omezeno především na vnější topickou aplikaci. U jatečných zvířat se používá v lékových formách tekutého a pouhého charakteru v koncentracích od 20 do 50 % pro dermální aplikaci. Lze se také setkat s použitím silice jako rubefaciens.

Při léčbě mastitid, flegmón, tendinitid a revmatických potíží u hovězího dobytka se používá tato látka ve formě masti s 5% koncentrací. Denní dávka činí 500-1500 mg ve třech dílčích dávkách. Maso a mléko zvířat léčených takovým způsobem vykazuje silné aroma po silici. Příčinou je vysoká liposolubilita terpenů, které mohou přecházet i přes hematoencefalickou bariéru.

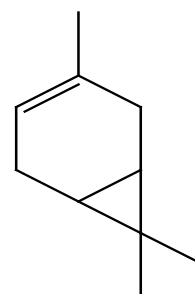
Pomocí diluční bujonové metody a difuzního agarového testu byla potvrzena antimikrobiální aktivita terpentýnu proti *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp. a *Vibrio cholerae*<sup>90</sup>.



bornyl-acetát



terpinolen



$\delta^3$ -karen

### 3.5.1.12 *Thymi extractum fluidum et Thymi etheroleum* (red x white)

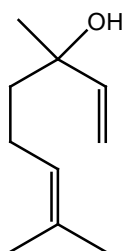
Matečnou rostlinou extraktu a silice je *Thymus vulgaris* L., mateřídouška tymián (tymián obecný). Nať této rostliny obsahuje kolem 2,5 % silice, ale ne méně než 1 %. Jejich obsah kolísá v závislosti na uvažovaném chemotypu. Základními složkami jsou tymol a karvakrol (až 64 % podílu silice) společně především s linalolem, *p*-cymolem,  $\alpha$ -pinenem, flavonoidy luteolinem a glykosidy-6-hydroxyluteolinu. Rovněž jsou přítomny di-, tri- a tetramethoxyderiváty flavonů<sup>94</sup>. Dalšími obsahovými látkami jsou kyselina kávová a rosmarinová<sup>91</sup>. Použití nati jako aktivní složky krmiva v hospodářských chovech je v rámci Evropské unie zakázané. Dovoleno je používat jen silici<sup>92</sup>.

Existují dvě varianty silice, červená a bílá, přičemž bílá je destilačním produktem silice červené, která se purifikuje za účelem odstranění toxických fenolů<sup>93</sup>. Chuť silice je palčivě ostrá, voní silně po tymolu a jeví se jako čirá, žlutá až žlutohnědá nebo červenohnědá kapalina. Hlavními složkami jsou karvakrol (1-5 %) a tymol (30-50 %). Kritériem kvality je celkový obsah fenolů. Terpenické fenoly bývají provázeny jejich dvěma prekurzory *p*-cymenem (15-20 %) a  $\gamma$ -terpinenem (5-10 %), často také fenolickými ethery karvakrolmethyletherem a tymolmethyletherem (0,5-1,5 %). Monoterpeny (1-3 %) zahrnují borneol, kafr, myrcen, limonen, linalool,  $\beta$ -pinen, *cis*-sabinenhydrát a  $\alpha$ -terpinen. V koncentracích pod 1 % se nacházejí bornyl-acetát, kamfen, 1,8-cineol (eukalyptol), *p*-cymen-8-ol, linalyl-acetát, *cis*-myrcen-8-ol, terpineol, terpinen-4-ol, terpinolen a terpinyl-acetát. Dále jsou popsány různé seskviterpenické látky, z nichž nejvýznamnější je  $\beta$ -karyofylen (1-3%)<sup>94</sup>.

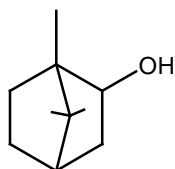
Studie *in vivo* a *in vitro* potvrzují antibakteriální (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a další) a antifungální (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Saprolegnia* spp., *Zygorhynchus* spp.) účinek silice. Inhibuje biosyntézu prozánětlivých prostaglandinů<sup>95</sup>. Spasmolytická aktivita přípravků z tymiánu *in vitro* je dle expertů způsobena přítomností polymethoxyflavonů<sup>96</sup>. Flavony tymiánu působí jako muskulotropní látky s přímým účinkem na hladké svalstvo neboť jsou nekompetitivními a nespecifickými antagonisty vápníkových kanálů, zároveň však tlumí odpovědi

agonistů specifických receptorů buněk hladkého svalstva, jako je acetylcholin, histamin a L-norepinefrin<sup>97</sup>.

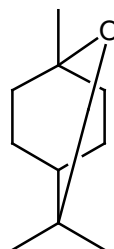
### Monoterpenické alkoholy



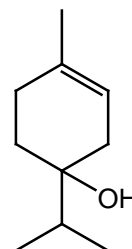
linalool



borneol

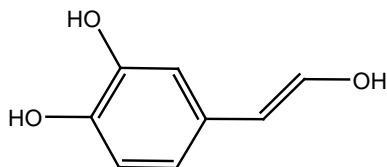


1,8-cineol

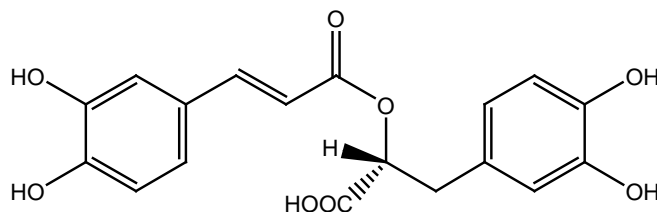


terpinen-4-ol

### Aromatické kyseliny

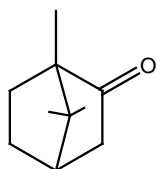


kyselina kávová

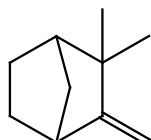


kyselina rosmarinová

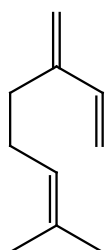
### Monoterpeny



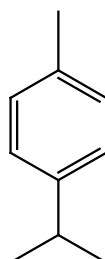
kafr



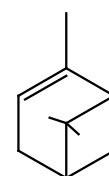
kamfen



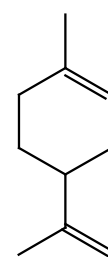
myrcen



p-cymen

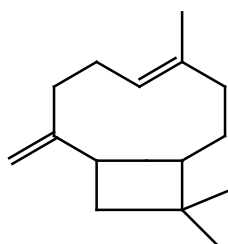


α-pinen



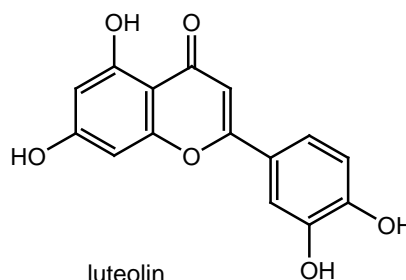
limonen

### Seskviterpeny



β -karyofylen

### Flavonoidy



luteolin



## 3.5.2 EXTRAKTY

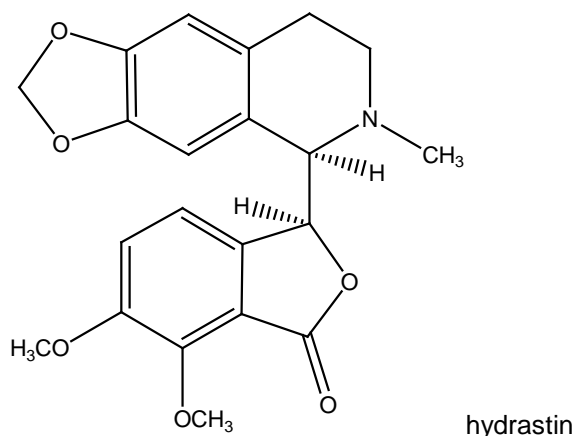
### 3.5.2.1 *Hydrastidis canadensis extractum siccum*

Zdrojem extraktu je kořen resp. oddenky *Hydrastis canadensis* L., vodilky kanadské. Obsah alkaloidů kolísá mezi 2,4-7,0 %<sup>98,99</sup>. Hlavní kořeny jsou na alkaloidy chudší. Hlavními obsahovými látkami jsou berberin (2,5–4,5 % v oddencích a do 2,66 % v kořeni) a (-)-hydrastin<sup>98,99</sup>. Hydrastin představuje alkaloid vzhledu bílých lesklých krystalků téměř nerozpustných ve vodě, lehce v ethanolu, etheru a chloroformu<sup>100</sup>. Z protoberberinů lze jmenovat (-)-kanadin (kolem 0,5 %) <sup>101</sup>, (+)-berberastin (2-3 %) <sup>102</sup>, (-)-korypalmin, (-)-isokorypalmin. Dále jsou přítomny ftalylisochinolony: hydrastidin, isohydrastidin<sup>103</sup> a benzyloisochinolin s (+)-kanadalinem<sup>104</sup>. Oxidativním odbouráním hydrastinu vzniká isochinolin, hydrastinin a mekonin<sup>94,105</sup>.

Byla hodnocena antibakteriální aktivita extraktu vodilky a izolovaných alkaloidů přítomných ve větším množství (berberin,  $\beta$ -hydrastin, kanadin a kanadalin) vůči šesti kmenům mikroorganismů, mezi nimiž figurovaly i *S. aureus* (ATCC 259993 a ATCC 6538P) a *E. coli* (ATCC 25922). Výsledky poskytly racionální podklad, který vysvětloval používání vodilky v tradičním léčitelství<sup>106</sup>.

Extrakt i odvar z vodilky vykazují znatelný antimikrobiální účinek proti bakteriím, virům, houbám (plísním), prvokům, helmintům a chlamydiím. V současnosti převažuje klinické využití berberinu u průjmů bakteriálního původu, u infekcí střevními parazity a při zánětu spojivek<sup>107</sup>.

Je účinným tonikem při léčbě trávicích problémů. S úspěchem se používá u chronických zánětů tenkého a tlustého střeva. Jemný prášek z kořene má silnou léčivou schopnost u dyspepsie, při žaludečních potížích (zánět žaludeční sliznice), při nechutenství, jaterních onemocnění, zácpě, nevolnosti a vomitu. Berberin působí spasmolyticky a cholagogně. Kromě sedativně-relaxačního účinku vykazuje také protizánětlivý, baktericidní a fungicidní účinek. Využití našel při léčbě malárie a cholery. Spasmolytický účinek vychází z kvarterního dusíku v bicyklické struktuře molekuly<sup>108</sup>.



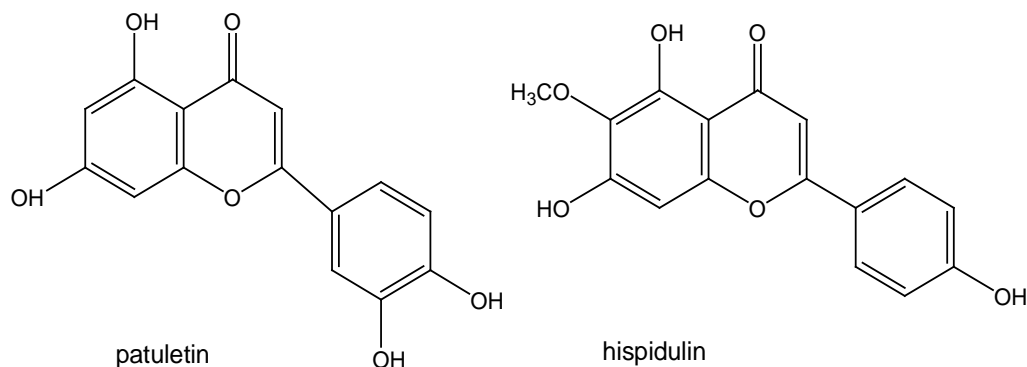
### 3.5.2.2 *Leuzeae extractum fluidum*

Zdrojem extraktu byly sušené kořeny *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC, parcha saflorovitá. Obsahovými látkami rostliny jsou mono- a polysacharidy (inulin), organické kyseliny, saponiny, vitamíny, polyacetyleny, ekdysteroidy, kaučuk, fenolkarboxylové kyseliny a jejich deriváty, lignin, katechiny, taniny, chinony, silice, kumariny, flavonoidy, anthocyany, mastné oleje, vosky, tuky, stejně jako gummy, kyselina citronová a fosfáty, mikro- a makroprvky<sup>109</sup>.

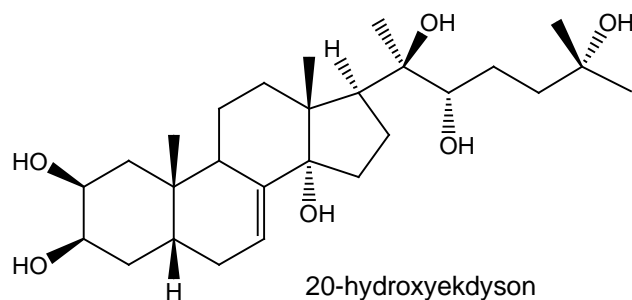
Při výzkumu antioxidačních vlastností parchy byly objeveny tyto zástupci, z nichž některé jeví vysokou schopnost zastávat funkci vychytávačů volných radikálů. Jednalo se o 4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavon (hispidulin), 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanon (eriodiktyol), 3',4',5,7-pentahydroxy-6-methoxyflavonol (patuletin), eriodiktyol-7- $\beta$ -glukopyranosid, 6-hydroxykemferol-7-O-(6''-O-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosid), 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu (protokatechovou)<sup>110</sup>.

Nejdůležitější skupinu sloučenin v rostlině však zastupují fytoekdysteroidy (5- $\beta$ -cholest-6-on-7-en deriváty), z nichž největší podíl tvoří 20-hydroxyekdyson. Obtížně se rozpouští ve vodě. Obsah v kořenech je vyšší (0,12-0,20 %) než v listech (0,006-0,1 %). Rostlina rovněž poskytuje širokou řadu minoritních ekdysteroidů (integristeron, polypodin B, rapisteron, inokosteron a jejich deriváty). Bohaté spektrum ekdysteroidních forem souvisí s tvorbou konjugátů se sekundárními metabolickými produkty, anorganickými (sulfáty, fosfáty) a organickými kyselinami (acetáty, benzoáty, cinnamáty), cukry, atd<sup>111, 112</sup>. Teoreticky jsou tedy možné jakékoli kombinace těchto

ekdysteriodních derivátů za vzniku tisíců různých molekul, které jsou příčinou jedinečné biologické aktivity surových extraktů<sup>113</sup>.



Izolace fytoekdysteroidů se provádí běžně biologickými technologiemi, neboť i když teoreticky tyto látky lze syntetizovat, jednalo by se v realitě o velmi nákladnou výrobu. Jelikož je rostlina zdrojem látek s vysokou proteosyntetickou a imunostimulační aktivitou, lze uvažovat o objevu dalších nových a relativně levných farmakologických preparátů. Pokud se například zaměříme na farmakologické účinky 20-hydroxyekdysonu, překvapí nás široké spektrum účinků.



- zvyšuje proteosyntézu stimulací syntézy RNA v hepatocytech,
- aktivuje syntézu buněčné membrány, fosfatasy a malátdehydrogenasy podílející se na tvorbě buněčné energie,
- eliminuje experimentální arytmií a zlepšuje srdeční kontraktilitu během koronární arteriální okluze u zvířat,

- chrání jaderný chromatin hepatocytů proti volným radikálům vzniklých tetrachlormethanem u pokusných zvířat, čímž prokazatelně vzrostla možnost přežití,
- má imunomodulační účinek na lymfocyty vzniklé ve slezině, vykazuje proteosyntetickou aktivitu a tím napomáhá růstu svalové hmoty, přičemž
- nenarušuje funkci androgenů oproti velmi dobře známým anabolickým steroidům,
- vykazuje protektivní účinek u experimentálně navozené aterosklerózy králíků,
- zvyšuje zdatnost a pohyblivost spermií in vitro, urychluje sexuální dospívání a první těhotenství u samic<sup>114</sup>.

Parcha poskytuje velmi hodnotný materiál ke zkrmení zvířatům. Seno z čerstvé i sušené byliny zvyšuje produkci mléka u krav<sup>115</sup>. Dieta s obsahem 10 % parchy v krmné dávce zvýšila tělesnou hmotnost zvířat, vedla k rozvoji jistých vnitřních orgánů a ovlivňovala chování u různých experimentálních druhů zvířat<sup>116</sup>.

Zástupci rodu *Leuzea* se staly rovněž předmětem zájmu studií, jejichž cílem bylo potvrdit antimikrobiální účinek silice, popř. stanovit MIC. Navzdory mnoha publikacím, které se zabývají biologickou aktivitou izolovaných látek parchy, existuje jen velmi málo informací o jejich antimikrobiální aktivitě. Tu potvrdila práce českých vědců, kteří zkoušeli účinnost ethanolického extraktu kořene *L. carthamoides*. Vykazoval antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus* (62,5 mg sušiny/ml), avšak u *E. coli* nebyl antimikrobiální efekt potvrzen<sup>117</sup>.

U jiného druhu parchy (*L. acaule* DC) bylo zkoumáno složení a účinky silice získané ze dvou částí rostliny. Silice získaná parní destilací květních úborů obsahovala zejména methyleugenol (11,4 %), farnesyl-acetát (5,8 %), epi-13-manool (11,1 %) a fytol (5,8 %). Zbytek nadzemní části rostliny poskytuje pak silici s hlavním obsahem eugenolu (3,4 %), methyleugenolu (10,6 %),  $\beta$ -iononu (5,2 %),  $\beta$ -bisabololu (4,8 %), oktadekan-1-olu (5,1 %) a epi-13-manoolu (13,1 %), který hraje roli prekurzoru v syntéze (+)-agelasinu<sup>118</sup>.

Obě silice byly účinné proti  $G^+$  a  $G^-$  kokům (kromě *P. aeruginosa*), avšak silice z květních úborů byla vůči *S. aureus* a *Salmonella typhimurium* účinnější, což bylo prokázáno větším rozměrem inhibičních růstových zón

během kultivace. Takový výsledek může být daný vysokou koncentrací aromatických látek (22,5-23,6 %) nacházejících se v obou typech silice. Zejména chavikol, methyleugenol a eugenol mají důležitý antibakteriální význam. Roli zde hraje i přítomnost oktadekan-1-olu, neboť frakce bohaté na alifatické alkoholy s dlouhým řetězcem a aldehydy jsou částečně účinné proti G<sup>+</sup> bakteriím<sup>119</sup>.

Antibakteriální vliv silice u *L. acaule* souvisí i s přítomností vysokého podílu kyslíkatých seskviterpenů.  $\alpha$ - a  $\beta$ -bisabolol,  $\beta$ -ionon, farnesyl-acetát a farnesol jsou účinné proti G<sup>+</sup> bakteriím, plísním a dermatofytům. Mezi  $\alpha$ -bisabololem a eugenolem nebo metholem či oktan-3-olem byl prokázán synergismus<sup>120</sup>.

Složky minoritně zastoupené (viridiflorol, linalool, *t*-kadinol) hrají také důležitou roli a někdy dokonce větší než hlavní složky v silici<sup>121</sup>.

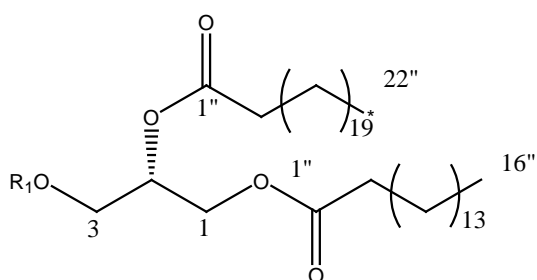
### 3.5.2.3 *Ocimi extractum fluidum*

Zdrojem extraktu je *Ocimum sanctum* L., bazalka posvátná. Byly izolovány tři nové složky extraktu listů *O. sanctum*, ocimumosidy A, B a ocimarin, společně s osmi již známými látkami (apigenin, apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukopyranosid, apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukuronová kyselina, 6"-methylester apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukuronové kyseliny, 6"-methylester luteolin 7-O- $\beta$ -D-glukuronové kyseliny, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glukopyranosid, luteolin-5-O- $\beta$ -D-glukopyranosid a 4-allyl-1-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl-2-hydroxybenzen a dva nové cerebrosidy. Tyto látky byly zkoumány za účelem potvrdit jejich adaptogenní účinek. Fenolické složky rovněž získané z listů *O. sanctum*, zahrnují ještě deriváty kyseliny hydroxyskořicové, kyseliny benzoové, flavonoidů a jejich glykosidů<sup>122</sup>.

Silice (méně než 1 %) je tvořena mnoha složkami. Nejvýznamnějšími vonnými komponentami jsou 1,8-cineol, linalool, citral, methylchavikol (estragol), eugenol (1-hydroxy-2-methoxy-4-allylbenzen) a methyl-cinnamát. Dále mohou být v různém množství zastoupeny a silně ovlivňovat aroma monoterpeny (ocimen, geraniol, kafr), seskviterpeny (bisabolen, karyofylen) a fenylypropanoidy (methyleugenol). Nejen mezi druhy bazalek, ale i mezi rody lze

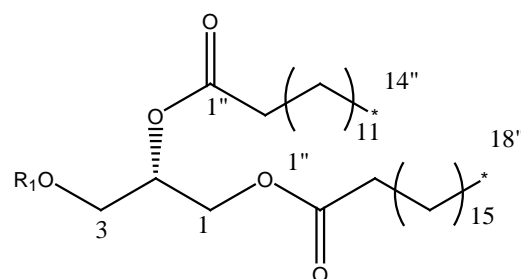
nalézt rozdíly v chemickém složení silic. Jejich skladbu a množství ovlivňují podnebí, půda a doba sklizně. Africké druhy bazalek často obsahují kafr<sup>123</sup>.

Mnohé studie prokázaly imunostimulační a adaptogenní účinek extraktu z listů. Vodný extrakt potlačuje kontrakce hladkého svalstva vyvolané acetylcholinem, karchacholem či histaminem. Velká dávka extraktu inhibovala u zvířat spermatogenezi. Rostlina má antibakteriální účinek *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* a *S. aureus*. Jiné studie naznačují, že eugenol by mohl tlumit činnost COX-2 jako mnoho současných nesteroidních antiflogistik.<sup>124</sup>.



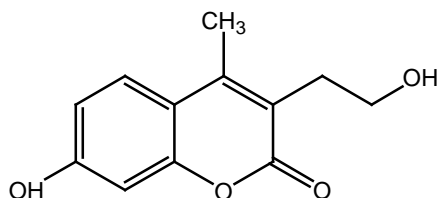
ocimumosidy A

R<sub>1</sub> = 6-deoxy-6-amino-α-D-glukopyranosyl



ocimumosidy B

R<sub>1</sub> = α-D-galaktopyranosyl-(1''-6')-O-β-D-galaktopyranosyl



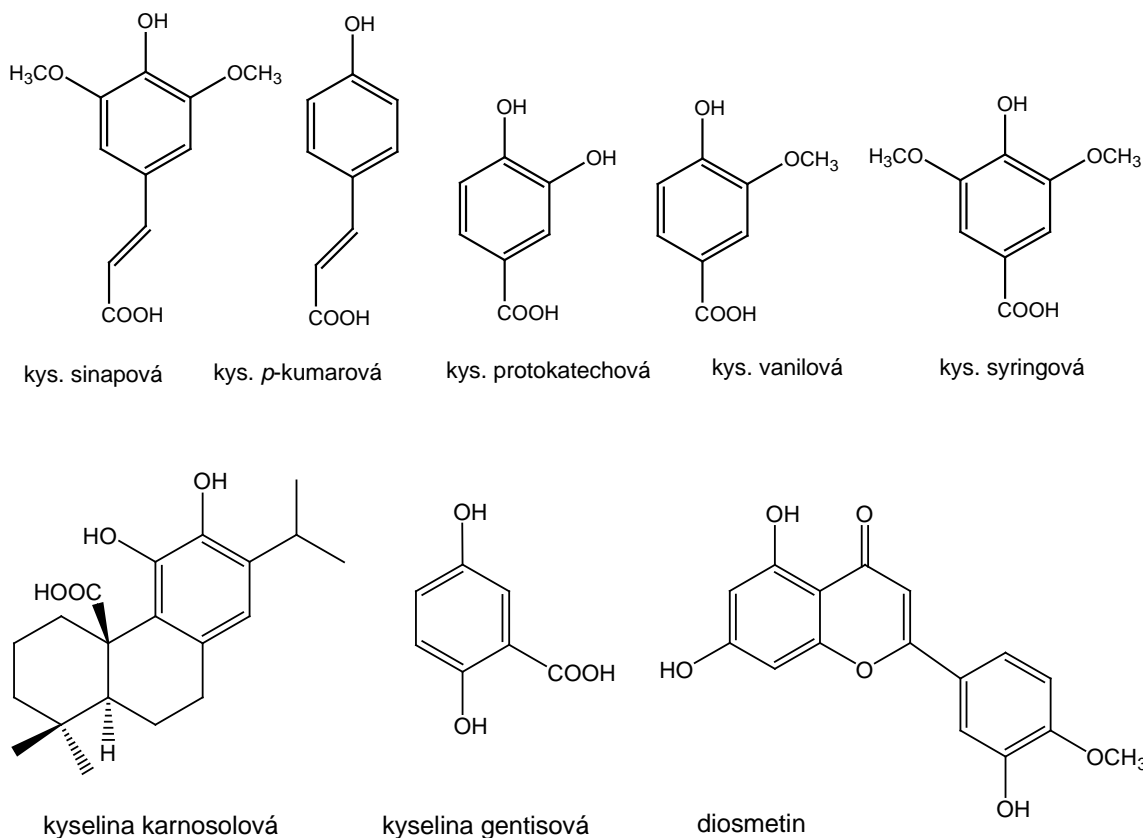
ocimarin

#### 3.5.2.4 *Rosmarini extractum fluidum*

Tekutý extrakt se získává z matečné rostliny *Rosmarinus officinalis* L., rozmarýn lékařský. Listy rozmarýnu obsahují 1-2,5 % silice s monoterpeny kamfenem, 1,8-cineolem a  $\alpha$ -pinenem jakožto hlavními složkami. Droga obsahuje 0,35 % karnosolové kyseliny (tricyklický diterpen), isorosmanol (0,002 %), rosmadiol, rosmaridifenol, rosmarichinon a 7-methoxyrosmanol (0,001 %). Artefakty vznikající oxidací během extrakce listů mohou být diterpenofenoly jako karnosol (= pikrosalvin), rosmanol, epirosmanol a 7-methylepirosmanol. V přítomnosti amoniaku vznikají jako artefakty rosmaricin a isorosmaricin (terpenové aminoderiváty). Patří mezi alkaloidy s feruginolovou strukturou. Rosmaricin byl původně považován za hlavní obsahovou látku drogy, přičemž údaje v přehledných pracích o výskytu alkaloidů v listech rozmarýnu jsou zavádějící. Po hydrolýze extraktu lze získat kyselinu kávovou, sinapovou, *p*-kumarovou, *p*-hydroxybenzoovou a ferulovou, kromě kyseliny gentisinové, protokatechové, salicylové, syringové a vanilové. Flavony jsou zastoupeny převážně cirsimaritinem (5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon), genkwaninem (5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavon), diosmetinem, eriodykytolem, hispidulinem, luteolinem, 6-methoxygenkwaninem, methoxyluteolinem a 6-methyluteolinmethyletherem. Rovněž byly izolovány následující flavonoidní glykosidy: cirsimarín, diosmin, eupafolin, hesperetin, homoplantiginin, nepitrin, fegopolin. Další skupiny látek tvoří triterpeny a steroidy, lipidy a sacharidy<sup>94</sup>.

Kamfen se projevil jako siličná složka s antimikrobiálním účinkem vůči *S. aureus* a *E. coli*. Rozmarýnová silice, 1,8-cineol a bornyl-acetát vykazují spasmolytický efekt na hladké svalstvo tenkého střeva morčat<sup>125</sup>.

Stejný účinek rozmarýnového extraktu souvisí s jeho specifickou skladbou fenolických látek. Karnosolová a rosmarinová kyselina jsou rovněž bioaktivní antimikrobiální složky přítomné v extraktu. Studie u zvířat prokázala hepatoprotektivní účinky vodného extraktu. Ethanolové extrakty připravené z mladých výhonků prokázaly choleretický účinek značně související s dávkou. Jsou účinnější než extrakt z celé rostliny<sup>126</sup>.



### 3.5.2.5 *Thymi extractum fluidum* (viz 3.5.1.12 – oddíl Silice)

## 3.5.3 OBSAHOVÉ SLOŽKY

### 3.5.3.1 Berberin sulfát

Zdrojem této látky je kůra kořene dřeváku (*Berberidis radices cortex* – *Berberis vulgaris* L.) nebo extrakt vodilky kanadské (*Extractum Hydrastidis canadensis* – *Hydrastis canadensis* L.).

Jedná se o jedovatý alkaloid isochinolinového typu, makroskopicky jej lze v izolované podobě popsat jako jemný žlutohnědý prášek.

V kořeni dřeváku převažuje jeho obsah ve skupině protoberberinů tvořící 5-6 % isochinolinových alkaloidů. Z této skupiny lze dále jmenovat kolumbamin, palmatin, jatrorrhizin, berberrubin,<sup>127,128</sup> hydroxyberberin, oxyberberin, lambertin<sup>129</sup> a kromě toho i berbamin a oxyakanthin ze skupiny bisbenzylisochinolinů (4,8-5,4 %)<sup>130,131</sup>.



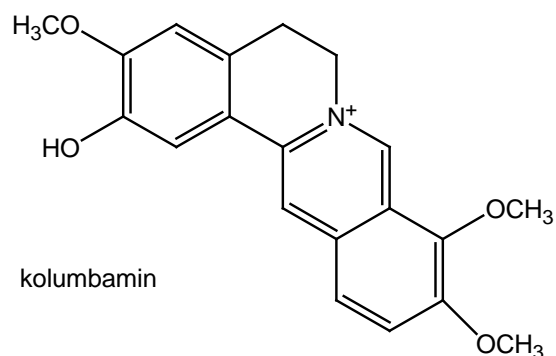
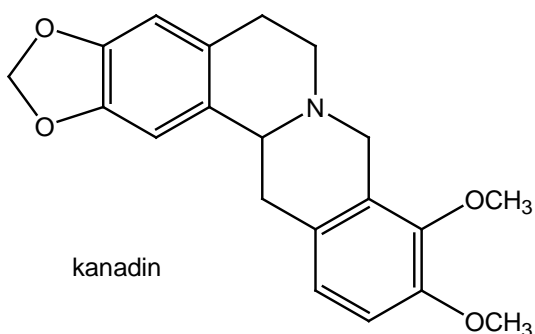
Extrakt, který obsahuje 80 % berbaminu včetně jiných alkaloidů, stimuluje u krys odchod žluči ze žlučníku o více než 72 %. Látka jim byla aplikována intraperitoneálně od 5 mg/kg. To dodatečně poukazuje na choleretický účinek extraktu<sup>132</sup>.

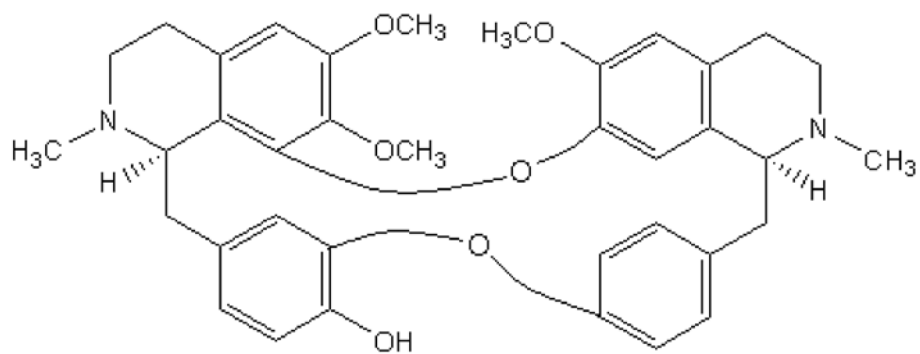
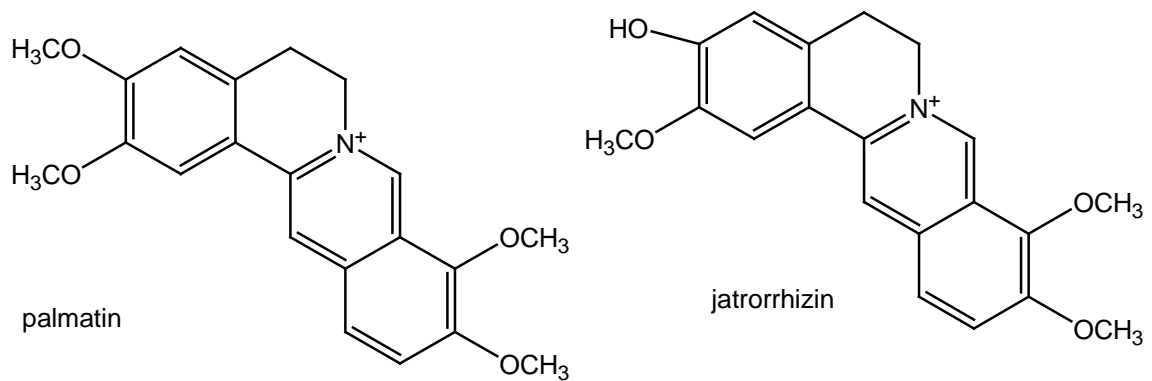
U berberinu byl zaznamenán antibakteriální účinek. Ačkoliv jej tělo zcela neabsorbuje, podává se perorálně při léčbě různých střevních infekcí, zejména u střevní dysenterie. U berberinu se rovněž prokázala antikancerogenní aktivita<sup>133</sup>.

Za účelem posoudit antisekretorický vliv sulfátu berberinu u akutního průjmu způsobeného kmenem *E. coli* (ETEC) a *Vibrio cholerae*, byly provedeny randomizované kontrolní studie se 165 dospělými pacienty. Výsledky poukázaly na skutečnost, že sulfát berberinu je účinným léčivem u průjmu způsobeného ETEC, zatímco účinnost vůči choleře je slabá a nelze ji posílit ani přidavkem tetracyklinu<sup>134</sup>.

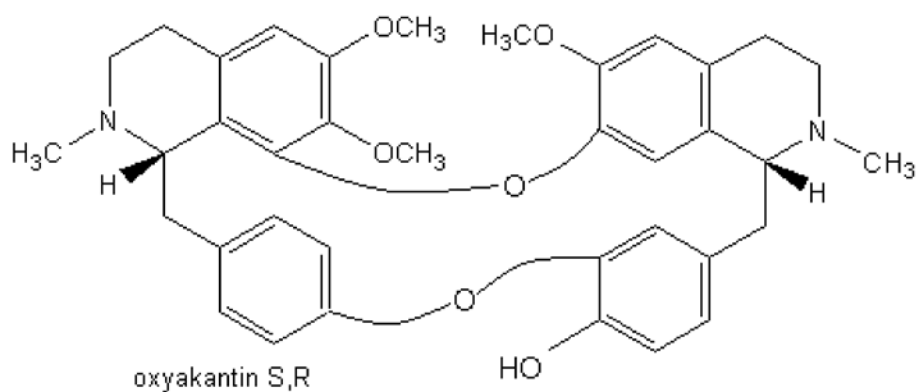
Vyšší koncentrace berberinu přímo interferují se schopností bakterie rodu *Streptococcus* adherovat k buňkám hostitele. Je to způsobeno dvěma mechanismy: prvním se uvolňuje adhezín (lipoteikoová kyselina) z povrchu streptokoka (sérotyp A), druhý mechanismus buď brání vzniku komplexu kyseliny lipoteikoové s fibronektinem nebo jej následně rozpouští<sup>135</sup>.

Starší studie naznačily protiinfekční aktivitu sulfátu berberinu selektivním potlačením syntézy podjednotek fimbrií u uropatogenní *E. coli*<sup>136</sup>.





berbamin R,S



oxyakantin S,R

### 3.5.3.2 Karvakrol a tymol

Zdrojem karvakrolu jsou především rostliny z čeledi Lamiaceae (rod *Satureja* sp., *Thymus* sp., *Origanum* sp., *Mentha* sp., *Thymus* sp.) nebo např. zástupce čeledi Lauraceae *Cinnamomum zeylanicum* Blume.

Zdrojem tymolu jsou převážně: *Citrus limon*, *Thymus vulgaris*, *Tanacetum vulgare*, *Origanum vulgare*, *Thymus zygis*, *Thymus serpyllum*, *Satureja hortensis*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Chrysanthemum vulgare*, *Arnica montana*, *Coriandrum sativum*, *Ocimum gratissimum*, *Mentha piperita*<sup>89</sup>.

Chemicky se jedná o dva polohové izomery monoterpenického fenolu, tedy 2-hydroxy-*p*-cymolu (karvakrol) a 3-hydroxy-*p*-cymolu (tymol).

Čistý tymol je v současnosti vyráběn synteticky a představují ho bezbarvé, průsvitné krystaly nebo bílý krystalický prášek s charakteristickou tymiánovou vůní a kořenitě palčivou chutí<sup>94</sup>.

Karvakrol připravovaný rovněž synteticky vykazuje *in vitro* antibakteriální aktivitu vůči *S. aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, antifungální účinek na *Candida albicans*, *C. tropicalis* a působí fungistaticky na *Penicillium digitatum*. Dále je zaznamenána silná baktericidní aktivita u *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* a *Vibrio vulnificus*. Má účinky antidiuretické, protizánětlivé, antioxidační, antiseptické, spasmolytické, karminativní, iritační apod. a v dávce MIC 170-290 působí jako anthelmintikum, antiaterosklerotikum a baktericidně<sup>89</sup>.

Karvakrol potlačuje produkci toxinů, např. diarrhoického toxinu u *Bacillus cereus*. K vysvětlení mechanismu účinku se nabízejí dvě teorie. Pokud je exkrece toxinů aktivním procesem, pak pro jejich export z buňky hraje úlohu nedostatek ATP nebo PMF. Další možností je, že zpomalení specifické růstové rychlosti bakterií může znamenat, že buňky využívají veškerou dostupnou energii pro zachování životaschopnosti a produkci toxinů pozastaví<sup>137</sup>.

Jedna ze studií se zaměřila na možný účinek karvakrolu z dobromysli na regenerační schopnost jater po částečné hepatektomii u krys. Rychlost regenerace byla stanovena zvážením jater před a po hepatektomii. Dle výsledků lze konstatovat, že karvakrol urychluje a podporuje rychlost obnovy jaterní tkáně u krys<sup>138</sup>.

U tymolu se antimikrobiální aktivita vztahuje ke *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*.

Byl upřesněn mechanismus účinku u *S. aureus* a *S. typhimurium* a vyslovena hypotéza, že se tymol váže na membránové proteiny van der Waalsovými silami a pomocí vodíkových vazeb, čímž se mění charakteristika propustnosti membrány. Zjistilo se, že tymol má větší inhibiční účinek při pH 5,5-6,5. Při nízkém pH se jeho hydroxylová skupina nemůže disociovat, tím se stává více hydrofobní a lépe se váže k hydrofobním oblastem s proteiny. Také dochází k lepšímu rozpuštění v lipidové fázi<sup>139</sup>.

Dále působí jako analgetikum, anestetikum, anthelmintikum, antiagregans, antiaterosklerotikum, má účinek antiherpetický, protizánětlivý, antioxidační, spasmolytický, antiseptický atd. Inhibuje peroxidaci membránových lipidů způsobenou železitými ionty<sup>89</sup>.

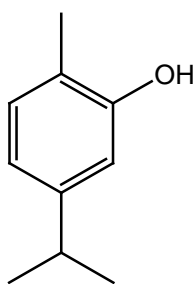
U přípravků s obsahem karvakrolu a tymolu bylo možné zaznamenat pozitivní efekt v redukci *E. coli* K88 ve výkalech prasat. Tyto přípravky se staly důkazem, že karvakrol i tymol mohou pomoci v kontrole proliferace *E. coli* a tím i ke zlepšení konzistence exkrementů.

Nedávno někteří vědci uvedli, že výsledky v oblasti výzkumu krmných additiv a střevní rovnováhy u odstavených selat nepoukazují na žádný vliv směsi karvakrolu s jinými rostlinnými extrakty na počet střevních enterobakterií u prasat. Odlišnost tvrzení lze vysvětlit rozdílným složením produktů podávaných v rámci jednotlivých výzkumů<sup>140</sup>.

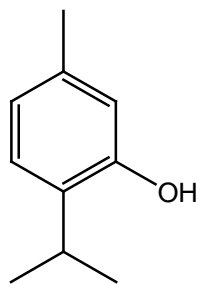
Zdá se, že siličné složky karvakrol a cinnamaldehyd mohou působit v oblasti využití živin a působit proti opačnému vlivu karboxymethylcelulosity (CMC). *In vitro* působí každá zvlášť antimikrobiálně na široké spektrum bakterií a jejich smísením dochází k synergickému účinku. Proto lze předpokládat, že směs těchto dvou látek může být v oblasti zlepšení růstu zvířat účinnější než stejné množství jednotlivých látek samotných.

V oblasti chovů drůbeže vznikla otázka, zda karvakrol a cinnamaldehyd hrají nějakou interaktivní úlohu v rámci růstu. Váhový přírůstek drůbeže krmené směsí s obsahem karvakrolu nebo cinnamaldehydu s přídatkem

karboxymethylcelulosy (CMC) se nijak nezměnil v porovnání s kontrolní skupinou zvířat, kterým byla v krmivu dodána pouze CMC. Avšak kombinací obou siličných složek došlo ke snížení váhového přírůstku průměrně v rámci skupiny o 16 % oproti opačnému očekávání. Krmivo s obsahem CMC sice způsobilo hypertrofii tenkého střeva, siličné složky nevykazovaly žádný další efekt. Současná data nepřímo poukazují na to, že siličné složky mohou vzájemně působit s ohledem na růst drůbeže<sup>141</sup>.



karvakrol



thymol

### 3.5.3.3 Piperin

Zdrojem tohoto piperidinového alkaloidu je taxon *Piper nigrum* L., pepř černý. Podle USP je piperin popsán jako krystalická látka, bezbarvá nebo bledě žlutá, krystalky jsou lesklé a hranolovité, bez zápachu. Při prvním kontaktu v ústech je nejprve bez chuti, posléze vzniká palčivý, ostrý až bolestivý vjem. Piperin je nerozpustný ve vodě, při 15 C° se rozpouští v ethanolu v poměru 1:30. Velmi dobře se rozpouští v horké kyselině octové, pouze slabě rozpustný je v etheru. Zahřátím na 130 C° taje. Rozpustný je v chloroformu, benzenu sirouhlíku, téměř nerozpustný je v petroletheru<sup>142</sup>.

Byla provedena studie zaměřená na vliv piperinu z *Piper nigrum* na absorpční funkci tenkého střeva. Experimenty *in vitro* bylo zjištěno, že piperin výrazně stimuluje činnost  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasy při koncentraci 25-100  $\mu$ M. Následkem dalších změn dochází ke zvýšení permeability intestinálních buněk<sup>143</sup>.

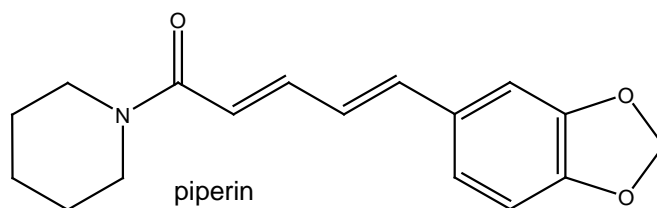
Mechanismus zvýšené biodostupnosti piperinu není však dosud známý. Předpokládá se, že tato vlastnost může být způsobena dynamickou proměnou lipidové membrány a konformačními změnami intestinálních enzymů. Výsledky

polárního fluorescenčního testu odhalily zvýšenou fluiditu membrány střevního kartáčového lemu. Piperin stimuloval leucin-amino-peptidasu a glycyl-glycin-dipeptidasovou aktivitu. Rovněž by mohl měnit dynamiku membrány vlivem své apolární povahy. Interakcí s okolními lipidy a hydrofobními oblastmi proteinů by mohl snížit schopnost membránových lipidů vázat enzymatické proteiny v jisté stérické poloze, čímž by měnil konformaci enzymu. Ultrastrukturální studie zaznamenaly prodloužení mikrokřků a nárůst počtu volných a na endoplazmatické retikulum vázaných ribozómů v enterocytech, což by mohlo naznačovat, že součástí jevu by mohla být syntéza a rozklad cytoskeletárních složek nebo membránových proteinů. Lze říci, že piperin může vyvolat změny v dynamice membrány a tím i v její propustnosti společně s tvorbou proteinů, které souvisejí s funkcí cytoskeletu. Výsledkem je pak zvětšení absorpční plochy tenkého střeva, čímž piperin napomáhá permeaci přes epiteliální bariéru<sup>144</sup>.

U piperinu se v *in vitro* studiích prokázala jeho ochranná role proti oxidačnímu působení volných radikálů inhibicí a zhášením volných kyslíkových radikálů. Při léčbě černým pepřem nebo piperinem byla zjištěna snížená peroxidace lipidů *in vivo* a pozitivně byl ovlivněn stav thiolů v buňkách (antioxidačních molekul a enzymů u mnoha experimentálně navozených stavů oxidačního stresu). Nejvýraznější vlastností piperinu je jeho tlumivý vliv na jaterní enzymy a enzymatické reakce při biotransformaci léčiva. Silně inhibuje jaterní a střevní aryl-hydroxykarbon-hydroxylasu a UDP-glukuronyl-transferasu. Piperin se projevil jako podpůrná látka v oblasti biodostupnosti mnoha léčiv, stejně tak jako fotochemických látek. Tato vlastnost se mu částečně připisuje kvůli schopnosti zvýšit absorpci u ultrastruktury střevního kartáčového lemu. Ačkoli zpočátku existovalo několik sporných zpráv, které věnovaly pozornost na bezpečnost piperinu jakožto additiva v potravinách, byla takováto evidence pochybná a pozdější veterinární studie potvrdily bezpečnost černého pepře i jeho aktivní složky piperinu<sup>145</sup>.

V zeleném pepři byly objeveny nové fenolické látky, které se v černém pepři nenacházejí. Testovala se jejich antimikrobiální aktivita proti alimentárním patogenům (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a

*Escherichia coli*). U všech čtyř kmenů bakterií došlo k inhibici růstu vlivem 3,4-dihydroxyfenylethyl-glukosidu (A) a 3,4-dihydroxy-6-(N-ethylamino)benzamidu (B). U látky A se projevil účinek v oblasti inhibice růstu při koncentraci 2,25 mmol/l, zatímco látka B byla méně účinná (7,6 mmol/l), pravděpodobně vlivem své nestabilní povahy<sup>146</sup>.



#### 3.5.3.4 *trans*-cinnamaldehyd

Zdrojem této látky je především kůra skořicovníku ceylonského (viz výše). Jedná se o olejovitou žlutou kapalinu, rozpustnou ve vodě v poměru 1:700 a mísitelnou s většinou organických rozpouštědel včetně chloroformu a diethyléru<sup>147</sup>.

Veterinární studie jsou názoru, že aplikace extraktu z kůry *per os* může pomoci v prevenci proti žaludečním vředům<sup>148</sup>. *trans*-cinnamaldehyd zcela inhibuje růst kmene *Helicobacter pylori* a to i rezistentního k medikamentózní léčbě. V testu bylo dosaženo za použití agarové diluční metody inhibice růstu třiceti kmenů *H. pylori* při koncentraci cinnamaldehydu 2 mg/ml při délce inkubační doby 9 a 12 hodin. Navíc mikroorganismy nevykazovaly žádnou rezistenci k této látce a to dokonce ani po deseti pasážích, ve kterých se koncentrace látky pohybovala pod svojí hodnotou MIC<sup>149</sup>.

Hovězí dobytek je největším zdrojem *E. coli* O157:H7 a tyto patogeny jsou vylučovány exkrementy. Schopnost přežití hraje u *E. coli* důležitou úlohu v její epidemiologii ve farmářském prostředí a žlaby na vodu pro napájení zvířat představují dlouhodobý rezervoár escherichií. Cílem jedné studie bylo zkoumání baktericidního účinku *trans*-cinnamaldehydu v nízkých koncentracích proti *E. coli* přítomné ve vodě pro napájení hovězího dobytka. Koncentrace látky se pohybovaly od 0 do 0,1 % w/v. Všechny byly účinné, baktericidní účinek se

zvyšoval při rostoucí koncentraci *trans*-cinnamaldehydu a při rostoucí inkubační teplotě. Přítomnost krmiva a fekálií ve vodě snižovala účinnost testované látky. Je však zapotřebí provést studii zaměřenou na palatabilitu vody s obsahem antimikrobiální látky, kterou by hovězí dobytek bez zábran konzumoval<sup>150</sup>.



## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ

### 4.1.1 MATERIÁL PRO STANOVENÍ

#### **Rozpouštědlo:**

DMSO (dimethylsulfoxid), SIGMA-ALDRICH s.r.o.

#### **Kultivační medium:**

MHB (Müller-Hüntonův bujon), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: 1J057

#### **Použité bakteriální kmeny:**

*E. coli* CCM 4517 (sérotyp O157:H7), Česká sbírka mikroorganismů,  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno

*Staphylococcus aureus*, Česká sbírka mikroorganismů,  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy fakulty Brno

#### **Rostlinné extrakty:**

1. *Thymus vulgaris*, 24,5 % sušiny
2. *Rosmarinus officinalis*, 51,8 % sušiny
3. *Ocimum sanctum*, 14,4 % sušiny
4. *Leuzea carthamoides*, 13,9 % sušiny

Všechny extrakty byly připraveny na fakultě extrahováním 80% ethanolem a perkolací. Následně byly zahuštěny na vakuové odparce až do viskózní konzistence a stanovená jejich sušina.

## 4.1.2 METODY POUŽITÉ PRO STANOVENÍ

### 4.1.2.1 Stanovení MIC (metoda A)

0,100 g každého extraktu (resp. množství odpovídající této sušině) bylo naváženo do plastové sterilní zkumavky s 1 ml DMSO a dále bylo ředěno za vzniku dvojkové řady koncentrací. Z každé zkumavky pak bylo převedeno 100 µl do plastové nádoby s 12 korytky, v nichž bylo předem napipetováno 1,90 ml Müller-Hüntona bujony (MHB).

Následně bylo převedeno 200 µl těchto roztoků do mikrotitrační destičky, přičemž ke každému bylo přidáno 100 µl suspenze *E. coli* O157:H7 (McFarland 1). Konečný rozsah koncentrace v jamkách titrační destičky byl od 5-0,005 ppm (11 koncentrací připravených ve dvou sériích pro každý extrakt + 12. zkumavka s kontrolním vzorkem bez extraktu). Inkubace trvala 48 hodin při 37 °C.

MIC byla hodnocena vizuálně. Pro verifikaci výsledků bylo provedeno přeočkování všech inkubovaných vzorků do nové mikrotitrační destičky.

### 4.1.2.2 Stanovení MIC (metoda B)

0,500 g každého extraktu (resp. množství odpovídající této sušině) bylo smíseno se 2 ml MHB v plastové sterilní zkumavce a byla vytvořena dvojková řada koncentrací v rozmezí 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3,13 %; 1,56 %; 0,78 %; 0,39 %; 0,20 %; 0,10 %; 0,05 % a 0,02 %. 200 µl těchto vzorků bylo odebráno přímo ze zkumavek a aplikováno do jamek mikrotitrační destičky. Po té bylo inokulováno 10 µl suspenze *E. coli* O157:H7 (McFarland 1). Ten samý postup byl zopakován za inokulace 10 µl *Staphylococcus aureus*.

Inkubace trvala 48 hodin při 37 °C. Vzorky extraktů byly pro každý mikroorganismus testovány dvakrát.

MIC byla hodnocena vizuálně. Růst *E. coli* a *S. aureus* se projevil zákalem objemu v dané jamce. Verifikace výsledků přeočkováním nebyla provedena.

## 4.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH SILIC A JEJICH SLOŽEK I

### 4.2.1 MATERIÁL PRO STANOVENÍ

#### **Emulzifikátor:**

Tween® 20 pro použití v oblasti molekulární biologie, SIGMA-ALDRICH s.r.o.,  
Lot 036 K00963

#### **Kultivační media:**

MHA (Müller-Hüntonův agar), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: WF 210

MHB (Müller-Hüntonův bujon), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: 1J057

#### **Bakteriální kmen:**

*Escherichia coli* CCM 4517 (sérotyp O157:H7), Česká sbírka mikroorganismů,  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno

#### **Silice a siličné složky:**

1. *Origanum etheroleum*, SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-11-2, SI 10371440,  
Lot.: 21417C1-214, Cat.: W28, 281-2.
2. *Thymi etheroleum* (red), SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-46-3, SI  
09382618, Lot.: 11305 DD-356, Cat.: W30, 640-1-K.
3. *Thymi etheroleum* (white), SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-46-3, SI  
10096873, Lot.: 04106 JC-087, Cat.: W30, 650-9-K.
4. *Coriandri etheroleum* (ČSL 4), ZDRAVOTNICKÉ ZÁSOBOVÁNÍ, SÚKL  
1010/89.
5. Tymol (ČSL 4), ZDRAVOTNICKÉ ZÁSOBOVÁNÍ, SÚKL 2001.
6. *Cinnamomi zeylanici etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o.,  
Lot.: 381 692, Atest: 0231/0906/538.

7. Karvakrol (čistota > 97%), FLUKA, GA 11781, Lot a kód plnění: 456690/1, Ec No. 2078896.

8. *Eucalypti etheroleum*, Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 10307.

9. *Terebinthinae etheroleum*, Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 200376.

#### **4.2.2 METODA POUŽITÁ PRO STANOVENÍ**

##### **Stanovení MBC (metoda C)**

Každý vzorek byl připraven v sedmi různých koncentracích (2 %; 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,12 %; 0,06 %; 0,03 %) ve skleněných zkumavkách s MHB s 0,5 % (v/v) emulzifikátorem Tween 20.

Ke každé řadě koncentrací vzorku byla připravena ještě kontrolní zkumavka bez testované látky. Po homogenizaci vzorků rotací na minitřepačce MS2 při 2200-2300 ot.min<sup>-1</sup> vznikla mikroemulze.

Po té bylo přidáno do každé zkumavky 50 µl suspenze *E. coli* O157:H7 (McFarland 1) včetně kontrolních zkumavek. Bakterie byly vystaveny působení vzorků po určenou dobu, tj. 15 minut (viz tabulka 7) a 24 hodin (viz tabulka 8).

Po expozici následovala inokulace obsahu zkumavek na Müller-Hüntonův agar (MHA) s osmi vyznačenými výsečemi. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C. Konečné stanovení MBC spočívalo ve sčítání CFU v každé výseči agaru. Baktericidní účinek se projevil tam, kde nebyl pozorován žádný růst CFU.

Nejprve byly testovány všechny vzorky silic a jejich složek. Verifikace po té proběhla jen u šesti nejúčinnějších (viz tabulka 9 a 10).

Rovněž byla hodnocena MBC všech testovaných vzorků v přepočtu na objem celkově a ve vztahu k 1ml kultivačního média (MHB) (viz tabulka 11). Byly porovnány hodnoty MBC, při kterých byl ještě zřejmý nulový nárůst kolonií při expozici 15 minut a 24 hodin (viz tabulka 12).

## 4.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH SILIC A JEJICH SLOŽEK II

### 4.3.1 MATERIÁL PRO STANOVENÍ

#### **Emulzifikátor:**

Tween® 20 pro použití v oblasti molekulární biologie, SIGMA-ALDRICH s.r.o., Lot 036 K00963.

#### **Kultivační media:**

MHA (Müller-Hüntonův agar), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: WF 210.

MHB (Müller-Hüntonův bujon), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: 1J057.

#### **Bakteriální kmen:**

*E. coli* O55, Gnotobiologická laboratoř, MBÚ AV ČR, Nový Hrádek.

#### **Čtyři nejúčinnější silice a jedna siličná složka:**

1. *Thymi etheroleum* (white), SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-46-3, SI 10096873, Lot.: 04106 JC-087, Cat.: W30, 650-9-K.
2. *Thymi etheroleum* (red), SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-46-3, SI 09382618, Lot.: 11305 DD-356, Cat.: W30, 640-1-K.
3. *Origani etheroleum*, SIGMA-ALDRICH s.r.o., CAS 8007-11-2, SI 10371440, Lot.: 21417C1-214, Cat.: W28, 281-2.
4. *Cinnamomi zeylanici etheroleum*, Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 381 692, Atest: 0231/0906/538.
5. Karvakrol, FLUKA, GA 11781, Lot a kód plnění: 456690/1, Ec No. 2078896.

#### 4.3.2 METODA POUŽITÁ PRO STANOVENÍ

##### **Stanovení MBC (metoda D)**

Bylo zkoušeno pět vzorků, které se v předchozím pokusu prokázaly jako neúčinnější. Každý vzorek byl připraven v sedmi různých koncentracích (2 %; 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,12 %; 0,06 %; 0,03 %) v plastových zkumavkách s MHB s 0,5 % (v/v) emulzifikátorem Tween 20.

Ke každé řadě koncentrací vzorku byla připravena ještě kontrolní zkumavka bez testované látky. Po homogenizaci vzorků rotací na minitřepačce MS2 při 2200 – 2300 ot. min<sup>-1</sup> vznikla mikroemulze.

Do každé zkumavky bylo po té přidáno 50 suspenze *E. coli* O55 (McFarland 1) včetně kontrolních zkumavek. Bakterie byly vystaveny působení vzorků po dobu 15 minut ( viz tabulka 13) a 24 hodin (viz tabulka 14).

Po expozici následovala inokulace obsahu zkumavek na Müller-Hüntonův agar (MHA) s osmi vyznačenými výsečemi. Kultivace trvala 24 hodin při 37 °C. Konečné stanovení MBC spočívalo ve sčítání CFU v každé výseči agaru. Nulový počet CFU byl projevem baktericidního účinku vzorků.

Za účelem porovnání výsledků kultivace pěti neúčinnějších vzorků byla zhotovena fotodokumentace (viz Výsledky).

#### 4.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH SILIC, JEJICH SLOŽEK A SUCHÉHO EXTRAKTU

##### 4.4.1 MATERIÁL PRO STANOVENÍ

###### **Emulzifikátor:**

Tween® 20 pro použití v oblasti molekulární biologie, SIGMA-ALDRICH s.r.o., Lot 036 K00963.

###### **Kultivační media:**

MHA (Müller-Hüntonův agar), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže: WF 210.

MHB (Müller-Hüntonův bujon), Čaderský-Envitek s.r.o., šarže:1J057.

**Bakteriální kmen:**

*Escherichia coli* CCM 4517 (sérotyp O157:H7), Česká sbírka mikroorganismů,  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno

*Staphylococcus aureus*, Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta  
Masarykovy fakulty Brno

**Vybrané vzorky:**

1. *Anisi stellati etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 409 625, Atest: 0348/1206/538
2. *Caryophylli etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 409624, Atest: 0349/1206/538
3. *Citri etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 397461, Atest: 0319/1106/538
4. *Geranii etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 413037, Atest: 0080/0307/538
5. *Lavandulae etheroleum* (ČL 2005), Dr. KULICH PHARMA s.r.o., Lot.: 429878, Atest: 0155/0407/538
6. *Melaleucaae etheroleum* 100%, 10ml, Dr. Miller Pharma s.r.o. – bez atestu
7. *trans-cinnamaldehyd* 250 ml, FLUKA, Lot & Filling code: 1253919, 53807314, EC No. 2032139, RA 12845
8. Berberin sulfát – LACHEMA Spolana Neratovice– Laboratorní chemikálie, zboží z dovozu
9. *Hydrastidis canadensis extractum siccum*, NATUREX, E 44/01/D7,Ref. 332055,04804-200



10. Piperin, SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Lot.: 06608CD-415, EC No. 202-348-0, CAS 94-62-2, Cat.: W29, 090-4

#### **4.4.2 METODY POUŽITÉ PRO STANOVENÍ**

##### **Stanovení MBC (Metoda E)**

Bylo zkoušeno deset nových vzorků (silice, jednotlivé účinné látky a suchý extrakt). Každý vzorek byl připraven v sedmi různých koncentracích (2 %; 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,12 %; 0,06 %; 0,03 %) ve skleněných sterilizovaných zkumavkách s MHB s 0,5 % (v/v) emulzifikátorem Tween 20.

Pro každý vzorek bylo potřeba 16 kusů zkumavek: 8 pro *E. coli* a 8 pro *S. aureus*, celková spotřeba zkumavek tedy činila 160 kusů (včetně kontrolních zkumavek bez testované látky, pouze s HMB).

U silic po homogenizaci rotací na minitřepačce MS2 při 2200 – 2300 ot. min<sup>-1</sup> vznikla mikroemulze. Látky práškové konzistence (piperin, berberin sulfát a *Hydrastidis canadensis extractum siccum*) byly rozpuštěny pomocí sonifikátoru za vzniku 2% roztoku.

Do jedné řady zkumavek bylo po té přidáno 50l suspenze *E. coli* (McFarland 1) včetně kontrolní zkumavky, totéž bylo provedeno i u druhé koncentrační řady pro *S. aureus*. Bakterie byly vystaveny působení vzorků po dobu 15 minut ( viz tabulka 15, 16) a 24 hodin (viz tabulka 17, 18).

Po expozici následovala inokulace obsahu zkumavek na Müller-Hüntonův agar s osmi vyznačenými výsečemi. Kultivace trvala 24 hodin při 37 °C. Konečné stanovení MBC spočívalo ve sčítání CFU v každé výseči agaru. Nulový počet CFU byl projevem baktericidního účinku vzorků.

## **V. VÝSLEDKY**

Při stanovení MIC extraktů u *E. coli* O157:H7 pomocí metody A (viz článek 4.1.2.1) nebylo dosaženo pozitivních výsledků. Došlo k zakalení všech jamek mikrotitračních destiček. Všechny vzorky v koncentraci 5 – 0,005 ppm byly negativní.

Při stanovení MIC extraktů v koncentraci 25 %-0,02 % metodou B ( viz článek 4.1.2.2) byly zjištěny pozitivní výsledky (viz tabulka 3-6).

**Tabulka 3: Růst *E. coli* po 48 hodinách expozice testovaným látkám**

<i>E. coli</i>	Koncentrace extraktů (%)												
	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02	0,00	
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Růst
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

**Tabulka 4: Růst *E. coli* po 48 hodinách expozice testovaným látkám**

<i>E. coli</i>	Koncentrace extraktů (%)												
	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02	0,00	
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Růst
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

**Tabulka 5: Růst *Staphylococcus aureus* po 48 hodinách expozice testovaným látkám**

<i>S. aureus</i>	Koncentrace extraktů (%)												
	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02	0,00	
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	Růst
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	

**Tabulka 6: Růst *Staphylococcus aureus* po 48 hodinách expozice testovaným látkám**

<i>S. aureus</i>	Koncentrace extraktů (%)											
	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,05	0,02	0,00
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ocimum sanctum</i>	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	+	+
<i>Rosmarinus officinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	+	+
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	+	+
<i>Thymus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leuzea carthamoides</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Růst

**Tabulka 7: CFU po 15 minutách expozice *E. coli* testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)							
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0	0	0	8	8<	8<	8<	8<
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	0	18	18<	18<	18<	18<
<i>Origani etheroleum</i>	0	0	0	6	6<	6<	6<	6<
<i>Eucalypti etheroleum</i>	4	14	6	14<	14<	14<	14<	14<
<i>Coriandri etheroleum</i>	0	3	3<	3<	3<	3<	3<	3<
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0	0	0	1	1<	1<	1<	1<
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<
Karvakrol	0	0	0	10	10<	10<	10<	10<
Tymol	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<

CFU

**Tabulka 8: CFU po 24 hodinách expozice *E. coli* testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)							
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Origani etheroleum</i>	0	0	0	10<	10<	10<	10<	10<
<i>Eucalypti etheroleum</i>	0	0	10<	10<	10<	10<	10<	10<
<i>Coriandri etheroleum</i>	0	0	1	10<	10<	10<	10<	10<
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0	0	0	0	0	2	10<	10<
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	26	26<	26<	26<	26<	26<	26<	26<
Karvakrol	0	0	0	0	2	10<	10<	10<
Tymol	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<

CFU

**Tabulka 9: CFU po 15 minutách expozice *E. coli* nejúčinnějším vzorkům – ověření**

Testované látky	Koncentrace (V/V)							
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Origani etheroleum</i>	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<
Karvakrol	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<

CFU

**Tabulka 10: CFU po 24 hodinové expozici *E. coli* nejúčinnějším vzorkům – ověření**

Testované látky	Koncentrace (V/V)							
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Origani etheroleum</i>	1	1	0	0	10<	10<	10<	10<
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0	0	0	0	0	0	10<	10<
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<	10<
Karvakrol	0	0	0	0	10<	10<	10<	10<

CFU

**Tabulka 11: MBC po 24 hodinách expozice**

Testované látky	MBC (V/V) %	MBC ( µl/1 ml media)
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0,25	2,5
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0,25	2,5
<i>Origani etheroleum</i>	0,25	2,5
<i>Eucalypti etheroleum</i>	1	10
<i>Coriandri etheroleum</i>	0,5	5
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0,06	0,6
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	-	-
Karvakrol	0,25	2,5
Tymol	-	-

**Tabulka 12: Porovnání MBC po expozici 15 minut a 24 hodin**

Testované látky	MBC po 15 min (%)	MBC po 24 hod (%)
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0,25	0,25
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0,25	0,25
<i>Origani etheroleum</i>	0,25	0,25
<i>Eucalypti etheroleum</i>	2	1
<i>Coriandri etheroleum</i>	1	0,5
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0,25	0,06
<i>Terebinthinae etheroleum</i>	-	-
Karvakrol	0,25	0,12
Tymol	-	-

**Tabulka 13: CFU po 15 minutách expozice *E.coli* O55 nejúčinnějším vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								CFU
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	1	0	1	10<	10<	10<	10<	10<	
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	4	10<	10<	10<	10<	10<	
<i>Origani etheroleum</i>	0	0	0	80<	80<	80<	80<	80<	
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	20	0	0	10<	10<	10<	10<	10<	
Karvakrol	0	0	0	10<	10<	10<	10<	10<	

**Tabulka 14: CFU po 24 hodinách expozice *E. coli* O55 nejúčinnějším vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								CFU
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Thymi etheroleum</i> (white)	0	0	0	0	200<	200<	200<	200<	
<i>Thymi etheroleum</i> (red)	0	0	0	200<	200<	200<	200<	200<	
<i>Origani etheroleum</i>	0	0	0	0	200<	200<	200<	200<	
<i>Cinnamomi zeylanici etheroleum</i>	0	0	0	0	0	<80	200<	200<	
Karvakrol	0	0	0	0	200<	200<	200<	200<	

**Tabulka 15: CFU po 15 minutách expozice *E. coli* O157:H7 testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Anisi stellati etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	CFU
<i>Caryophylli etheroleum</i>	0	0	0	cca 25	x	x	x	x	
<i>Citri etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Geranii etheroleum</i>	cca 36	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Lavandulae etheroleum</i>	5	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Melaleucaae etheroleum</i>	0	0	0	x	x	x	x	x	
<i>trans-cinnamaldehyd</i>	0	0	0	0	x	x	x	x	
Berberin sulfát	4	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Hydrastidis canadensis ext.sicc.</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
Piperin	x	x	x	x	x	x	x	x	

**Tabulka 16: CFU po 15 minutách expozice *S. aureus* testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Anisi stellati etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	CFU
<i>Caryophylli etheroleum</i>	8	cca 50	x	x	x	x	x	x	
<i>Citri etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Geranii etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Lavandulae etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Melaleucaae etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>trans-cinnamaldehyd</i>	cca 60	x	x	x	x	x	x	x	
Berberin sulfát	cca 30	cca 30	x	cca 50	x	x	x	x	
<i>Hydrastidis canadensis ext.sicc.</i>	cca 50	cca 50	cca 50	x	x	x	x	x	
Piperin	x	x	x	x	x	x	x	x	

**Tabulka 17: CFU po 24 hodinách expozice *E. coli* testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Anisi stellati etheroleum</i>	0	cca 40	x	x	x	x	x	x	CFU
<i>Caryophylli etheroleum</i>	0	0	0	0	x	x	x	x	
<i>Citri etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Geranii etheroleum</i>	0	0	x	x	x	x	x	x	
<i>Lavandulae etheroleum</i>	0	0	x	x	x	x	x	x	
<i>Melaleucaae etheroleum</i>	0	0	0	0	x	x	x	x	
<i>trans-cinnamaldehyd</i>	0	0	0	0	0	0	x	x	
Berberin sulfát	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Hydrastidis canadensis ext.sicc.</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
Piperin	x	x	x	x	x	x	x	x	

**Tabulka 18: CFU po 24 hodinách expozice *S. aureus* testovaným vzorkům**

Testované látky	Koncentrace (V/V)								
	2%	1%	0,50%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%	0%	
<i>Anisi stellati etheroleum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	CFU
<i>Caryophylli etheroleum</i>	0	0	cca 50	cca 50	cca 70	x	x	x	
<i>Citri etheroleum</i>	4	1	11	x	x	x	x	x	
<i>Geranii etheroleum</i>	0	0	6	5	4	x	x	x	
<i>Lavandulae etheroleum</i>	10	0	cca 20	8	x	x	x	x	
<i>Melaleucaae etheroleum</i>	6	13	cca 50	cca 60	x	x	x	x	
<i>trans-cinnamaldehyd</i>	0	0	0	0	5	cca 60	cca 60	x	
Berberin sulfát	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Hydrastidis canadensis ext.sicc.</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	
Piperin	x	x	x	x	x	x	x	x	

Vysvětlivky:

x = velmi mnoho kolonií (nespočitatelné)

0 = žádný růst kolonií

cca = téměř spočitatelné



# FOTODOKUMENTACE - ZOBRAZENÍ CFU *E. COLI* / O55

15 minut expozice

24 hodin expozice



Thymi etheroleum (white)



Thymi etheroleum (red)



Origani etheroleum



Cinnamomi zeylanici etheroleum



Karvakrol

FOTODOKUMENTACE – POROVNÁNÍ CFU *E. COLI* A *S. AUREUS* PO 24  
HODINÁCH INKUBACE

*E. coli*

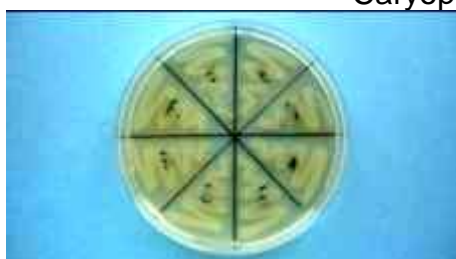
*S. aureus*



Anisi stellati etheroleum



Caryophylli etheroleum



Citri etheroleum



Geranii etheroleum



Lavandulae etheroleum

*E. coli*

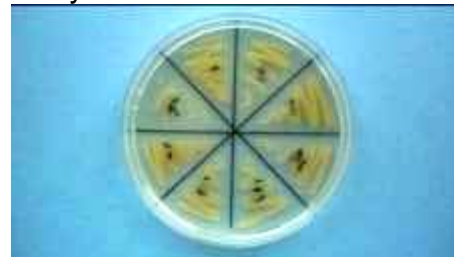
*S. aureus*



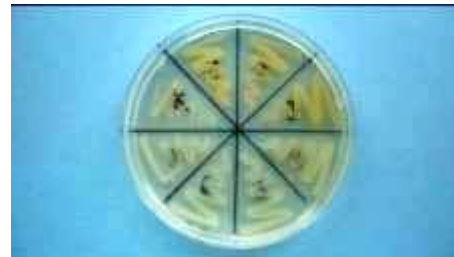
Melaleuca etheroleum



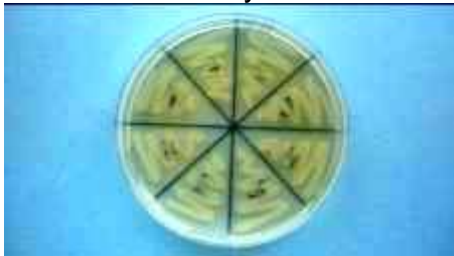
trans-cinnamaldehyd



Berberin sulfát



Hydrastidis canadensis extractum siccum



Piperin

## **VI. DISKUZE**

Rezistence bakterií k antibiotikům se stala vážným celosvětovým problémem. Důvodem je nadměrná spotřeba antimikrobiálních látek a jejich nezodpovědné používání<sup>151</sup>. Ke vzniku rezistence přispívá aplikace antibiotik v příliš nízkých dávkách (preventivní medikace), nadměrně dlouhých intervalech a rovněž nedostatečná délka terapie. Nízké dávkování je obecně větší chybou než příliš vysoké. Příliš krátká terapie nestačí k eradikaci původců a podporuje vznik rezistence etiologického agens. Na druhé straně ovšem platí, zejména u širokospektrých antibiotik, že čím déle je podáváme, tím větší je pravděpodobnost selektování rezistentních kmenů těch bakterií, proti nimž nebyla léčba zaměřena<sup>152</sup>. Důsledky se pak projevují v selhávání léčby, vyšší mortalitě a značných ekonomických nákladech. Při řešení nepříznivé situace musí být aktivně zapojeny všechny složky, kterých se rezistence mikroorganismů k antibiotikům dotýká – od veterinárních lékařů, přes farmaceutický průmysl, po řídicí autority (národní lékové agentury, EMEA, další mezinárodní organizace, vládní struktury). Jednotná strategie v boji proti antimikrobiální rezistenci je základem úspěchu v boji proti antimikrobiální rezistenci<sup>151</sup>.

U průjmových onemocnění hospodářských zvířat je nezbytná neodkladná léčba. Její prodlení či dokonce opominutí končí negativním dopadem nejen ekonomickým, ale i hygienickým a etickým. V tomto směru je velmi přínosná prevence průjmových onemocnění. Kromě správné zoohygieny, vakcinace a jiných postupů lze do oblasti prevence zařadit i kvalitní krmiva obohacená o additiva rostlinného původu.

Důvodem zavedení těchto fyto-genických additiv do krmiv je, jak už bylo uvedeno, nejen zákaz používání antibiotik Evropskou komisí od 1. 1. 2006, ale i vznik rezistence původců onemocnění vůči antibiotické léčbě.

Obecně platí, že z hlediska prevence vzniku rezistence je nutno dávat přednost antibiotikům s co nejužším spektrem před širokospektrými a terapii monokompozitními léčivými přípravky před kombinací antibiotik. V chovech prasat se ale běžně setkáváme se smíšenými infekcemi, což pochopitelně vede k preferování širokospektrých antibiotik. Šíření rezistence dále podporuje zejména používání omezeného spektra antibiotik pro široký okruh původců

onemocnění nebo dokonce soustavné využívání pouze jednoho druhu antibiotika<sup>152</sup>. Je tedy zřejmé, že použití fyto-genních náhrad v krmivech pro předcházení vzniku infekčních onemocnění trávicího traktu má své opodstatnění.

V této práci jsem se zabývala vlivem vybraných rostlinných extraktů, silic a jejich složek na růst a životaschopnost *Staphylococcus aureus* a *E. coli*. Tyto dva mikroorganismy představují model nejběžnějších grampozitivních a gramnegativních infekčních agens.

Klíčem výběru testovaných rostlin byly celosvětové výzkumy, které se již bakteriostatickým a baktericidním účinkem přírodních látek vůči patogenům gastrointestinálního traktu zabývaly a to s pozitivními výsledky. Při hodnocení těchto výsledků z literatury se však ukázala určitá roztržitost: nebývají jednoznačně uvedeny charakteristiky extraktů, resp. vstupní suroviny, a nelze je žádným způsobem blíže zjistit. Také byly použity různé bakteriální kmeny často s protichůdnými výsledky, atd.

V rámci této studie bylo použito vícero čeledí, avšak významné zastoupení zde měly rostliny z čeledi *Lamiaceae*, *Pinaceae*, *Myrtaceae* či *Asteraceae*, u kterých byl potvrzen antimikrobiální účinek. Vítanou charakteristikou rostlinných produktů je také imunostimulační a desinfekční účinek, který zvyšuje odolnost chovů vůči patogenům.

Při testování MIC zahuštěných ethanolových extraktů *Ocimum sanctum*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* a *Leuzea carthamoides* metodou A (viz článek 4.1.2.1) nebylo při koncentracích 5-0,005 ppm v jamkách mikrotitrační destičky dosaženo uspokojivých výsledků. I po jejich verifikaci přeočkováním došlo k zákalu všech jamek. Tím bylo prokázáno, že vznik zákalu nebyl způsoben přítomností balastních látek v sumárním extraktu, nýbrž rozmnožením bakterií, které si zachovaly svou životaschopnost. Důvodem negativního výsledku mohla být nízká citlivost bakterií vůči extraktům, nízké koncentrace extraktů nebo únik části těkavých účinných složek při zahušťování extraktů na vakuové odparce a při manipulaci s ním.

Při stanovení MIC stejných extraktů u *E. coli* a *S. aureus* metodou B (viz článek 4.1.2.2) bylo při navážce extraktu 0,500 g (resp. množství odpovídajícího

sušiny) dosaženo uspokojivějších výsledků (viz tabulka 3 až 6). Bakteriostatický účinek u *E. coli* byl nejvýraznější u extraktu z *T. vulgaris*. Ještě při koncentraci 3,13 % (v/v) nedošlo k zákalu obsahu kultivačního média v jamkách destičky. I přes tento výsledek se jedná o hodnotu MIC poměrně vysokou. V případě extraktů z *O. sanctum*, *R. officinalis*, a *L. carthamoides* nebyly hodnoty MIC příliš blízké hodnotám očekávaným na základě předběžných studií. (Pokud chceme definovat minimální inhibiční koncentraci, pak ve vztahu k silici (nebo extraktu) se jedná o její nejnižší koncentraci, která má za následek zachování nebo snížení životaschopnosti inokula.<sup>153</sup> Definice MIC se však v rámci publikací liší, což je nevýhodné při porovnávání hodnot MIC různých studií<sup>154</sup>.

Proto bylo stanovení MIC vybraných extraktů provedeno dvěma metodami (za použití rozpouštědla DMSO a bez něho, v různých koncentračních rozmezech apod.), ve kterých MIC znamená koncentraci extraktu, při které ještě bylo možné vizuálně zaznamenat čirý objem jamek mikrotitrační destičky. Zákal byl již projevem rozmnožování bakterií.)

Při sledování účinku tymiánového a rozmarýnového extraktu na *S. aureus* byly zjištěny ještě nižší hodnoty MIC než u *E. coli* (viz tabulka 5 a 6). Pro extrakt z *R. officinalis* činí MIC 0,2 % (v/v) stejně jako pro *T. vulgaris*. Účinek extraktu *L. carthamoides* byl v porovnání s předchozími dvěma extrakty poněkud slabší (3,1 % v/v), ačkoliv hodnota MIC je v tomto případě nižší, než-li u *E. coli* (12,5 % v/v). Tato skutečnost zčásti podporuje hypotézu o vyšší citlivosti grampozitivních bakterií vůči antibakteriálním látkám typu extraktů či silic (viz článek 3.4). MIC extraktu z *O. sanctum* byla pro *E. coli* a *S. aureus* stejná a dosahovala rovněž poměrně vysokých hodnot (6,25% v/v).

Při stanovení MBC vybraných silic a jejich složek metodami C a D (viz články 4.2.2 a 4.3.2) byly použity sérotypy O157:H7 a O55 kmene *E. coli*.

U *E. coli* O157:H7 (metoda C) byl pozorován u všech vzorků antibakteriální efekt, kromě thymolu a terpentýnové silice (viz tabulka 7-10). Nejnižší baktericidní koncentrace dosáhla silice skořicovníku ceylonského (0,06 % v/v). po 24 hodinové expozici při 37 °C (viz tabulka 10). Nezanedbatelných hodnot MIC dosáhl i karvakrol (0,25-0,12 % v/v). Standardní hodnota baktericidní koncentrace většiny testovaných silic a jejich složek byla asi 0,25 %

po 15minutové expozici při 20 °C (viz tabulka 9). Zajímavý, ale neuspokojivý byl účinek tymolu. Ačkoliv ho jiné studie řadí mezi jednu z nejsilnějších antibakteriálních látek rostlinného původu, v tomto experimentu nebylo dosaženo ani ve 2% koncentraci baktericidního účinku. Jelikož se vyskytuje v krystalické formě, musel být rozpuštěn v MHB a Tweenu 20 za vzniku 2% roztoku a teprve po té bylo možné provést dvojkové ředění.

Po 15minutovém působení silice z *T. vulgaris* (red and white) a *O. vulgare* na *E. coli* O55 (metoda D) byl ještě pozorovatelný částečný baktericidní účinek při koncentraci 0,50 % (v/v) (viz tabulka 13). U silice *Cinnamomum zeylanicum* došlo pravděpodobně k chybě a ve výseči č. 1 (nejvyšší koncentrace) došlo k růstu několika kolonií (viz tabulka 13). Neúčinnost silice při takovéto koncentraci je vyvrácena výsledkem po 24 hodinové expozici (viz tabulka 14). Zde se naopak silice projevila jako nejsilnější baktericidní agens a to při koncentraci až 0,12 % (v/v). Částečný baktericidní účinek byl zřejmý ještě při koncentraci 0,06 % (viz fotodokumentace). Standardní hodnota baktericidní koncentrace většiny silic byla 0,25 % (v/v).

V další etapě této studie (metoda E – viz 4.4.2) byly testovány další nové vzorky se stejným záměrem jako u předchozích – potvrdit jejich antimikrobiální účinek. Za tímto účelem byly vybráni zástupci různých čeledí, kteří jsou zdrojem silice, suchého extraktu nebo siličné složky.

Podle tabulky č. 15 se po 15minutové expozici *E. coli* vzorkům a po odečtení CFU prokázal jako nejsilnější antimikrobiální agens *trans*-cinnamaldehyd (MBC je 0,25 % v/v). Hned za ním následovala silice hřebíčkovce (MBC 0,25 % v/v). Komerčně nejznámější tea tree oil a jeho silný antibakteriální účinek se však v tomto testu u *E. coli* nepotvrdil natolik, jak jsem očekávala (MBC 0,5 % v/v). Velmi slabě účinkovaly geraniová, levandulová silice a síran berberinu. U ostatních vzorků se neprojevila ani MIC.

Lepších výsledků bylo dosaženo po 24hodinové expozici, neboť účinek některých látek a silic na *E. coli* zesílil (viz tabulka č. 17). Jako nejsilnější se opět projevila *trans*-cinnamaldehyd (0,06 % v/v).

Antibakteriální vliv stejných vzorků u *S. aureus* (viz tabulka č. 16 a 18) byl celkově slabší v porovnání s *E. coli*, což opět podporuje teorii o vyšší



citlivosti gramnegativních bakterií k těmto látkám. Po 15minutové expozici nedosáhl ani jeden ze vzorků minimální baktericidní koncentrace. Slabou inhibici v růstu CFU vykazovaly silice hřebíčku, *trans*-cinnamaldehyd, síran berberinu a extrakt vodilky. O něco lepší výsledky byly poskytnuty po expozici *S. aureus* vzorkům na dobu 24 hodin (viz tabulka č. 18). Zde se již projevila baktericidní vliv *trans*-cinnamaldehydu (0,25 % v/v) a hřebíčkové (1 % v/v) a geraniové (1 % v/v) silice.

Jistý inhibiční vliv na růst kolonií byl sledován u *trans*-cinnamaldehydu při koncentraci 0,03 % (kolonie byly počitatelné). Velikým překvapením byly negativní výsledky u síranu berberinu, extraktu vodilky a piperinu, u kterých se očekával dle jiných relevantních studií silný baktericidní efekt. Pravděpodobně byla zvolena chybná metoda přípravy jejich roztoků.

Porovnání údajů těchto experimentů s výsledky jiných studií je problematické. Je známo, že složení silic a extraktů se liší v závislosti na místním podnebí, kde se rostliny vyskytují a na životních podmínkách. Dále některé silice stejně pojmenované mohou obecně pocházet z rozdílných druhů rostlin. Rovněž metody používané ke stanovení antimikrobiální aktivity a výběr organismů, na kterých se látky testují se v rámci publikací liší. Běžně používané jsou agarová a diluční metoda. Výsledky získané každou z těchto metod se mohou lišit v souvislosti se změnou podmínek během experimentů. Je nutné dbát na standardnost postupů při kultivaci jako je světlo, teplo, vlhkost, jinak jsou výsledky nereprodukovatelné, což je možné z některých literárních prací tušit. Dále lze zařadit i rozdíly v mikrobiálním růstu, dobu expozice mikroorganismů silicím, rozpustnost silic nebo jejich komponent anebo přítomnost a množství emulzifikátoru. Tyto a jiné okolnosti vysvětlují zčásti značné rozdíly v hodnotách MIC získaných různými metodami<sup>155</sup>.

Je vhodné zamyslet se nad otázkou, jaké množství silice by muselo připadnout na jednu krmnou dávku. Velikost dávky závisí na druhu hospodářského zvířete, věku, hmotnosti, fyziologických podmínkách GIT a na mnoha dalších faktorech.

Podle současných ekonomických parametrů na výkrm prasat je zřejmé, že spotřeba krmiva na výkrm jednoho prasete je v České republice nejvyšší ze

všech zemí Evropské unie. Zároveň lze předpokládat, že ekonomicky únosná je taková aplikace dodatkových látek do krmiv, která navodí koncentraci 100-300 ppm (tj. 0,01-0,03 % v/v). Při hodnocení použitelnosti silic nebo sumárních extraktů je tedy nutné uvážit cenu vstupní suroviny, koncentraci biologicky aktivních složek (silice) a náklady na zpracování (destilace, případně příprava extraktů). Aplikace účinných látek by mohla být na hranici prahové účinnosti, protože tyto látky jsou netoxické, neovlivňují konečný produkt a především – mohou být prodávány ve výkrmu dlouhodobě. Je zde potřebné také zohlednit skutečnost, že látky nepůsobí jen proti invazivním agens, ale častokrát mají řadu významně využitelných jiných biologických účinků (zvyšují tvorbu žluči, působí digestivně, zlepšují celkový metabolismus, atd.). Tento fakt je nezanedbatelný a významně kvalifikuje použití rostlinných surovin, i když jejich antimikrobiální aktivita není na stejně vysoké úrovni jako v případě syntetických protiinvazivních chemoterapeutik (nebo antibiotik).

Do dalších biologických pokusů by bylo vhodné na základě svých zjištění zařadit silici z *Cinnamomum zeylanicum* a karvakrol, u nichž bylo dosaženo nejnižších hodnot MIC. Předmětem zájmu by měla být i silice z *Thymus vulgaris* (white, red) a *Origanum vulgare* (viz výše). Pozornost by také zasloužila siličná složka skořicovníku cejlonského *trans*-cinnamaldehyd.

Jednoznačné zhodnocení těchto výsledků je možné provést až po realizaci stájových pokusů při nichž bude použito krmivo s obsahem účinných látek na základě laboratorních testů. Výsledky jen těchto pokusů jsou reprezentativní a dále využitelné, protože v sobě zahrnují komplexní procesy uplatňované v chovech zvířat jako je stájový stres, kvantitativní úroveň výkrmu, zoohygienické podmínky a další. Je zřejmé, že využití fyto-genických zdrojů je teprve na začátku. V nejbližším období však bude nutné se této problematice z hlediska výzkumu intenzivně věnovat, protože po roce 2011 se v rámci EU počítá s daleko vyšším počtem restriktivních opatření z hlediska použitelných léčiv ve výkrmu zvířat. Takže fyto-genické zdroje jsou vlastně jediným reálným východiskem na cestě k optimalizaci chovu.

## **VII. LITERATURA**

- 
- 1 TEUBER, M.: Veterinary use and antibiotic resistance. Curr. Opinion Microbiol. **4**, 493-499 (2001).
- 2 BILLOVÁ V., BUŠ A., HERA A.: Minimalizace rizik používání vybraných skupin antimikrobiálních léčiv u potravinových zvířat s ohledem na lidské zdraví. Zpráva činnosti Vědeckého výboru veterinárního v roce 2007.
- 3 Dostupné z: < [http://www.vri.cz/userfiles/file/Ved\\_Vet\\_Vyb/Billova.pdf](http://www.vri.cz/userfiles/file/Ved_Vet_Vyb/Billova.pdf)> datum stažení 02/2008.
- 4 ---: Feed Mix **15**, 12-15 (2007).
- 5 WINDISCH W., SCHEDLE K., PILTZNER C., KROISMAYR A.: Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J. Anim. Sci., **86**, 140-148 (2008).
- 6 HOLEJŠOVSKÝ J.: Zdravotní problematika v chovech prasat mladších věkových kategorií. Odborná konference, ČZU v Praze. Dostupné z: <[www.agris.cz/etc/textforwarder.php?iType=2&ild=152362](http://www.agris.cz/etc/textforwarder.php?iType=2&ild=152362)> ,datum stažení 11/2008.
- 7 ILLEK J.: Závažná průjmová onemocnění telat [on line]. Vystaveno 7. 5. 2007 [citace 2008-03-17]. Dostupné z : <[http://www.agroweb.cz/Zavazna-prujmova-onemocneni-telat\\_\\_s79x27921.html](http://www.agroweb.cz/Zavazna-prujmova-onemocneni-telat__s79x27921.html)>,<<http://stary.agroweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=27921>>. Datum stažení 03/2008.
- 8 JUNG C., BOSTEDT H.: Neonatale Diarrhoe beim Kalb. Fachspiegel. **4**, 262-272 (2003).
- 9 ---: Kälberdurchfall: Mischinfektionen sind die Regel. Top. Agrar. **19**, 8 (2008).

- 
- <sup>10</sup> DRÁBEK, J., DUBANSKÝ, V.: Zdravotní problematika prasat II. Bakteriální choroby. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2001, s. 157, 178.
- <sup>11</sup> DRÁBEK, J., DUBANSKÝ, V.: Zdravotní problematika prasat V. Orgánové nemoci prasat a jejich diferenciální diagnostika. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2004, s. 7, 26, 31.
- <sup>12</sup> ŠPELINA, V., DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., HLÚBIK, P., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, F., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., WINKLEROVÁ, D.: Stanovisko vědeckého výboru pro potraviny ve věci: *E. coli* O157:H7 v potravinách v ČR [on line]. Vystaveno 12. 11. 2004 [citace 2008-03-17], kód publikace VVP:Stan/2004/7/deklas/E.coli. Dostupné z <[http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/stanoviska/Stan\\_2004\\_7\\_deklas\\_Ecoli.pdf](http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/stanoviska/Stan_2004_7_deklas_Ecoli.pdf)>.Datum stažení 03/2008.
- <sup>13</sup> VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J.: Speciální veterinární mikrobiologie. SZN, Praha 1989, 264 s.
- <sup>14</sup> HEJLÍČEK, K., VRTIAK, J.: Speciální epizootologie 1. SZN, Praha 1982, 320 s.
- <sup>15</sup> KUDVA, I.T, HUNT, C.W., WILLIAMS, C.J., NANCE, U.M., HOVDE, C.J.: Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. Appl. Environ. Microbiol. **10**, 3878-3886 (1997).
- <sup>16</sup> RADA, V.: Mikrobiální rizika krmiv [on line]. Vystaveno 09/2004 [citace 2008-03-17]. Dostupné z <<http://www.vuzv.cz/vyziva/studie11.rtf>>. Datum stažení 03/2008.
- <sup>17</sup> FOJTÍKOVÁ, M.: *Kalprotektin*. Noviny Onkologického centra J. G. Mendela, číslo VII, 09/2007. Dostupné z

---

<<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/noviny/noviny-09-2007.pdf>>, datum stažení 03/2008.

- 18 ŠPLÍCHAL, I., FAGERHOL, M.K., TŘEBICHAVSKÝ, I., ŠPLÍCHALOVÁ, A., SCHULZE, J.: The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiol.* **209**, 681-687 (2005).
- 19 ŠPLÍCHAL, I., TŘEBICHAVSKÝ, I., ŠPLÍCHALOVÁ, A., DÍTĚTOVÁ, L., ZAHRADNÍČKOVÁ, M.: *Escherichia coli* administered into pig amniotic cavity appear in fetal airways and attract macrophages into fetal lungs. *Physiol. Res.* **51**, 523-528 (2002).
- 20 VOTAVA, M., ČERNOHORSKÁ, M., HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., MEJZLÍKOVÁ, L., ONDROVČÍK, P., RŮŽIČKA, F., DVOŘÁČKOVÁ, M., WOZNICOVÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno 2003, 495 s.
- 21 FENG, B.S., HE, S.H., ZHENG, P.Y., WU, L., YANG, P.CH.: Mast cells play a crucial role in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan-induced diarrhea. *Am. J. Pathol.* **171**, 537-547 (2007).
- 22 MATTIX, M.E., HUNT, R.E., WILHELMSSEN, C.L., JOHNSON, A.J., BAZE, W.B.: Aerosolized staphylococcal enterotoxinB-induced pulmonary lesion rhesus monkeys (*Macacca mulatta*). *Toxicol. Pathol.* **23**, 262-268 (1995).
- 23 LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P., NYCHAS, G.-J.E.: A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 453-461 (2001).

- 
- 24 SKANDAMIS, P., KOUTSOUMANIS, K., FASSEAS, K., NYCHAS, G.-J.E.: Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 65-75 (2001).
- 25 CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V.: Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1914-1920 (2002).
- 26 RATLEDGE, C., WILKINSON, S.G.: *Microbial lipids*. Vol. 1, Academic Press, London 1988, s. 3-22.
- 27 WILKINSON, J.M., HIPWELL, M., RYAN, T., CAVANAGH, H.M.A.: Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 76-81 (2003).
- 28 DEANS, S.G., RITCHIE, G.: Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. of Food Microbiol.* **5**, 165-180 (1987).
- 29 HAO, Y.Y., BRACKETT, R.E., DOYLE, M.P.: Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.* **15**, 367-378 (1998).
- 30 HAO, Y.Y., BRACKETT, R.E., DOYLE, M.P.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* **61**, 307-312 (1998).
- 31 STECCHINI, M.L., SARAIS, I., GIAVEDONI, P.: Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Prot.* **56**, 406-409 (1993).
- 32 WAN, J., WILCOCK, A., COVENTRY, M.J.: The effect of essential oils of basil on growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 152-158 (1998).

- 
- 33 OUTTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A., PIETTE, G.-J.P, BÉGIN, A.: Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 155-162 (1997).
- 34 DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 308-316 (2000).
- 35 BRICOUT J.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* **41**, 901-202 (1974).
- 36 KÄMPF R., STEINEGGER E.: *Pharm. Acta. Helv.* **49**, 87-93 (1974).
- 37 OKELY H. M., GRUNDON M.: *J. Chem. Soc. D., Chem. Commun.* **1**, 157-158 (1971).
- 38 RAMADAN F. M., EL-ZANFALY R. T., EL-WAKEIL F. A., ALIAN A.M.: *Chem Mikrobiol. Technobiol. Lebensm.* **2**, 51-55 (1972).
- 39 GUNN J. W. C.: *J. Pharmacol. Ther.* **16**, 39-47 (1920).
- 40 ZÄNGLEIN A., SCHULTZE W.: *Z. Phytother.* **10**, 191-202.(1989).
- 41 WEISS E. A.: *Essential oil Crops., Victoria, Australia*, s. 235-259 (1997).
- 42 AGBAJE E. O.: Gastrointestinal effects of *Syzigium aromaticum* (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in animal models. *Nig. Q. J. Hosp. Med.* **18**, 137-141 (2008).
- 43 SULIEMAN A. M. E., EL BOSHRA I. M. O., EL KHALIFA E. A. A.: Nutritive value of clove (*Syzigium aromaticum*) and detection of antimicrobial effect of its bud oil. *Res. J. Microbiol.* **2**, 266-271 (2007).
- 44 BURT S. A., REINDERS R. D.: Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:117. *Lett. Applied. Microbiol.* **363**, 162-167 (2003).



- 
- 45 ELUJOBA A. A., ODELLEYE O. M., OGUNYEMI C. M.: Review: Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *Afr. J. Trad. CAM*, **2**, 46-61 (2005).
- 46 BLUMENTHAL M, ed.: The Complete Commission E Monographs, Therapeutic guide to herbal medicines. Boston, MA: Integrative Medicine Communications; s 110, (1998).
- 47 AKIRA T., TANAKA S., TABATA M.: Pharmacological studies on the antiulcerogenic activity of Chinese cinnamon. *Planta Med.* **52**, 440-443 (1986).
- 48 TANAKA S., YOON Y. H., FUKUI H.: Antiulcerogenic compounds isolated from Chinese cinnamon. *Planta Med.* **55**, 245-248 (1989).
- 49 Dostupné z: <<http://www.thirdage.com/healthguide/cinnamon>>, datum stažení 01/2009.
- 50 Dostupné z: <[http://www.herbdatanz.com/lemon\\_limon\\_bp1958.html](http://www.herbdatanz.com/lemon_limon_bp1958.html)>, datum stažení 01/2009.
- 51 MONDELLO L., DUGO G., DUGO P: *Perfum Lavor*, **21**, 25–49 (1996).
- 52 SELZER R., CHRISTOPH A. (1981)in: SCHREIER P. (Hrsg.): *Flavor '81*, 3rd Weurmann Symposium, Proceedings, Walter de Gruyter, Berlin, 1981.
- 53 LOTA M. L., DE ROCCA SERRA D., TOMI F., JACQUEMOND C., CASANOVA J. J.: New aldehydes and related alcohols in fresh lemon peel extract (*Citrus limon* L.). *Agric. Food Chem.* **50**, 796–805 (2002).
- 54 LIS-BALCHIN M., DEANS S. G., EAGLESHAM E.: Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour. Fragr. J.* **13**, 98–104 (1998).

- 
- 55 PRABUSEENIVASAN S., JAYAKUMAR S., IGNACIMUTHU S.: *In vitro* antibacterial activity of some plant essentials oils. *Compl. Alter. Med.* **6**,39 (2006).
- 56 MSAADA, K., HOSNI, K., TAARIT, M.B., CHAHED, T., KCHOUK, M.E., MARZOUK, B.: Changes on essential composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chem.* **102**, 1131-1134 (2007).
- 57 KULOVANÁ, E.: *Koriandr setý* [on line]. Vystaveno 13. 9. 2001 [citace 2008-03-19]. Dostupné z <[http://www.agroweb.cz/Koriandr-sety\\_\\_s44x10518.html](http://www.agroweb.cz/Koriandr-sety__s44x10518.html)>, datum stažení 03/2008.
- 58 BURDOCK G. A, CARABIN I. G.: Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 22-34 (2009).
- 59 HÄNSEL, H., KELLER, K., RIMPLER, H., SCHNEIDER, G (Eds.): Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1993, Vol. **5**, s. 115-130.
- 60 EAB: Eucalyptus oil – *Eucalypti aetheroleum*. European Pharmacopoeia, 5<sup>th</sup> Ed., 2005.
- 61 ESCOP. *Eucalypti aetheroleum*. In: Escop Monographs. 2<sup>nd</sup> ed. G. Thieme, Stuttgart 2003, s. 150-155.
- 62 JUERGENS, U.E., ENGELEN, T., RACKÉ, K., GILLISSEN, A., VETTER, H.: Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulm. Pharmacol. The rapeut.* **17**, 281-287 (2004).

- 
- 63 Dostupné z:  
<<http://www.auroma.com/catalog/ProfessionalEssentialOils/GeraniumEssentialOil/?gclid=CP6Zt8vHvpgCFUqS3wod-jPPZA>>, datum stažení 12/2008.
- 64 YAMAMOTO K., TAKASE H., ABE K., SAITO Y., SUZUKI A.: Pharmacological studies on antidiarrheal effects of a preparation containing berberine and geranii herba. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **101**, 169-75 (1993).
- 65 INOUE S., YAMAGUCHI H. & TAKIZAWA T.: Screening of the antimicrobial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using the modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.* **7**, 251-254 (2001).
- 66 BAROCELLI E., CALCINA F., CHIAVARINI M., IMPICCIATORE M., BRUNI R., BIANCHI A., BALLABENI V.: Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon „Grosso“ essential oil. *Life Sci.* **76**, 213-223 (2004).
- 67 LIS-BALCHIN M., HART S.: Studies on the mode of action of essential oil lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytother. Res.*, **13**, 540-542 (1999).
- 68 ---: DAC 86, 8. Ergänzungslieferung 1996.
- 69 BROPHY J. J., DAVIES N. W., SOUTHWELL I. A., STIFF I. A., WILLIAMS L. R.: Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1330-1335 (1989).
- 70 CARSON C. F., RILEY T. V.: Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* [review]. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 49-56 (1993).

- 
- <sup>71</sup> CARSON C. F., HAMMER K. A., RILEY T. V.: Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* **82**, 181–185 (1995).
- <sup>72</sup> CARSON S. F., RILEY T. V.: Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 24–25 (1994).
- <sup>73</sup> CARSON C. F., RILEY T. V.: Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 264-269 (1995).
- <sup>74</sup> WILLIAMS L., HOME V.: Factors determining the quality of tea tree oil in formulations for clinical use. *Aust. J. Med. Herbalism*, **7**, 57–62 (1995).
- <sup>75</sup> RAMAN A., WEIR U., BLOOMFIELD S. F.: Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 242–245 (1995).
- <sup>76</sup> Dostupné z: <<http://www.news-medical.net/?id=21941>>, datum stažení 12/2008.
- <sup>77</sup> SIKKEMA J., J. A. M. de BONT, POOLMAN B.: Mechanismus of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbil. Rev.*, **59**, 201-222 (1995).
- <sup>78</sup> CORRE J., LUCCHINI J. J., MERCIER G. M., CREMIEUX A.: Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res. Microbiol.* **141**, 483-97 (1990).
- <sup>79</sup> GILBERT P.: The revival of microorganisms sublethally injured by chemical inhibitors. *The revival of injured microbes*, Academic Press, London, U.K., 175-197 (1984).

- 
- 80 HAMMER K. A., CARSON C. F., RILEY T. V.: *In vitro* susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, J. Med. Vet. Mycol., **35**, 375-7 (1997).
- 81 Dostupné z:  
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127210>>,  
datum stažení 01/2009.
- 82 CARSON CH. F., MEE B. J., RILEY T. V.: Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and elektron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. **46**, 1914-1920 (2002).
- 83 HUGO W. B., LONGWORTH R.: Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J. Pharm. Pharmacol. **16**, 655-662 (1964).
- 84 COX S. D., MANN C. M., MARKHAM J. L., BELL H. C., GUSTAFSON J. E., WARMINGTON J. R., WYLLIE S. G.: The mode of antimicrobial action of the essential iol of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. **88**, 170-175 (2000).
- 85 FERRINI A. M., MANNONI V., AURELI P., SALVATORE G., PICCIRILLI E., CEDDIA T., PONTIERI E, SESSA R, OLIVA B.: *Melaleuca alternifolia* essential oil posseses potent anti-staphylococcal activity extended to strains resistant to antibiotics, Int. J. Immunopathol. Pharmacol. **19**, 539-44 (2006).
- 86 COX S. D., GUSTAFSON J. E., MANN C. M., MARKHAM J. L., LIEW Y. C., HARTLAND R. P., BELL H. C., WARMINGTON J. R., WYLLIE S. G.: Tea tree oil causes K<sup>+</sup> leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. **26**, 355-358 (1998).

- 
- 87 CARSON C. F., HAMMER K. A., RILEY T. V.: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin. Microbiol. Rev., **19**, 50-62 (2006).
- 88 YOSHINO, K., HIGASHI, N., KOGA, K.: Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract. J. Health Sci. **52**, 169-173 (2006).
- 89 Český lékopis 1997, Doplněk 1999 [CD]. Dostupné z <<http://faf.vfu.cz/html/docs/plants/terebinthinae/drog.html>>, <<http://faf.vfu.cz/html/docs/compounds/monoterpeny/tymol/index.html>>, datum stažení 03/2008.
- 90 EMEA 1998 – Committee for veterinary medicinal products (Summary report), Dostupné z: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/039798en.pdf>>. datum stažení 02/2008.
- 91 ESCOP: „Thymi herba“. Monographs on the medicinal uses of plant drugs. European Scientific Cooperative on Phytotherapy, Exeter 2003, 26 s.
- 92 REICHLING, J., GACHNIAN, R., FRATER, M., SALLER, R., DI CARLO, A., WIDMAIER, W.: Heilpflanzenkunde für Tierärzte. Springer Verlag Berlin, Heidelberg 2005, 283 s.
- 93 LEUNG, A.Y., S. FOSTER.: Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York 1996.
- 94 HagerROM 2006, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006.

- 
- <sup>95</sup> FRANZ, CH., BAUER, R., CARLE, R., TEDESCO, D., TUBARO, A., ZITTERL-EGLSEER, K.: Assesment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as additives for use in animal nutrition [on line], 246-259 Vystaveno 01/2005 [citace 2008-03-18].  
Dostupné z  
<[http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova\\_2/EFSA\\_feedap\\_report\\_plantsherbs.pdf](http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Kvasnickova_2/EFSA_feedap_report_plantsherbs.pdf)>, datum stažení 06/2009.
- <sup>96</sup> VAN DEN BROUCKE, C.O.: Action spasmodique des flavones de différentes espèces de *Thymus*. Plant. Med. Phytother., **16**, 310-317 (1983).
- <sup>97</sup> VAN DEN BROUCKE, C.O., LEMLI, J.A.: Pharmacological and chemical investigation of thyme liquid extracts. Planta Med. **41**, 129–135 (1981).
- <sup>98</sup> BERGER F.: Handbuch der Drogenkunde, Bd. V, Verlag für medizinische Wissenschaft, Wilhelm Maudrich, Wien, s. 235 - 243 (1960).
- <sup>99</sup> SCHINDLER H.: Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen, Editio Cantor, Aulendorf, s. 113–116 (1955).
- <sup>100</sup> HARWOOD LESCHER F.: Recent materia medica: Notes on their origin and therapeutics, (1891).
- <sup>101</sup> LERCHEN H.: Am. J. Pharm. **50**, 470 (1978), citováno dle [116 Schindler]
- <sup>102</sup> NIJLAND M.M.: Pharm. Weekblad. **98**, 301–312 (1963).
- <sup>103</sup> MESSANA I., LA BUA R., GALEFFI C.: Gazz. Chim. Ital. **110**, 539–543 (1980).

- 
- 104 GLEYE J., AHOND A., STANISLAS E.: *Phytochemistry*. **13**, 675–676 (1974).
- 105 WISNIEWSKI W., GORTA T.: Effect of temperature on the oxidation of hydrastine to hydrastinine in liquid extracts and rhizomes of *Hydrastis canadensis* in the presence of air and steam. *Acta Pol Pharm*, **26**, 313–317 (1969).
- 106 SCAZZOCCHIO F., COMETA M. F., TOMASSINI L., PALMERY M.: Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids. *Planta Med.* **67**, 561-564 (2001).
- 107 ---: Alternative medicine review: Berberine.5, 175-177 (2000).
- 108 Dostupné z: < [http://www.allwellness.de/goldenseal\\_overview.html#3](http://www.allwellness.de/goldenseal_overview.html#3)>, datum stažení 11/2009.
- 109 GOLOVKO, T.K., GARMASH, E.V., KURENKOVA, S.V., TABALENKOVA, G.N., FROLOV, YU.M.: *Rhaponticum carthamoides in vitro* in the European North-East (ecological and physiologic investigation). Komi Science Centre UrD RAS, Syktyvkar 1996, 140 s.
- 110 KOLEČKÁŘ V., OPLETAL L., BROJEROVÁ E., ŘEHÁKOVÁ Z., ČERVENKA F., KUBÍKOVÁ K., KŮČA K., JUN D., POLÁŠEK M., KUNEŠ J., JAHODÁŘ L.: Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **23**, 218-224 (2008).
- 111 LAFONT, R.: Phytoecdysteroids and world flora: Diversity, distribution, biosynthesis and evolution. *Russ. J. Plant. Physiol.* **45**, 276-295 (1998).



- 
- <sup>112</sup> GOLBRAIKH, A., BONCHER, D., TROPSHA, A.: Novel chirality descriptors derived from molecular topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 147-158 (2000).
- <sup>113</sup> TIMOFEEV, N.P.: *Leuzea carthamoides*: Introduction, questions and application prospects as biologically active additives. *Netradicionnyje prirodnyje resursy, innovacionnyje technologii i produkty, RANS*, **4**, 108-134 (2001).
- <sup>114</sup> ARNASON, A.: The botanical, medical, pharmacological, ethnological informations about herbs [on line], [citováno 2008-03-18]. Dostupné z <[http://www.keyherbs.org/leuzea\\_carthamoides\\_rhaponticum--01.htm](http://www.keyherbs.org/leuzea_carthamoides_rhaponticum--01.htm)>, datum stažení 03/2008.
- <sup>115</sup> VAVILOVA, P.P., KONDRATEV, A.A.: *Novyje kormovyje kultury. Rosselchozdat, Moskva 1975, s. 346.*
- <sup>116</sup> ŠELEPCOVÁ, L., SOMMER, A., VARGOVÁ, M.: Effect of feeding on a diet containing varying amounts of *Rhaponticum carthamoides* hay meal on selected morphological parameters in rats. *Eur. J. Entomol.* **92**, 391-397 (1995).
- <sup>117</sup> KOKOSKA, L., POLESNY, Z., RADA, V., NEPOVIM, A., VANEK, T.: Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharm.*, **82**, 51-53 (2002).
- <sup>118</sup> BIBIGUL, T. U., LISE-LOTTE, G.: Synthesis of (+)-agelasine D from (+)-manool. *Tetrahedron. Lett.*, **45**, 4233-5 (2004).
- <sup>119</sup> DELAQUIS, P. J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G.: Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**, 101-109 (2002).

- 
- 120 PAULI., A.: Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* **11**, 126-133 (2001).
- 121 BOUSSAADA, O., AMMAR, S., SAIDANA, D., CHRILAA, J., CHRAIF, I., DAAMI, M., HELAL, A. N., MIGHRI, Z.: Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiol. Res.* **163**, 87-95 (2008).
- 122 PRASOON, G., DINESH, K.Y., KIRAN, B.S., GUATAM, P., RAKESH, P.: Constituents of *Ocimum sanctum* with antistress activity. *J. Nat. Prod.*, **70**, 1410-1416 (2007).
- 123 KATZER, G., Vystaveno 5. 8. 2001 [citace 2008-03-19] Dostupné z <[http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Ocim\\_bas.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Ocim_bas.html)>, datum stažení 03/2008.
- 124 ---: <<http://www.sbepl.com/ocimum-sanctum.html>>, datum stažení 03/2008.
- 125 SCORTICHINI, M., ROSSI, M.P.: Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 109-112 (1991).
- 126 HOEFLER, C., FLEURENTIN, J., MORTIER, F., PELT, J.M., GUILLMAIN, J.: Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **19**, 133-43 (1987).
- 127 PECTU P.: Contributions on the phytochemistry of *Berberis dielsiana*. *Planta Med.*, **16**, s. 421 (1968).

- 
- 128 PECTU P., GOINA T.: New methods for extraction of alkaloids from *Berberis vulgaris*. *Planta Med.* **18**, 372-375 (1970).
- 129 YUSUPOV M. M., KARIMOV A., LUTFULLIN K. L.: Alkaloids of *Berberis vulgaris*. XII. *Khim. Prir. Soedin.*, s.128 (1990).
- 130 DÖPKE W.: Neue Alkaloide aus *Berberis vulgaris* L. *Naturwissenschaften.* **50**, 595 (1963).
- 131 SOUTHON I. W., BUCKINGHAM J., (Hrsg.): Dictionary of alkaloids. Capman and Hall, London (1989).
- 132 MANOLOV P., NIKOLOV N., MARKOV M., TONEVA M.: Experimental research on *Berberis vulgaris*. *Eksp. Med. Morfol.* **24**, s. 41 (1985).
- 133 DUKE J.A., AYENSU E.S.: Medicinal plants of China – Reference publications. ISBN 0-917256-20-4 (1985).
- 134 RABBANI G.H., BUTLER T., KNIGHT J., SANYAL S.C., ALAM K: Randomized control trial of *berberine sulfate* therapy for diarrhoea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, **155**, 979-984 (1987).
- 135 SUN D., COURTNEY H. D., BEACHEY E. H.: Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin and hexadecane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1370-1374 (1988).
- 136 SUN D., ABRAHAM S. N., BEACHEY E. H.: Influence of berberine sulfate on synthesis and expression of Pap fimbrial adhesin in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1274-1277 (1988).
- 137 ULTEE, A., SMID, E.J.: Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 373-378 (2001).

- 
- 138 UYANOGLU M., CANBEK M., ARAL E., HUSNU CAN BASER K.: Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomed.* **15**, 226-229 (2008).
- 139 JUVEN, B.J., KANNER, J., SCHVED, F., WEISSLOWICZ, H.: Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 626-631 (1994).
- 140 JONGBLOED A. W., MAIORANO R., WAGENAARS C. M. F.: Effect of several plant products on prevention of *E. coli* adhesion in the gastrointestinal tract of weaned piglets. ISSN 1570 – 8616 (2007). Dostupné z < <http://www.asg.wur.nl/NR/rdonlyres/F81D8745-6596-4296-A292-8553950E2B98/48316/62.pdf>>, datum stažení 12/2008.
- 141 LEE K. W., EVERTS H., KAPPERT H. J., BEYNEN A. C.: Growth performance of broiler chickens fed a carboxymethyl cellulose containing diet with supplemental carvacrol and/or cinnamaldehyde. *Int. J. Poultry Sci.* **3**, 619-622 (2004).
- 142 Dostupné z: <[http://www.henriettesherbal.com/eclectic/kings/piper-nigr\\_piperinum.html](http://www.henriettesherbal.com/eclectic/kings/piper-nigr_piperinum.html)>. Datum stažení 01/2009.
- 143 JOHRI R. K., THUSU N., KHAJURIA A., ZUTSHI U.: Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial cells. The status of gamma-glutamyl transpeptidase activity, uptake of amino acids and lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1401-1407 (1992).
- 144 KHAJURIA A., THUSU N., ZUTSHI U.: Piperine modulates permeability characteristics of intestine by including alterations in membrane dynamics :influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetice. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharmacol.* **9**, 224-231 (2002).

- 
- 145 SRINIVASAN K.: Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Critical Reviews in Food Sci. Nutri.*, **47**, 735-748 (2007).
- 146 PRADHAN K. J., VARIYAR P. S., BANDEKAR J. R.: Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *Leben. Wiss. Technol.* **32**, 121-123 (1999).
- 147 Dostupné z:  
<<http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Cinnamaldehyde>>, datum stažení 10/2008.
- 148 BLUMENTHALL M.: The complete comission E monographs, Therapeutic guide herbal medicines.: Integratus medicine communications, s. 110 (1998). Boston Mass.
- 149 ALLI S. M., KHAN A. A., AHMED. I., MUSADDIQ M., AHMED K. S., POLASA H., RAO L. V., HABIBULLAH CH. M., SECHI L. A., AHMED N.: Antimicrobial activities of *eugenol* and *cinnamaldehyde* against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann. Clin. Mikrobiol. Antimicrob.* **4**, 20 (2005).
- 150 CHARLES A. S., BASKARAN S. A., MURCOTT CH., SCHREIBER D., HOAGLAND T., VENKITANARAYANAN K.: Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle drinking water by *trans*-cinnamaldehyde. *Foodborne Pathog. Dis.*, **5**, 763-771 (2008).
- 151 BILLOVÁ V., NOVOTNÁ P., HERA A.: Minimalizace rizik používání vybraných skupin antimikrobiálních léčiv u potravinových zvířat, Finální dokument pro oficiální použití, s. 13 (2007).  
Dostupné z: <[http://www.vri.cz/userfiles/file/Ved\\_Vet\\_Vyb/Billova.pdf](http://www.vri.cz/userfiles/file/Ved_Vet_Vyb/Billova.pdf)>, datum stažení 01/2008.

- 
- <sup>152</sup> ROBERTS, J. D.: Six steps to antibiotic selection for nursery and finishing disease. Proc. NC Healthy Hogs Seminar, 63-78 (2000).  
Dostupné z:  
<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3745>, datum stažení 01/2008.
- <sup>153</sup> CARSON, C.F., COOKSON, B.D., FARRELLY, H.D., RILEY, T.V.: Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Antimicrob. Chemother. **35**, 421-424 (1995).
- <sup>154</sup> BURT, S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. **94**, 223-253 (2004).
- <sup>155</sup> HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. **86**, 985-990 (1999).

---

## ABSTRAKT

Váňová, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVIII. Antimikrobiální aktivita některých sekundárních metabolitů 2. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2009, 106 s.

Byla hodnocena antibakteriální aktivita čtyř vybraných rostlinných extraktů na růst *E. coli* O157:H7 a *Staphylococcus aureus*. Extrakty byly připraveny extrakcí 80% ethanolem a následnou perkolací. Pro určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) bylo použito dvou metod. V prvním případě nebylo dosaženo hodnot MIC očekávaných u *E. coli* na základě jiných literárních studií. Všechny vzorky v koncentračním rozmezí 5-0,005 ppm připravené ve dvou sériích byly negativní i po 48 hodinové expozici. Ve druhém případě bylo dosaženo u *E. coli* a *S. aureus* lepších výsledků. Byla připravena dvojková řada koncentrací v rozmezí 25-0,02 % ve dvou sériích. Nejnižší hodnoty MIC vykazoval extrakt z *Thymus vulgaris*, zejména vůči grampozitivnímu indikátorovému kmeni. Přesto zůstávaly hodnoty MIC velmi vysoké (3,13 % pro *E. coli*, 0,2 % pro *S. aureus*).

Pro určení minimální baktericidní koncentrace (MBC) u *E. coli* O157:H7 a *E. coli* O55 bylo zkoušeno sedm silic a dvě siličné složky ve dvojkové řadě koncentrací v rozmezí 2-0,03 % . Po expoziční době 15 minut a 24 hodin byla provedena inokulace vzorků na Müller-Hüntonův agar, přičemž u *E. coli* O157:H7 byl potvrzen baktericidní účinek všech testovaných silic a jejich komponent. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u silice skořicovníku ceylonského po 24 hodinové expozici (0,06 %).

U stejné silice bylo dosaženo nejnižší hodnoty MBC i u *E. coli* O55 po 24 hodinové expoziční době (0,12 %). U ostatních vzorků byla standardní hodnota MBC 0,25 %.

Pro stanovení MBC u *E. coli* O157:H7 a *S. aureus* bylo testováno deset nových rostlinných vzorků. Ve dvojkové řadě koncentrací v rozmezí 2-0,03 % byly mikroby exponovány vzorkům po dobu 15 minut a 24 hodin. Po následující inokulaci na Hünton-Müllerův agar a inkubaci dosáhl nejlepších výsledků *trans-*

---

cinnamaldehyd. Standardní hodnotu vzorků nebylo možné stanovit, neboť u většiny nedošlo ani k inhibičnímu působení na růst kolonií v Petriho misce.

**Klíčová slova:** sekundární metabolity rostlin, antimikrobiální aktivita, zemědělská produkce, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*



---

## ABSTRACT

Váňová, J.: Biological Activity of Plant Metabolites XVII. Antimicrobial Activity of Some Secondary Metabolites 2. Rigorous Thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2009, 106 pp.

The antibacterial activity of 4 selected plant extracts was evaluated against *E. coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. Extracts were prepared by extraction in 80% ethanol and subsequent percolation. Two methods were used for determination of minimal inhibitory concentration (MIC). In the first case the values of MIC expected for *E. coli* on the basis of the other literature studies were not reached. All samples within the concentration range of 5 – 0,005 ppm which were prepared in two series were negative even after 48 hours exposition. In the second case better results were reached for *E. coli* and *S. aureus*. Two series of serial twofold dilutions within the concentration range of 25 %-0.02 % were prepared. The lowest values of MIC were exhibited by *Thymus vulgaris* extract, especially against Gram-positive indicator strain. Nevertheless the values of MIC remain very high (3.13 % for *E. coli*, 0.2 % for *S. aureus*).

For determination of minimal bactericidal concentration (MBC) in *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O55 seven essential oils (EO) and two components of EO were tested in serial twofold dilutions within the concentration range of 2 %-0.03 %. The inoculation of samples on the Müller-Hüntén agar was carried out after 15 minutes and 24 hours exposition, whereas the bactericidal effect against *E. coli* O157:H7 was proved for all tested EO and their components. The best result was reached by Cinnamomi zeylanici EO after 24 hours exposition (0.06 %).

The lowest value of MBC for *E. coli* O55 after 24 hours exposition was also reached by the same EO. The standard value of MBC for other samples was 0.25 %.

---

Ten other samples were tested for the determination of MBC for *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*. The microbes were exposed for 15 minutes and 24 hours to the samples in the serial twofold dilutions within the concentration range 2-0.03 %. After inoculation of the samples on Müller-Hünton agar the *trans*-cinnamaldehyde reached the best results. It was impossible to determine the standard value of MBC for other samples, because most of them did not prove even the growth inhibition of colonies in Petri dishes.

**Keywords:** secondary metabolites of plants, antimicrobial activity, farm animals, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.