MASARYKOVA UNIVERZITA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Úloha prírodných látok pri eradikácii Staphylococcus aureus

Diplomová práca

MONIKA TREMBECKÁ

Vedúci práce: PharmDr. Gabriela Škovranová, Ph.D.

Ústav molekulární farmacie
Program Farmacie

Brno 2025

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor: Monika Trembecká
Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Ústav molekulární farmacie

Název práce: Úloha prírodných látok pri eradikácii Staphylococcus aureus

Studijní program: Farmacie

Vedoucí práce: PharmDr. Gabriela Škovranová, Ph.D.

Rok: 2025

Počet stran: 64

Klíčová slova: antimikrobiálna aktivita, prírodné látky, Staphylococcus aureus, synergie

Bibliographic record

Author: Monika Trembecká
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Molecular Pharmacy

Title of Thesis: The role of natural compounds in eradication of Staphylococcus aureus

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: PharmDr. Gabriela Škovranová, Ph.D.

Year: 2025

Number of Pages: 64

Keywords: antimicrobial activity, natural substances, Staphylococcus aureus, synergy

Anotácia

Diplomová práca sa zameriava na výskum antimikrobiálnych vlastností vybraných prírodných látok (PL), konkrétne prenylovaných fenolických látok, medzi ktoré patria flavonoidy a Diels-Alderové adukty (DAA), ako aj komerčne dostupných PL, voči rezistentným kmeňom *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Teoretická časť práce charakterizuje mikrobióm rán, jeho vplyv na hojenie tkanív, význam prospešných aj patogénnych mikroorganizmov v ranách, pričom osobitná pozornosť je venovaná baktérii *S. aureus* ako dominantnému patogénu kožných infekcií. Opisuje tiež topické antibiotiká (ATB) mupirocín a kyselinu fusidovú, ktoré zohrávajú významnú úlohu v terapii rán. V experimentálnej časti sa stanovovala minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) testovaných látok pomocou mikrodilučnej metódy a hodnotil sa synergický potenciál kombinácií PL s kyselinou fusidovou šachovnicovou titračnou metódou. Zistené výsledky vyzdvihujú potenciál prenylovaných fenolických látok v antimikrobiálnej terapii povrchových infekcií spôsobených *S. aureus*.

Abstract

This diploma thesis focuses on the research of antimicrobial properties of selected plant-derived substances, specifically prenylated phenolic compounds, including flavonoids and Diels-Alder adducts (DAA), as well as commercially provided substances, against resistant strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The theoretical part of the thesis characterizes the wound microbiome, its impact on tissue healing, and the role of both beneficial and pathogenic microorganisms in wounds, with particular attention paid to *S. aureus* as the dominant pathogen in skin infections. It also describes the topical antibiotics (ATBs) mupirocin and fusidic acid, which play a significant role in wound therapy. In the experimental part, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the tested compounds was determined using the microdilution method, and the synergistic potential of natural compounds in combination with fusidic acid was evaluated using the checkerboard titration method. The obtained results highlight the potential of prenylated phenolic substances in the antimicrobial therapy of superficial infections caused by *S. aureus*.

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému **Úloha prírodných látok pri eradikácii Staphylococcus aureus** spracovala sama**.** Všetky pramene a zdroje informácií, ktoré som použila k spísaniu tejto práce, boli citované v texte a sú uvedené v zozname použitej literatúry.

V Brne 15. apríla 2025 .....

Monika Trembecká

Poďakovanie

Chcela by som sa úprimne poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce PharmDr. Gabriele Škovranovej, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a ochotu, ktorú mi venovala počas celej tvorby tejto práce. Zvlášť ďakujem PharmDr. Alici Sychrovej, Ph.D., za nápad a inšpiráciu zahrnúť do testovania dve komerčne dostupné látky ako zástupcov fenolických a terpenických látok pre porovnanie s prenylovanými fenolickými látkami, ktoré sú stredobodom záujmu Ústavu prírodných liečiv Farmaceutickej fakulty Masarykovej univerzity. Rovnako ďakujem prof. MUDr. Helene Žemličkovej, Ph.D., za poskytnutie klinických izolátov *Staphylococcus aureus*, ktoré boli nevyhnutné pre experimentálnu časť tejto práce. Ďalej ďakujem Ústavu molekulárnej farmácie Masarykovej univerzity za poskytnutie materiálu, laboratórnych priestorov a prístrojového vybavenia na realizáciu výskumu. Táto práca bola čiastočne financovaná z projektu MUNI/A/1212/2022.

Obsah

Zoznam obrázkov 13

Zoznam tabuliek 14

Zoznam pojmov a skratiek 15

1 Úvod 17

2 Cieľ práce 18

3 Teoretická časť 19

3.1 ATB a rezistencia 19

3.1.1 Antimikrobiálna rezistencia 19

3.1.2 Mupirocín 19

3.1.3 Kyselina fusidová 20

3.2 Mikrobióm kože a rán 21

3.2.1 Kožný mikrobióm a jeho ochranné funkcie 21

3.2.2 Mikrobióm akútnych rán 21

3.2.3 Mikrobióm chronických rán 22

3.2.4 Biofilm v ranách 25

3.3 Staphylococcus aureus 25

3.3.1 Úloha *S. aureus* v patogenéze infekcií rán 25

3.3.2 Kožné infekcie spôsobené *S. aureus* 26

3.3.3 Diagnostika *S. aureus* spôsobujúcich infekcie 28

3.4 Antibakteriálne látky rastlinného pôvodu 30

3.4.1 *Morus* spp. 30

3.4.2 Flavonoidy 31

3.4.3 Biologická aktivita prenylovaných a geranylových flavonoidov 34

3.4.4 Diels-Alderove adukty (DAA) 35

3.4.5 Komerčne dostupné vybrané PL využívané vo farmaceutickej praxi 36

4 Experimentálna časť 38

4.1 Materiál 38

4.1.1 Testované mikroorganizmy 38
4.1.2 Rozpúšťadlá, chemikálie, kultivačné médiá 38
4.1.3 Testované PL a ATB 38
4.1.4 Prístroje 39
4.1.5 Pomôcky 40
4.2 Metódy 40
4.2.1 Príprava kultivačných médií a pevných živných pôd 40
4.2.2 Revitalizácia zmrazených bakteriálnych kultúr 41
4.2.3 Príprava inokula 41
4.2.4 Mikrodilučná metóda pre stanovenie MIC testovaných látok 41
4.2.5 Vyhodnotenie doštičiek a stanovenie MIC 42
4.2.6 Testovanie synergií PL v kombinácii s ATB 43
4.2.7 Vyhodnotenie synergií a stanovenie FIC 44
4.3 Výsledky 45
4.3.1 Výsledky MIC PL a ATB 45
4.3.2 Výsledky synergického testovania PL s ATB 46

5 Diskusia **49**

6 Záver **52**

Použité zdroje **53**

Príloha A Poster – Phytochemical Society of Europe – Trends in Natural Products 2024 **62**

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Dočasné krytie popáleniny (18) 23
Obrázok 2: Preležanina na predlaktí (21) 24
Obrázok 3: Diabetická noha (22) 24
Obrázok 4: Impetigo postihujúce detskú tvár (33) 26
Obrázok 5: *Sycosis barbae* (32) 27
Obrázok 6: Primárny absces (32) 27
Obrázok 7: Erysipel a celulitída (34) 28
Obrázok 8: Kolónie *S. aureus* na agare s manitolom a soľou (40) 29
Obrázok 9: Test na koagulázu (46) 30
Obrázok 10: Listy a plody moruše bielej (56) 31
Obrázok 11: Základná štruktúra flavonoidov (vlastná tvorba) 32
Obrázok 12: Chemické štruktúry testovaných PL a ATB (vlastná tvorba) 39
Obrázok 13: Nárast kolónií *S. aureus* po 24 hodinách (foto autor) 41
Obrázok 14: Schéma mikrotitračnej doštičky na stanovenie MIC (vlastná tvorba) 42
Obrázok 15: Stanovenie MIC vybraných PL (foto autor) 43
Obrázok 16: Design mikrotitračnej doštičky na testovanie synergií (vlastná tvorba) 44
Obrázok 17: Stanovenie FICi pomocou zafarbenia TTC (foto autor) 46

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Interpretácia výsledkov indexu FIC 45
Tabuľka 2: Zistené MIC PL a ATB 45
Tabuľka 3: Výsledky synergického testovania PL s ATB 47

Zoznam pojmov a skratiek

A. baumanii	–	*Acinetobacter baumannii*
AMR	–	antimikrobiálna rezistencia
ATB	–	antibiotikum
C. albicans	–	*Candida albicans*
CFU	–	kolónie tvoriace jednotky
DAA	–	Diels-Alderove adukty
DMSO	–	dimethylsulfoxid
E. coli	–	*Escherichia coli*
EF-G	–	elongačný faktor G
EGCG	–	epigalokatechín galát
EPS	–	extracelulárne polymérne látky
EUCAST	–	Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti
FIC	–	frakčná inhibičná koncentrácia
LDL	–	lipoproteín nízkej hustoty
MALDI-TOF MS	–	hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou s použitím matrice a detektorom doby letu
MHB	–	Mueller-Hinton Broth
MIC	–	minimálna inhibičná koncentrácia
MRSA	–	meticilín rezistentný *Staphylococcus aureus*
NF-κB	–	nukleárny faktor kappa B
P. aeruginosa	–	*Pseudomonas aeruginosa*
PCR	–	polymerázová reťazová reakcia
PL	–	prírodné látky
ROS	–	reaktívne formy kyslíka
SA	–	klinický izolát *Staphylococcus aureus*
S. aureus	–	*Staphylococcus aureus*
S. epidermis	–	*Staphylococcus epidermidis*

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

TTC – 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid

1 Úvod

Antibiotická rezistencia patrí medzi najväčšie výzvy súčasnej medicíny, pričom ovplyvňuje účinnosť liečby u mnohých infekcií. Tento problém sa rozšíril aj na topické antibiotiká (ATB), ktoré sa bežne používajú pri terapii kožných infekcií. V dôsledku toho je nevyhnutné hľadať nové terapeutické prístupy. Jedným z nich je využitie prírodných látok (PL), ktoré vďaka svojmu antimikrobiálnemu, protizápalovému a antioxidačnému potenciálu predstavujú perspektívny nástroj v boji proti rezistentným baktériám. Kožné infekcie spôsobené baktériou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) najmä jej meticilín rezistentnými kmeňmi (MRSA), sú častou komplikáciou pri liečbe rán. Tieto infekcie môžu zhoršiť proces hojenia a predĺžiť dobu zotavenia. Mikrobióm kože a rán zohráva kľúčovú úlohu v tomto procese, pričom niektoré mikroorganizmy, ako *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) a *Corynebacterium* spp., môžu podporovať hojenie. Dysbióza (narušená nerovnováha mikrobiálneho prostredia) v ranách však môže viesť k rozvoju chronických infekcií a vážnych komplikácií.

Prenylované fenolické zlúčeniny izolované z rastlín rodu *Morus* predstavujú sľubnú skupinu látok s rôznorodými biologickými účinkami. Tieto látky vykazujú schopnosť narúšať bakteriálne membrány, inhibovať tvorbu biofilmu a modulovať zápalové procesy, čím podporujú hojenie rán. Kombinácia PL s konvenčnými ATB, ako je napr. kyselina fusidová, by mohla navyše zlepšiť účinnosť liečby a znížiť dávky antibiotík potrebné na prekonanie infekcie.

Táto diplomová práca sa zameriava na testovanie antibakteriálneho účinku vybraných PL a ich synergického potenciálu s kyselinou fusidovou. Testovanie zahŕňalo stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) a hodnotenie vzájomných interakcií s cieľom prispieť k vývoju efektívnych kombinácií látok pre topickú liečbu infekcií spôsobených rezistentnými kmeňmi *S. aureus*.

2 Cieľ práce

Cieľom teoretickej časti bolo charakterizovať mikrobióm rán a jeho vplyv na proces hojenia so zameraním na význam mikroorganizmov pri chronických a akútnych infekciách. Osobitná pozornosť bola venovaná baktérii *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), ktorá je typickým patogénom spôsobujúcim infekcie rán.

Teoretická časť zahŕňala aj popis topicky aplikovaných antibiotík, mupirocínu a kyseliny fusidovej, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri liečbe infekcií spôsobených rezistentnými kmeňmi *S. aureus*. Zároveň boli predstavené vybrané prenylované fenolické látky – flavonoidy a Diels-Alderove adukty (DAA) izolované z rodu *Morus*, ako aj komerčne dostupné PL – dvaja zástupcovia zo skupiny fenolických a terpenických látok. Zdôraznený bol ich antibakteriálny, protizápalový a antioxidačný potenciál a význam v terapii rán.

V experimentálnej časti práce bolo cieľom stanoviť antibakteriálny účinok vybraných PL a ATB voči rezistentným kmeňom *S. aureus*. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) bola stanovená mikrodilučnou metódou. Synergický potenciál testovaných PL s kyselinou fusidovou bol hodnotený šachovnicovou metódou, s cieľom navrhnúť možnosť zvýšenia účinnosti antibiotík.

3 Teoretická časť

3.1 ATB a rezistencia

3.1.1 Antimikrobiálna rezistencia

Antimikrobiálne látky, medzi ktoré patria ATB, antivirotiká, antimykotiká a antiparazitiká, predstavujú skupinu liečiv určených na terapiu infekčných ochorení u ľudí, zvierat a rastlín (1).

Antimikrobiálna rezistencia (AMR) sa definuje ako stav, kedy mikroorganizmy, vrátane baktérií, vírusov, húb a parazitov, strácajú citlivosť na pôsobenie antimikrobiálnych liečiv. Tento fenomén vedie k zníženej účinnosti alebo úplnej strate účinku týchto látok, čo spôsobuje, že infekcie sú náročnejšie na liečbu alebo sú neliečiteľné. Výsledkom je zvýšené riziko šírenia infekčných ochorení, závažnejšie zdravotné komplikácie, dlhodobé následky a vyššia mortalita (2).

Vznik a šírenie AMR je prirodzený biologický proces podmienený genetickými zmenami v patogénoch. Tento proces je však významne urýchlený ľudskou aktivitou, predovšetkým nesprávnym a nadmerným používaním antimikrobiálnych látok v humánnej a veterinárnej medicíne (2).

3.1.2 Mupirocín

Mupirocín patrí medzi topické ATB, ktoré sa používajú pri liečbe rôznych infekcií kože a mäkkých tkanív. Tento liek bol vyvinutý v 70. rokoch 20. storočia a pochádza z baktérie *Pseudomonas fluorescens*. Je najpoužívanejším lokálnym ATB na svete, najmä v prípadoch infekcií spôsobených MRSA. Mupirocín je mimoriadne účinný pri liečbe impetiga, pričom pri správnom podaní eliminuje infekčné symptómy vo viac ako 85 % prípadov. Okrem toho sa mupirocín využíva aj na podporu procesu hojenia rán, čo sa pripisuje jeho schopnosti stimulovať proliferáciu keratinocytov, čím prispieva k regenerácii poškodeného tkaniva (3).

Mupirocín vykazuje svoju antimikrobiálnu aktivitu inhibíciou izoleucyl-tRNA syntetázy, čím zabraňuje tvorbe izoleucyl-tRNA potrebnej na syntézu bakteriálnych proteínov. Táto inhibícia nastáva v dôsledku štrukturálnej podobnosti medzi bočným reťazcom mupirocínu a prirodzeným substrátom izoleucyl-tRNA syntetázy, čo umožňuje mupirocínu viazať sa na aktívne miesto enzýmu. Výsledkom je vyčerpanie zásob izoleucyl-tRNA, čo vedie k zastaveniu syntézy proteínov. Tento proces vedie k deštrukcii bakteriálnej bunky, najmä pri vysokých koncentráciách mupirocínu, čím sa zabraňuje ďalšiemu množeniu baktérií (4).

Rezistencia na mupirocín vzniká rôznymi mechanizmami, ktoré ovplyvňujú jeho účinnosť pri inhibícii syntézy proteínov v baktériách. Primárnym mechanizmom je

mutácia v géne *ileS*, ktorý kóduje cieľový enzým izoleucyl-tRNA syntetázu. Tieto mutácie spôsobujú štrukturálne zmeny enzýmu, čím znižujú schopnosť mupirocínu viazať sa na jeho aktívne miesto. Výsledkom je zachovanie funkčnosti syntetázy aj v prítomnosti ATB, čo umožňuje baktériám prežiť a pokračovať v syntéze proteínov. Ďalším mechanizmom je získanie génov *mupA* alebo *mupB* prostredníctvom horizontálneho prenosu génov. Tieto gény kódujú alternatívne formy izoleucyl-tRNA syntetázy, ktoré sú odolné voči inhibícii mupirocínom. Baktérie exprimujúce tieto gény sú schopné syntetizovať proteíny nezávisle od inhibičného účinku mupirocínu. Tieto gény sú často prítomné na plazmidoch, čo uľahčuje ich šírenie medzi baktériami a následne zvyšuje riziko vzniku rezistencie v populácii mikroorganizmov (4).

Rezistencia na mupirocín sa prejavuje v rôznej miere. Nízka úroveň rezistencie je obvykle spôsobená bodovými mutáciami v géne *ileS*, zatiaľ čo vysoká úroveň rezistencie je spojená prítomnosťou génov *mupA* alebo *mupB*. Táto vysoká úroveň rezistencie predstavuje závažný problém najmä pri liečbe infekcií spôsobených MRSA, pretože významne obmedzuje terapeutické možnosti (4).

3.1.3 Kyselina fusidová

Kyselina fusidová je steroidné ATB patriace do triedy fusidánov, ktoré bolo prvýkrát izolované z huby *Fusidium coccineum* v 60. rokoch 20. storočia. Vďaka svojej štruktúre a mechanizmu účinku je špecificky určená na liečbu infekcií spôsobených baktériami rodu *Staphylococcus*, vrátane MRSA. Táto selektivita z nej robí dôležitý terapeutický nástroj pri liečbe závažných stafylokokových infekcií. V klinickej praxi sa kyselina fusidová používa najmä pri liečbe kožných infekcií, ako sú celulitída, impetigo a folikulitída. Ďalej sa aplikuje pri očných infekciách, napríklad pri konjunktivitíde, kde preukázala vysokú efektivitu. Schopnosť prenikať do kostného tkaniva umožňuje využitie kyseliny fusidovej pri terapii chronických infekcií kostí a kĺbov, akými sú napr. osteomyelitída a septická artritída. Tieto vlastnosti ju robia vhodnou pre dlhodobú liečbu komplikovaných infekcií, najmä v prípadoch, keď iné ATB zlyhávajú (5).

Kyselina fusidová pôsobí na bakteriálnu proteosyntézu prostredníctvom inhibície elongačného faktora G (EF-G), ktorý je kľúčový pre translokáciu peptidového reťazca počas syntézy proteínov. Väzbou na EF-G vo forme EF-G-guanozín-difosfátu, kyselina fusidová blokuje presun peptidového reťazca z A miesta na P miesto ribozomálnej podjednotky 30S. Súčasne zasahuje aj do procesu disociácie ribozomálneho komplexu po syntéze proteínu, čím narúša jeho uvoľnenie z ribozómu. Tento dvojitý mechanizmus spôsobuje zastavenie proteosyntézy a vedie k smrti bakteriálnej bunky (5).

Rezistencia na kyselinu fusidovú vzniká primárne mutáciami v géne *fusA*, ktorý kóduje EF-G. Tieto mutácie vedú k štrukturálnym zmenám väzobného miesta EF-G, čím sa znižuje afinita kyseliny fusidovej. Alternatívne mechanizmy rezistencie zahŕňajú gén *fusB*, ktorý chráni EF-G pred inhibičným účinkom kyseliny fusidovej. Horizontálny

prenos génov rezistencie medzi baktériami vedie k zníženiu terapeutickej účinnosti kyseliny fusidovej a predstavuje významný problém v klinickej praxi (5).

3.2 Mikrobióm kože a rán

3.2.1 Kožný mikrobióm a jeho ochranné funkcie

Kožný mikrobióm je zložený z rozmanitých mikroorganizmov, ktoré žijú na povrchu pokožky a zohrávajú zásadnú úlohu v udržiavaní homeostázy kože a ochrane proti patogénom (6). Tieto prospešné mikroorganizmy sú nevyhnutné pre zabezpečenie správnej funkcie kožnej bariéry, pretože pôsobia ako konkurencia pre patogénne mikroorganizmy, čím obmedzujú ich schopnosť kolonizovať pokožku. V prípade narušenia tejto rovnováhy nezdravými návykmi, zmenou pH pokožky alebo antibiotickou liečbou, môže dôjsť k vzniku kožných ochorení, ako je dermatitída či akné, kde patogénne baktérie nadobudnú prevahu a môžu spôsobiť zápal (7).

Okrem toho kožný mikrobióm podporuje funkcie imunitného systému tým, že moduluje zápalové procesy, čím prispieva k prevencii vzniku zápalových kožných ochorení. Mikroorganizmy ako *S. epidermidis* alebo *Corynebacterium* spp. produkujú antimikrobiálne peptidy, ktoré chránia pokožku pred agresívnymi patogénmi a posilňujú jej prirodzené obranné mechanizmy (7).

3.2.2 Mikrobióm akútnych rán

Mikrobióm akútnych rán je charakterizovaný nízkou diverzitou mikroorganizmov, ktoré sú prítomné v týchto ranách krátko po ich vzniku, zvyčajne v dôsledku úrazu alebo chirurgických zákrokov. Akútne rany, ktoré sa hoja v priebehu niekoľkých týždňov, obsahujú prevažne prospešné baktérie ako *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp. *a Propionibacterium* spp. (8,9).

S. epidermidis zohráva kľúčovú úlohu v ochrane rany pred infekciami. Tento mikroorganizmus stimuluje imunitnú odpoveď, čím bráni osídleniu patogénmi a zároveň podporuje proces hojenia. Pri kontakte s keratinocytmi zlepšuje obranyschopnosť pokožky, čím napomáha rýchlejšej regenerácii poškodených tkanív. Okrem toho ovplyvňuje aj ďalšie dôležité procesy, ako je zlepšenie prekrvenia a tvorba nového tkaniva, a tým urýchľuje regeneráciu a obnovu kože (9).

Corynebacterium spp., bežná súčasť mikrobioty pokožky človeka, sa ukázali ako aktivátory kožného imunitného systému. Tento proces spočíva v interakcii mykolovej kyseliny, dôležitej zložky bunkovej steny *Corynebacterium* spp., s receptormi imunitného systému pokožky, čo vedie k jeho aktivácii. Týmto spôsobom prispieva k ochrane kože a podpore imunitnej odpovede, čo môže mať pozitívny vplyv na hojenie rán (8).

Propionibacterium spp. produkujú propionovú kyselinu, ktorá prispieva k udržaniu kyslého prostredia v pilosebaceóznych folikuloch. Tento pokles pH vytvára nepriaznivé podmienky pre iné mikroorganizmy, čím bráni ich kolonizácii. Okrem toho tieto baktérie produkujú bakteriocíny, ktoré inhibujú rast mikróbov v mazových žľazách. Týmto spôsobom *Propionibacterium* spp. podporuje ochranu pokožky pred infekciami a zároveň udržiava rovnováhu mikrobiómu, čo prispieva k lepšiemu hojeniu rán (8).

V akútnych ranách je dôležité zachovať rovnováhu medzi prospešnými mikroorganizmami a patogénmi. Ak sa táto rovnováha naruší, môže dôjsť k rýchlej kolonizácii patogénmi, ako je *S. aureus*, ktoré môžu zhoršiť proces hojenia. Keď sa táto rovnováha naruší, zvyšuje sa riziko infekcie, čo môže predĺžiť hojenie a spôsobiť komplikácie (10).

3.2.3 Mikrobióm chronických rán

Na rozdiel od akútnych rán, kde je mikrobióm zvyčajne vyvážený, v chronických ranách dochádza k narušeniu tejto rovnováhy. Chronické rany, ako sú diabetické vredy na nohách, dekubity alebo rany spojené so zápalovými ochoreniami, sa vyznačujú komplexnejším mikrobiómom, ktorý je často podmienený prítomnosťou vysokého podielu patogénnych mikroorganizmov. Medzi hlavné príčiny, ktoré prispievajú k tomuto stavu, patrí hyperglykémia, periférna neuropatia, cievne poruchy a oslabená imunita. Tieto podmienky nielenže spomaľujú proces hojenia, ale tiež zvyšujú riziko chronických infekcií a ďalších komplikácií. Medzi najčastejšie izolované patogény v chronických ranách patria *S. aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, ktoré často tvoria biofilmy (11).

Biofilmy sú štruktúry, ktoré baktérie tvoria na povrchu rany a ktoré ich chránia pred imunitnými mechanizmami hostiteľa a ATB (11). Tvorba biofilmov výrazne sťažuje liečbu a predlžuje čas potrebný na hojenie rany, pretože baktérie v biofilme sú menej dostupné pre liečebné zásahy a odolávajú antibiotickej terapii (12). Okrem vyššie uvedených faktorov môžu na stav chronických rán vplývať aj ďalšie systémové ochorenia, ako je diabetes mellitus, obezita alebo potlačená imunita, ktoré podporujú chronifikáciu rán. Tieto podmienky znižujú schopnosť tela efektívne reagovať na infekcie a obnovovať poškodenú pokožku, čo vedie k dlhodobým problémom s hojením (13).

Popáleniny

Popáleniny predstavujú závažné poranenia kože a podkožných tkanív spôsobené pôsobením tepla, elektriny, chemikálií alebo žiarenia. Okrem primárneho poškodenia tkanív popáleniny narúšajú aj prirodzenú bariérovú funkciu kože, čo zvyšuje riziko infekcií (14).

Popáleniny u pacientov s diabetes mellitus predstavujú komplexný problém, ktorého priebeh negatívne ovplyvňuje samotná povaha diabetu. U týchto pacientov je hojenie popálenín obmedzené zníženou mikrocirkuláciou, čo vedie k obmedzenej schopnosti tkanív regenerovať a k spomalenému prekrveniu rán. Miestny deficit kyslíka a živín spojený so zníženým prekrvením vedie k spomalenej regenerácii tkaniva a zvyšuje riziko vzniku nekrózy v postihnutých oblastiach (15). Popáleniny môžu spôsobiť poruchy v nervových zakončeniach v mieste poranenia, čo môže mať za následok stratu citlivosti v týchto oblastiach. Diabetická neuropatia, ktorá výrazne ovplyvňuje vnímanie bolesti a vnímanie poranení môže spôsobiť, že pacienti majú predĺžený kontakt s tepelným zdrojom, napríklad s vyhrievanými predmetmi, čo vedie k rozsiahlym dermálnym popáleninám (16). Znížená schopnosť imunitného systému efektívne bojovať proti infekciám, výrazne ovplyvnená hyperglykémiou, zvyšuje riziko infekcie v mieste popálenín. Z tohto dôvodu sa popáleniny u diabetikov často stávajú miestom výskytu závažných infekcií, ktoré môžu viesť k rozvoju systémových komplikácií, ako je sepsa alebo k tvorbe chronických vredov, vyžadujúcich dlhodobú a komplexnú liečbu (15).

Medzi najčastejšie patogény infikujúce popáleniny patrí MRSA, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a rôzne rody z čeľade *Enterobacteriaceae* (napr. *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Okrem bakteriálnych patogénov sa v popáleninách môžu vyskytovať aj mikroskopické huby ako *Candida albicans*, ktoré prispievajú k rozvoju nozokomiálnych infekcií (17).

Obrázok 1: Dočasné krytie popáleniny (18)

Dekubity

Preležaniny, známe aj ako dekubity, predstavujú závažný klinický problém, ktorý vedie k vysokému výskytu morbidity a mortality, najmä v prípade pacientov s komorbiditami (19). Tieto rany vznikajú v dôsledku dlhodobého tlaku na kožu a podkožné tkanivá, čo narúša prietok krvi a vedie k ischemickému poškodeniu tkanív (20). Preležaniny sa najčastejšie vyskytujú u pacientov s ťažkým zdravotným stavom,

dlhodobo hospitalizovaných alebo s invazívnym lekárskym zariadením, ktoré môže komplikovať stav pacienta. Mikroorganizmy ako *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *A. baumannii* sú typickými pôvodcami infekcií, pričom kolonizácia preležanín týmito mikroorganizmami môže prispieť k zvýšenému riziku vzniku multirezistentných infekcií, najmä v dôsledku prostredia rany s nekrotickým tkanivom a zníženým prekrvením, ktoré podporuje rast a šírenie rezistentných kmeňov (19).

Obrázok 2: Preležanina na predlaktí (21)

Diabetické vredy

Diabetické vredy predstavujú závažnú komplikáciu u pacientov s diabetes mellitus, často vedúcu k amputáciám dolných končatín, zníženej kvalite života a zvýšenej úmrtnosti. Nekontrolovaný diabetes mellitus môže viesť k poruchám imunitného systému, vrátane zníženej aktivity makrofágov, čo spomaľuje proces hojenia a zvyšuje náchylnosť na infekcie. Počas infekcie baktérie osídľujú okraje a vnútro rany. Pri prekročení kritického množstva baktérií (10^5 baktérií na gram tkaniva) dochádza k poškodeniu tkaniva v dôsledku uvoľňovania zápalových cytokínov. V týchto podmienkach reagujú baktérie, ako napr. *S. aureus* a *P. aeruginosa,* na nepriaznivé prostredie tvorbou biofilmu (19).

Obrázok 3: Diabetická noha (22)

3.2.4 Biofilm v ranách

Biofilmy predstavujú komplexné, vysoko organizované mikrobiálne spoločenstvá, ktoré sa viažu na biotické a abiotické povrchy. Matrix biofilmu *S. aureus* je tvorený extracelulárnymi polymérnymi látkami (EPS), pozostávajúcimi z polysacharidov, proteínov a extracelulárnej DNA. Matrix biofilmu poskytuje bakteriálnym bunkám stabilitu a ochranu pred nepriaznivými faktormi, vrátane ATB, imunitných odpovedí hostiteľa či dezinfekčných prostriedkov. EPS tiež uľahčuje komunikáciu medzi baktériami, čo je kľúčové pre ich prežitie v nepriaznivých podmienkach (23).

Biofilmy vytvárané *S. aureus* sú mimoriadne odolné voči pôsobeniu ATB, čo významne komplikuje liečbu infekcií (24). Táto rezistencia je spôsobená kombináciou fyzických, chemických a biologických faktorov. Matrix biofilmu funguje ako fyzická bariéra, ktorá obmedzuje difúziu ATB do vnútorných vrstiev biofilmu. Táto bariéra nielen spomaľuje prienik liečiv, ale zároveň umožňuje baktériám vo vnútorných častiach biofilmu vyhnúť sa priamemu kontaktu s ATB. Dôležitú úlohu v rezistencii zohráva aj fenotypová heterogenita buniek v biofilme. Povrchové bunky biofilmu sú metabolicky aktívnejšie, čo ich robí citlivejšími na ATB. Naopak, bunky vo vnútorných vrstvách biofilmu sú často v stave nízkej metabolickej aktivity a vykazujú zvýšenú odolnosť. Tento fenomén je dôsledkom obmedzeného prístupu živín a kyslíka do hlbších častí biofilmu, čo vedie k vzniku tzv. perzistentných buniek. Tieto bunky sú schopné prežiť vysoké koncentrácie ATB, ktoré by inak zničili voľne plávajúce (planktonické) baktérie (12).

Biofilmy predstavujú významnú komplikáciu pri infekciách rán, najmä diabetických. Hyperglykémia podporuje rast a proliferáciu mikroorganizmov, najmä *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Tieto patogény sa prichytia na povrch rany a začnú produkovať EPS (25). Výsledný biofilm nielenže zasahuje do kľúčových procesov hojenia, ako je migrácia keratinocytov, ukladanie kolagénu a re-epitalizácia, ale tiež zvyšuje riziko vzniku systémovej infekcie alebo sepsy (26).

3.3 *Staphylococcus aureus*

3.3.1 Úloha *S. aureus* v patogenéze infekcií rán

S. aureus je grampozitívna, anaeróbna baktéria, ktorá kolonizuje kožu a sliznice ľudí, často bez klinických príznakov. Napriek tomu je tento mikroorganizmus významným pôvodcom širokého spektra infekcií, ako sú abscesy, celulitída a folikulitída, pneumónia, endokarditída, osteomyelitída a sepsa (27). Schopnosť vytvárať biofilm a produkovať rôzne toxíny, medzi ktoré patria hemolyzíny a enterotoxíny, významne prispieva k virulencii patogéna. Tieto toxíny môžu aktivovať imunitný systém a vyvolať zápal. Zároveň môžu poškodzovať bunkové membrány a spôsobiť nekrózu tkanív (28). Významným faktorom patogenity *S. aureus* je aj produkcia exotoxínov,

ktoré sú spojené so syndrómom toxického šoku, čo je život ohrozujúci stav spôsobený uvoľňovaním veľkého množstva toxínov do krvného obehu (29).

S. aureus je známy svojou vysokou schopnosťou adaptovať sa na rôzne prostredia a imunitnú odpoveď hostiteľa, čo vedie k vývoju rezistentných kmeňov, vrátane MRSA. Šírenie multirezistentných kmeňov MRSA sa stalo závažným globálnym problémom, najmä v nemocničnom prostredí, kde sa šíri medzi pacientmi a zdravotníckym personálom (30). Pacienti s oslabeným imunitným systémom alebo jedinci trpiaci chronickými ochoreniami, ako napr. diabetes mellitus, sú vystavení vyššiemu riziku kolonizácie a následne vzniku infekcií spôsobených týmto patogénom. Tieto komorbidity oslabujú schopnosť organizmu efektívne bojovať proti infekcii, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť výskytu komplikovaných, ťažko liečiteľných infekcií (31).

3.3.2 Kožné infekcie spôsobené *S. aureus*

Infekcie kože spôsobené *S. aureus* môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne. Primárne infekcie, známe aj ako spontánne kožné infekcie, sa vyskytujú bez predchádzajúcich viditeľných lézií alebo ako dôsledok minimálnych kožných poranení. Medzi tieto infekcie patrí napr. impetigo, folikulitída, vredy alebo primárne abscesy. Sekundárne infekcie vznikajú ako následok existujúceho kožného poškodenia a zahŕňajú impetiginizáciu (šírenie impetiga na poškodenú kožu), sekundárne abscesy, lymfangitídu, celulitídu a sekundárne infekcie rán (32).

Impetigo je povrchová kožná infekcia spôsobená *S. aureus* alebo *Streptococcus pyogenes*. Najčastejšie postihuje deti a prejavuje sa tvorbou pľuzgierov, ktoré praskajú a vytvárajú žlté chrasty. Infekcia sa zvyčajne vyskytuje na tvári, rukách alebo okolo úst, ale môže sa rozšíriť aj na iné časti tela. Impetigo nie je často sprevádzané systémovými symptómami, hoci v niektorých prípadoch môže byť sprevádzané miernym svrbením alebo bolestivosťou v mieste infekcie (32).

Obrázok 4: Impetigo postihujúce detskú tvár (33)

Folikulitída je zápalové ochorenie, ktoré sa zvyčajne prejavuje vznikom povrchovej pustuly obklopujúcej vlasový folikul. Môže postihovať rôzne časti tela s hustým ochlpením, ako sú stehná, ruky alebo perineum. Ak sa infekcia rozšíri napr. holením, vzniká *sycosis barbae*, špecifická forma na tvári, charakterizovaná rozsiahlymi chronickými léziami. Pri závažnejšom priebehu folikulitídy môže dôjsť k tvorbe vredu, ktorý postihuje celý folikul. Vred sa prejavuje ako bolestivá papula, okolo ktorej sa vytvára pľuzgier. V priebehu niekoľkých dní sa tvorí hnis spojený s nekrózou tkaniva (32).

Obrázok 5: *Sycosis barbae* (32)

Absces, zvyčajne spôsobený bakteriálnou infekciou, je lokalizované nahromadenie hnisu, ktoré môže vzniknúť v rôznych častiach tela, vrátane kože. Tieto abscesy sú charakterizované bolesťou, začervenaním alebo opuchom. Abscesy sa často musia chirurgicky otvoriť, aby sa odstránil nahromadený hnis a urýchlil proces hojenia (32).

Obrázok 6: Primárny absces (32)

Erysipel a celulitída sú príbuzné syndrómy, pričom erysipel predstavuje formu celulitídy, ktorá nie je hnisavá. Erysipel sa taktiež rozširuje iba na povrchovú dermis

a pridružené lymfatické cievy, zatiaľ čo celulitída zasahuje do všetkých vrstiev kože. Obe ochorenia sa prejavujú podobnými symptómami, ako sú opuch, začervenanie a bolesť.

Obrázok 7: Erysipel a celulitída (34)

Nekrotizujúca fasciitída patrí medzi najzávažnejšie infekcie kože a mäkkých tkanív spôsobená aj *S. aureus*, vrátane MRSA (35). Príznaky tohto ochorenia môžu byť spočiatku nešpecifické, ale typicky sa prejavujú opuchom a začervenaním, sprevádzané intenzívnou bolesťou. Progresia nekrotizujúcej fasciitídy sa môže prejavovať tvorbou priehľadných pľuzgierov, krepitáciou a nekrózou kože. K rizikovým faktorom ochorenia patria imunosupresia, diabetes mellitus, fajčenie a nadmerné užívanie alkoholu (36).

3.3.3 Diagnostika *S. aureus* spôsobujúcich infekcie

Kultivačné metódy

Kultivácia *S. aureus* z klinických vzoriek zostáva základným diagnostickým nástrojom, najmä v mikrobiologických laboratóriách. Tento proces zahŕňa izoláciu baktérií z rôznych klinických vzoriek (krvné vzorky, výtery z rán), pomocou inokulácie na selektívne a diferencovacie kultivačné média (37). Medzi najpoužívanejšie médiá pre izoláciu *S. aureus* patrí agar s manitolom a soľou, ktorý obsahuje vysokú koncentráciu soli (7,5%). Táto koncentrácia soli inhibuje rast väčšiny iných mikroorganizmov, pričom umožňuje rast stafylokokov. Okrem toho *S. aureus* vykazuje schopnosť fermentovať manitol, čo spôsobuje zmenu farby média z červenej na žltú, čím je možné odlíšiť tento druh od ostatných stafylokokov (38). Napriek tomu, že kultivácia *S. aureus* je spoľahlivá, proces je časovo náročný, nakoľko kultivácia a následná identifikácia baktérií si vyžaduje 24 až 48 hodín, čo môže byť obmedzujúce, najmä v prípadoch, keď je potrebná rýchla diagnostika a terapeutická intervencia (39).

Obrázok 8: Kolónie *S. aureus* na agare s manitolom a soľou (40)

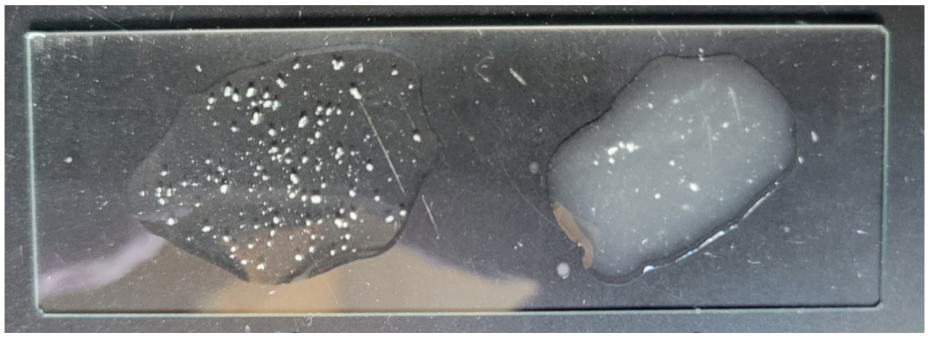
Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) priniesla významnú revolúciu do diagnostiky *S. aureus*, najmä v prípadoch, kde je potrebná rýchla a presná detekcia baktérií (41). PCR umožňuje amplifikáciu špecifických DNA sekvencií, čo umožňuje detekciu *S. aureus* aj pri nízkej koncentrácii baktérií v klinických vzorkách. Táto metóda je mimoriadne cenná pri identifikácii antibioticky rezistentných kmeňov, ako je MRSA, prostredníctvom detekcie génu *mecA*, ktorý je zodpovedný za rezistenciu na beta-laktámové ATB (42). Medzi výhody PCR oproti tradičnej kultivácii patrí rýchlosť, kde výsledky sú k dispozícii už po niekoľko hodinách, a vysoká citlivosť, čo je rozhodujúce pri diagnostike infekcií u pacientov s nízkou bakteriálnou náložou. PCR tiež eliminuje potrebu kultivácie, čím sa značne skracuje doba diagnostiky a umožňuje rýchlu voľbu adekvátnej liečby (43).

Test na koagulázu

Test na koagulázu je biochemická metóda používaná na identifikáciu *S. aureus*. Tento test sa zakladá na schopnosti *S. aureus* produkovať koagulázu, enzým, ktorý spôsobuje zrážanie krvnej plazmy. Tento znak je špecifický pre *S. aureus* a odlišuje ho od ostatných druhov rodu *Staphylococcus*, čo robí test na koagulázu spoľahlivým diagnostickým nástrojom pri jeho identifikácii. Test sa vykonáva zmiešaním bakteriálnej suspenzie s plazmou, pričom pozitívny výsledok je indikovaný tvorbou zrazeniny (37). Existujú dve hlavné formy testu na koagulázu – test na koagulázu v skúmavke a test na koagulázu na skle. V prípade testu v skúmavke sa bakteriálna suspenzia inkubuje v plazme a pozoruje sa vznik zrazeniny po niekoľkých hodinách, zatiaľ čo test na skle sa vykonáva zmiešaním malej dávky baktérií s plazmou priamo na sklenenom povrchu a sledovaním okamžitej tvorby zrazeniny (44). Hoci test na koagulázu vykazuje vysokú špecifitu, môže mať nižšiu citlivosť v porovnaní

s molekulárnymi metódami, najmä u kmeňov *S. aureus*, ktoré produkujú menšie množstvo koagulázy (45).



Obrázok 9: Test na koagulázu (46)

MALDI-TOF MS (hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou s použitím matrice a detektorom doby letu)

MALDI-TOF MS je analytická technológia, ktorá sa stala efektívnym a vysoko presným nástrojom na identifikáciu mikroorganizmov v klinickej mikrobiológii. Princípom tejto metódy je ionizácia proteínov z bakteriálnych kolónií a následné meranie času doletu iónov, čím generuje hmotnostný spektrogram, ktorý sa porovnáva s databázami známych spektier rôznych mikroorganizmov (47). MALDI-TOF MS ponúka výrazne rýchlejšiu analýzu v porovnaní s tradičnými metódami, pričom dokáže s vysokou presnosťou identifikovať širokú škálu patogénov vrátane *S. aureus* (48). Tento nový prístup umožňuje klinickým laboratóriám identifikovať mikroorganizmy v priebehu niekoľkých minút až hodín, čím sa výrazne zlepšuje časová efektívnosť diagnostiky a následne aj liečba pacientov. Vysoká presnosť, rýchlosť a schopnosť simultánnej identifikácie viacerých patogénov robia z MALDI-TOF MS neoceniteľný nástroj v boji proti infekciám (49).

3.4 Antibakteriálne látky rastlinného pôvodu

3.4.1 *Morus* spp.

Moruša (*Morus*, čeľaď Moraceae) je rod listnatých stromov a kríkov, ktorý je široko rozšírený v Ázii, Európe, Severnej a Južnej Amerike a Afrike. Tento rod zahŕňa približne 10 až 16 druhov, pričom najznámejším a ekonomicky najvýznamnejším druhom je *Morus alba* L., známa ako moruša biela (50). Východná, stredná a južná Ázia využívajú morušu predovšetkým na serikultúru – chov priadky morušovej (*Bombyx mori*) na produkciu hodvábu (51).

Okrem svojho hospodárskeho využitia je moruša biela významná aj v tradičnej medicíne (52). V čínskom liekopise sa jej jednotlivé časti – korene, listy, plody a kôra – používajú na liečbu rôznych zdravotných ťažkostí. Koreňová kôra, známa ako *Sang-*

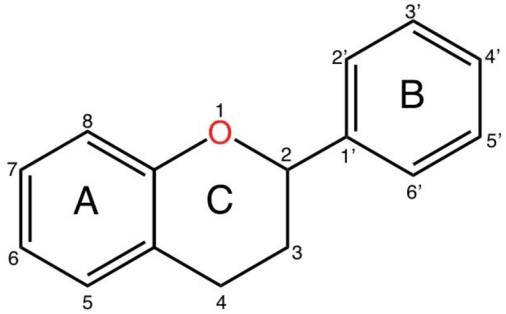
Bai-Pi, sa využíva na zmiernenie horúčok, astmy a podporu diurézy, zatiaľ čo listy sú využívané pri liečbe hypertenzie a diabetes mellitus (53). Tradičné využitie moruše je známe nielen v Číne, ale aj v Japonsku a Kórei, kde sa používa v rovnakých indikáciách (54).

Moruša biela je bohatým zdrojom rôznych fenolických zlúčenín, vrátane flavonoidov (napr. kuwanon C, E, U, morusin), stilbénov (napr. resveratrol, oxyresveratrol), kumarínov, 2-arylbenzopyránov (napr. mulberrofuran A, B) a Diels-Alderových aduktov (DAA; napr. kuwanon G, H). Tieto biologicky aktívne látky vykazujú široké spektrum účinkov, vrátane antioxidačnej, antibakteriálnej, antivírusovej, protizápalovej, antihyperglykemickej a antihyperlipidemickej aktivity (55).

Obrázok 10: Listy a plody moruše bielej (56)

3.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy predstavujú rozsiahlu skupinu polyfenolických zlúčenín rastlinného pôvodu, bežne sa vyskytujúcich v rôznych častiach rastlín, najmä v ovocí, zelenine, obilninách, čaji a víne (57). Ich základná chemická štruktúra pozostáva z 15 uhlíkov usporiadaných do konfigurácie C6-C3-C6, ktorá tvorí dva aromatické kruhy (A a B) spojené trojuhlíkovým heterocyklickým kruhom (C) (Obrázok 5) (58). Podľa substitúcie na kruhu C sa flavonoidy delia na šesť hlavných podtried – antokyanidíny, flavan-3-oly, flavonoly, flavanóny, flavóny a izoflavóny. Tieto zlúčeniny sú známe svojimi priaznivými účinkami na zdravie, vrátane antioxidačnej, protizápalovej, antimutagénnej a antikarcinogénnej aktivity, vďaka ktorej dokážu modulovať funkcie kľúčových bunkových enzýmov. Vzhľadom na tieto vlastnosti sa flavonoidy uplatňujú v rôznych nutraceutických, farmaceutických, medicínskych a kozmetických prípravkoch (57).



Obrázok 11: Základná štruktúra flavonoidov (vlastná tvorba)

Flavonoidy sú biosyntetizované cez fenylpropanoidovú dráhu, ktorá premieňa fenylalanín na 4-kumaroyl-koenzým A, ktorý následne vstupuje do biosyntetickej dráhy flavonoidov. Kľúčovým enzýmom tejto dráhy je chalkon syntáza, ktorá tvorí chalkonové štruktúry, z ktorých vznikajú všetky flavonoidy. Hoci centrálna dráha biosyntézy flavonoidov je u rastlín zachovaná, v závislosti od druhu rastliny dochádza k jej úpravám pôsobením enzýmov, ako sú izomerázy, reduktázy, hydroxylázy a Fe^{2+}/2-oxoglutarát-dependentné dioxygenázy. Tieto enzýmy menia základnú štruktúru flavonoidov, čím vznikajú rôzne podtriedy flavonoidov. Následne transferázy modifikujú základ flavonoidu pridaním cukrov, metylových alebo acylových skupín, čím ovplyvňujú ich rozpustnosť, reaktivitu a schopnosť interagovať s bunkovými štruktúrami, čo moduluje ich biologickú aktivitu (59).

Názvy prírodných látok (PL) popisovaných v tejto diplomovej práci boli preložené do slovenčiny, ak existoval zaužívaný slovenský ekvivalent. V ostatných prípadoch sú ponechané v pôvodnej anglickej podobe alebo zapísané s použitím fonetického prepisu.

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita flavonoidov závisí od ich štruktúry, najmä od počtu a polohy hydroxylových skupín. Flavonoidy neutralizujú reaktívne formy kyslíka (ROS), pričom ich *o*-dihydroxy štruktúra v B-kruhu umožňuje delokalizáciu elektrónov, čím zvyšuje ich antioxidačnú aktivitu (napr. kvercetín). Okrem toho môžu inhibovať enzýmy, ktoré generujú voľné radikály, ako napr. xantínoxidázu a cyklooxygenázu (napr. epikatechín, rutín). Flavonoidy tiež potláčajú oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) tým, že podporujú α-tokoferolové radikály, čím znižujú lipidovú peroxidáciu. Ďalším mechanizmom je ich schopnosť chelatovať prechodné kovy, ako sú Fe^{3+} a Cu^{2+}, čím zabraňujú tvorbe oxidačných produktov (napr. kvercetín, kaempferol). Okrem toho znižujú oxidačný stres spôsobený oxidom dusnatým tým, že inhibujú jeho produkciu v aktivovaných bunkách a chránia cievny systém pred patologickými zmenami. Tieto mechanizmy spoločne prispievajú k širokému spektru antioxidačných účinkov flavonoidov (60).

Hepatoprotektívna aktivita
Flavonoidy ako katechín, apigenín, kvercetín, naringenín a rutín vykazujú významné hepatoprotektívne účinky. Pri chronických ochoreniach, ako je diabetes mellitus, môže dôjsť k rozvoju hepatálnych komplikácií v dôsledku oxidačného stresu a zápalových procesov. Antokyaníny majú schopnosť modulovať tieto procesy, ako je zníženie hladiny ROS, čím prispievajú k ochrane hepatocytov. Silymarín, komplex flavonolignanov získaný z rastliny *Silybum marianum*, stimuluje regeneráciu pečeňového tkaniva po poškodení prostredníctvom aktivácie biosyntézy RNA a proteínov, čo vedie k proliferácii hepatocytov. Okrem toho silymarín vykazuje významné farmakologické vlastnosti, vrátane regulácie permeability membrán, vychytávania ROS, inhibície aktivity nukleárneho faktora kappa B (NF-κB) a inhibície produkcie kolagénu, čím prispieva k zníženiu fibrózy pečene. Klinické štúdie potvrdzujú účinnosť a bezpečnosť flavonoidov pri liečbe hepatobiliárnych dysfunkcií a tráviacich ťažkostí, čo naznačuje ich terapeutický potenciál pri ochoreniach pečene (61).

Antibakteriálna a antimykotická aktivita
Flavonoidy vykazujú antibakteriálnu a antimykotickú aktivitu rôznymi mechanizmami. Ich antibakteriálny účinok zahŕňa narušenie bakteriálnej membrány, inhibíciu tvorby biofilmov, potlačenie biosyntézy nukleových kyselín a ATP a narušenie elektronového transportu. Medzi príklady flavonoidov so silnou antibakteriálnou aktivitou patria kvercetín, apigenín, naringenín a baicalein, ktoré blokujú tvorbu biofilmov a potláčajú replikáciu DNA v baktériách. Okrem toho flavonoid glabrol, izolovaný z koreňa *Glycyrrhiza glabra*, vykazuje vysokú účinnosť proti MRSA a nízku cytotoxicitu. V prípade antimykotickej aktivity flavonoidy ako baicalein, apigenín a glabridín, narušajú bunkovú membránu, inhibujú syntézu bunkových stien a regulujú ROS, čím inhibujú rast rôznych húb (60).

Antiflogistická aktivita
Protizápalová aktivita flavonoidov spočíva v modulácii imunitného systému a potláčaní zápalových procesov. Flavonoidy ako hesperidín, apigenín, luteolín a kvercetín vykazujú protizápalové a analgetické účinky, pričom ovplyvňujú funkciu enzýmov zapojených do zápalových procesov, najmä tyrozín a serín-treonín proteínkináz. Inhibíciou týchto kináz sa flavonoidy viažu na aktívne miesta namiesto ATP, čím zabraňujú aktivácii imunitných buniek a vzniku zápalu. Okrem toho, znižujú produkciu látok, ktoré vyvolávajú zápal, ako sú oxid dusnatý, prostanoidy, leukotriény, cytokíny a chemokíny. Niektoré flavonoidy tiež inhibujú agregáciu krvných doštičiek a metabolizmus kyseliny arachidónovej, čím prispievajú k zníženiu zápalového procesu (61).

Protinádorová aktivita
Konzumácia ovocia a zeleniny bohatých na flavonoidy, ako je kvercetín, hesperidín či genisteín, je spojená so zníženým rizikom vzniku rôznych typov nádorových ochorení.

Mechanizmus ich pôsobenia zahŕňa inhibíciu tyrozínkináz, potlačenie expresie proteínu p53 alebo zastavenie bunkového cyklu. Flavonoidy tiež vykazujú antioxidačné vlastnosti, čím znižujú oxidačný stres a spomaľujú proces karcinogenézy (61).

Antivírusová aktivita
Flavonoidy vykazujú antivírusovú aktivitu prostredníctvom inhibície prichytenia vírusov na hostiteľské bunky, čím zabraňujú ich vstupu a narúšajú procesy replikácie, transkripcie a translácie vírusovej DNA. Apigenín, baicalein, luteolín a kaempferol sú príklady flavonoidov, ktoré preukázali antivírusovú aktivitu proti rôznym vírusom, ako sú vírusy herpes simplex, vírus hepatitídy B a C a vírus HIV-1 (60).

Kardiovaskulárna aktivita
Flavonoidy zohrávajú významnú úlohu v ochrane kardiovaskulárneho systému vďaka svojej antioxidačnej, protizápalovej a vazodilatačnej vlastnosti. Ich účinky zahŕňajú zlepšenie endoteliálnej funkcie, zníženie krvného tlaku, inhibíciu agregácie trombocytov, čím znižujú riziko aterosklerózy. Štúdie preukázali, že naringenín, kvercetín a hesperetín majú vazodilatačné účinky a môžu prispievať k zlepšeniu hypertenzie a k ochrane srdca pred ischemickým poškodením. Antokyány znižujú riziko infarktu myokardu a hladiny cholesterolu, zatiaľ čo niektoré flavonoidy ovplyvňujú signálne dráhy regulujúce zápal a oxidačný stres, čím prispievajú k ochrane kardiomyocytov a prevencii kardiovaskulárnych ochorení (60).

3.4.3 Biologická aktivita prenylovaných a geranylových flavonoidov

Prenylované a geranylové flavonoidy, charakteristické prítomnosťou fenolického jadra modifikovaného prenylovými alebo geranylovými skupinami, predstavujú heterogénnu skupinu PL s rôznorodými biologickými účinkami. Morusin, kuwanon C, kuwanon E a kuwanon U sú flavonoidy izolované z rodu *Morus*, ktoré vykazujú najmä antioxidačný, antibakteriálny a protizápalový potenciál (62). Tieto flavonoidy sa líšia od neprenylovaných vyššou lipofilitou, ktorá zlepšuje ich schopnosť interagovať s bunkovými membránami, absorpciu v tráviacom trakte a celkovú biologickú dostupnosť (63).

Morusin a kuwanon C sú prenylované flavonoidy, ktoré vykazujú predovšetkým antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti. Ich antimikrobiálna aktivita spočíva v narušení integrity bakteriálnych membrán, čo vedie k zvyšovaniu permeability a strate bunkových zložiek, čo je obzvlášť účinné proti grampozitívnym baktériám, ako je *S. aureus* (55). Tieto flavonoidy taktiež inhibujú tvorbu a narušujú štruktúru biofilmov. Okrem toho ovplyvňujú adhéziu baktérií na povrchy, čím znižujú ich schopnosť kolonizovať hostiteľské tkanivá (64). Morusin a kuwanon C vykazujú aj významné antioxidačné vlastnosti (55). Prenylové skupiny v ich chemickej štruktúre umožňujú neutralizovať ROS, čím znižujú oxidačný stres, ktorý je často spojený

so zápalovými a infekčnými ochoreniami. Ich protizápalové účinky sú sprostredkované inhibíciou signalizačných dráh, ako je NF-κB, ktoré regulujú produkciu prozápalových cytokínov. Týmto mechanizmom prispievajú k zníženiu zápalovej odpovede a k ochrane tkanív pred poškodením (65,66).

Geranylové flavonoidy, kuwanon E a kuwanon U, vykazujú širokú škálu biologických účinkov, pričom sa vyznačujú antibakteriálnou aktivitou proti MRSA. Navyše, v kombinácii s niektorými ATB vykazujú synergické účinky, čím môžu zvyšovať efektivitu liečby. Ich mechanizmus účinku spočíva v narušení integrity bakteriálnej bunkovej membrány, prostredníctvom interakcie s lipidovými zložkami, čo zvyšuje jej permeabilitu a vedie k úniku bunkových zložiek a následnej smrti baktérií. Okrem toho, kuwanon E a kuwanon U môžu inhibovať efluxné pumpy, čo sú transmembránové proteíny zodpovedné za aktívne vypudzovanie ATB z baktérií, a ich inhibíciou sa zvyšuje koncentrácia ATB v bunke a s ňou aj účinnosť (55).

Flavonoidy majú taktiež pozitívny vplyv aj na samotné hojenie rán vďaka svojim rôznorodým biologickým účinkom a nízkej toxicite voči HaCaT (ľudské keratinocyty). Tieto bunky, ktoré dominujú v epidermis, zohrávajú kľúčovú úlohu pri hojení rán. Modulovaním zápalovej odpovede a regulovaním produkcie cytokínov podporujú epitelizáciu a znižujú chronický zápal. Okrem toho, ich schopnosť zlepšiť vaskularizáciu a stimulovať proliferáciu buniek prispieva k efektívnej regenerácii tkaniva, čo ich predurčuje byť vhodnými kandidátmi v starostlivosti o rany (67).

3.4.4 Diels-Alderove adukty (DAA)

Diels-Alderova reakcia patrí medzi najvýznamnejšie pericyklické reakcie v organickej chémii, pri ktorej dochádza k [4+2] cykloadícii medzi konjugovaným diénom a dienofilom, čo vedie k tvorbe šesťčlenného cyklohexénového kruhu (68). DAA sú produkty tejto reakcie a často sú kľúčovými intermediátmi pri syntéze rôznych PL alebo syntetizovaných zlúčenín (69). Ich štruktúra a vlastnosti sú ovplyvnené vstupnými reaktantmi a reakčnými podmienkami (70).

Kuwanon G a albafuran C sú DAA, prirodzene sa vyskytujúce najmä v rastlinách rodu *Morus* alebo *Ficus*. Tieto zlúčeniny patria do širšej triedy flavonoidov a sú známe svojimi antioxidačnými, protizápalovými a antibakteriálnymi vlastnosťami (69).

Kuwanon G vykazuje silné protizápalové a antioxidačné účinky (71). Jeho protizápalový účinok spočíva v potlačení sekrécie zápalových chemokínov v keratinocytoch stimulovaných cytokínmi, ako sú TNF-α a IFN-γ, prostredníctvom inhibície aktivácie signálnej dráhy NF-κB, ktorá hrá kľúčovú úlohu v regulácii zápalových procesov v organizme (72). Okrem toho kuwanon G vykazuje antimikrobiálnu aktivitu. Taktiež v in vitro štúdiách synergicky pôsobil s ATB, ako sú oxacilín, amoxicilín, erytromycín a gentamicín, proti MRSA (73).

Albafuran C vykazuje antimikrobiálne, protizápalové a antioxidačné účinky. Má výraznú antibakteriálnu aktivitu proti gram-pozitívnym baktériám, pričom narúša

integritu bunkovej membrány, čo vedie k úniku bunkových zložiek a k smrti bakteriálnej bunky. Okrem toho, albafuran C vykazuje protizápalové účinky znižujúc produkciu prozápalových cytokínov a mediátorov, ako sú TNF-α a IL-6, inhibíciou signálnej dráhy NF-κB. Navyše neutralizuje ROS, čím znižuje oxidačný stres, ktorý je často spojený so zápalom a rôznymi ochoreniami (55).

3.4.5 Komerčne dostupné vybrané PL využívané vo farmaceutickej praxi

Tymol

Tymol, monoterpenoidná fenolická zlúčenina, primárne izolovaná predovšetkým z rastliny *Thymus vulgaris*, je známa svojimi výraznými biologickými účinkami. Vyznačuje sa antioxidačnými, protizápalovými, antimikrobiálnymi a analgetickými vlastnosťami, ktoré prispievajú k jeho širokému terapeutickému využitiu. Tymol vykazuje antibakteriálnu aktivitu prostredníctvom interakcie s bunkovými membránami mikroorganizmov, čím narúša ich integritu a destabilizuje lipidové dvojvrstvy, čo vedie k zníženiu ich viability (74). Okrem toho inhibuje rast a rozmnožovanie mikroorganizmov, ako sú *S. aureus*, *E. coli* a *C. albicans*, zásahom do metabolických dráh, vrátane inhibície enzýmov zapojených do syntézy bunkových stien a DNA (75).

Antioxidačná aktivita tymolu spočíva v jeho schopnosti neutralizovať voľné radikály, čím prispieva k ochrane buniek pred oxidačným poškodením (76). Tento mechanizmus je podporený aj jeho schopnosťou regulovať zápalové procesy v organizme. Tymol moduluje imunitnú odpoveď hostiteľa prostredníctvom interferencie so signálnymi dráhami, ktoré sa podieľajú na produkcii prozápalových cytokínov, čím zmierňuje zápalové reakcie a znižuje riziko chronických zápalových ochorení (75). Okrem antibakteriálnych účinkov vykazuje tymol aj analgetické účinky, ktoré sú spojené s jeho interakciou s nervovými dráhami, čo vedie k tlmeniu bolesti (77).

Tymol prispieva k zlepšeniu trávenia tým, že uvoľňuje hladké svalstvo, zmierňuje menštruačné kŕče a podporuje dýchacie funkcie. Je aktívnou zložkou v potravinových dochucovadlách, mastiach, mydlách, zubných pastách, šampónoch, deodorantoch a ústnych vodách. Vďaka svojim silným antimikrobiálnym účinkom sa využíva aj v stomatológii na liečbu infekcií v ústnej dutine (77). Tieto terapeutické vlastnosti tymolu súvisia s prítomnosťou fenolovej hydroxylovej skupiny v jeho chemickej štruktúre (78). Zlúčeniny, ktoré obsahujú fenolové skupiny, sú známe tým, že poskytujú ochranu pred poškodzujúcimi účinkami voľných radikálov, a to buď ich absorbovaním, alebo neutralizovaním, prípadne zvýšením endogénnych antioxidantov (77).

Epigalokatechín galát

Epigalokatechín galát (EGCG) je vysoko účinná polyfenolová zlúčenina, ktorá sa prevažne nachádza v zelenom čaji (*Camellia sinensis*), najmä v jeho listoch. Patrí do skupiny flavonoidov, konkrétne medzi katechíny, a je považovaný za jeden z najaktívnejších zložiek tohto čaju (79). EGCG je známy svojimi širokými biologickými účinkami, medzi ktoré patrí antioxidačná, protizápalová, protinádorová, kardiovaskulárna ochrana a antimikrobiálna aktivita (80).

Antioxidačná aktivita EGCG je jedným z kľúčových mechanizmov jeho biologického pôsobenia, nakoľko neutralizuje ROS a zároveň podporuje aktivitu antioxidačných enzýmov, ako sú superoxiddismutáza a kataláza, čím podporuje ochranný antioxidačný mechanizmus organizmu (81).

Protizápalové vlastnosti EGCG sú rovnako dôležité, pretože moduluje zápalové dráhy inhibíciou prozápalových cytokínov a enzýmov, ako je cyklooxygenáza-2, čím prispieva k zmierneniu zápalových procesov a znižovaní rizika chronických zápalových ochorení.

EGCG vykazuje širokospektrálnu bakteriostatickú aktivitu. Jeho antibakteriálny mechanizmus spočíva v interakcii fenolovej hydroxylovej skupiny alebo benzénového kruhu s lipidovými molekulami v bakteriálnej membráne, čo vedie k narušeniu integrity membrány, a následnému úniku intracelulárnych komponentov, čo vedie k smrti bunky (80).

EGCG má tiež priaznivý vplyv na kardiovaskulárny systém, pretože prispieva k znižovaniu krvného tlaku, zlepšuje lipidový profil (znižuje hladiny celkového cholesterolu a LDL cholesterolu) a podporuje funkciu endotelu. Tieto účinky prispievajú k znižovaniu rizika kardiovaskulárnych ochorení (82).

Okrem vyššie uvedených vlastností sa EGCG využíva aj pri liečbe rôznych dermatologických ochorení, ako sú psoriáza, atopický ekzém alebo poškodenia kože spôsobené UV žiarením (83).

4 Experimentálna časť

4.1 Materiál

4.1.1 Testované mikroorganizmy

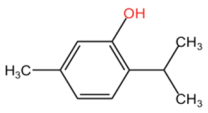
Klinické izoláty použité v tejto diplomovej práci boli poskytnuté prof. Žemličkovou, ktorá pôsobí na Ústave mikrobiologie 3. lekářské fakulty Univerzity Karlovej, Fakultní nemocnici Královské Vinohrady a Státním zdravotním ústavě v Prahe. Na účely výskumu sme dostali šesť meticilín rezistentných kmeňov *S. aureus* (označené ako SA 65895, SA 55763, SA 58770, SA 59986, SA 62397, SA 65354), ktoré boli rezistentné aj voči kyseline fusidovej.

4.1.2 Rozpúšťadlá, chemikálie, kultivačné médiá

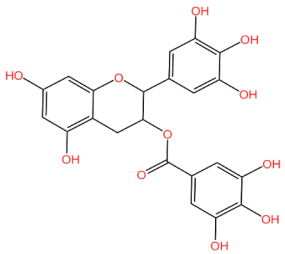
- Destilovaná voda
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich)
- 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC, Sigma-Aldrich)
- Agarový prášok (Himedia)
- Mueller Hinton Broth (MHB, Himedia)
- Kyselina fusidová (Sigma-Aldrich)
- Mupirocín (Sigma-Aldrich)
- Tymol (Sigma-Aldrich)
- EGCG (Sigma-Aldrich)

4.1.3 Testované PL a ATB

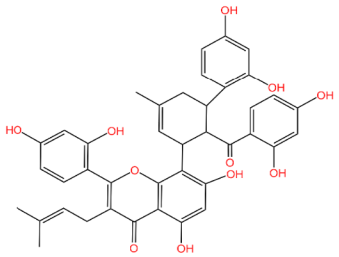
V rámci tejto diplomovej práce boli použité PL (kuwanon C, kuwanon U, kuwanon E, kuwanon G, morusin, albafuran C) izolované na Ústave prírodných liečiv Farmaceutickej fakulty Masarykovej univerzity (52). Okrem toho boli použité aj komerčne dostupné PL EGCG a tymol, ako aj ATB kyselina fusidová a mupirocín. Na experimentálne účely boli tieto látky rozpustené v DMSO za vzniku iniciálnych roztokov s koncentráciou 2560 µg/ml.



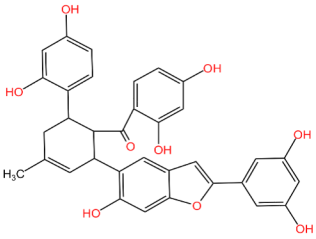
tymol



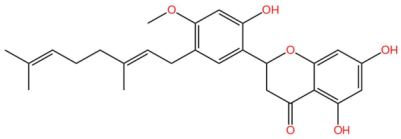
epigalokatechin galát (EGCG)



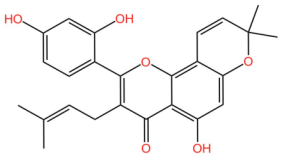
kuwanon G



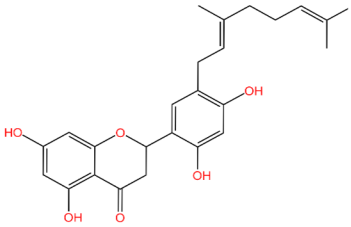
albafuran C



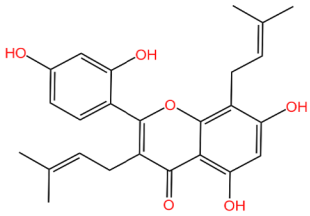
kuwanon U



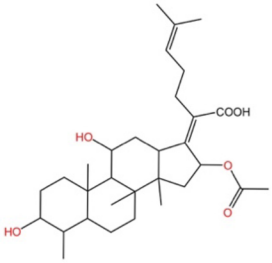
morusin



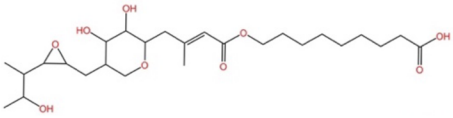
kuwanon E



kuwanon C



kyselina fusidová



mupirocín

Obrázok 12: Chemické štruktúry testovaných PL a ATB (vlastná tvorba)

4.1.4 Prístroje

- Analytické váhy (A&D Weighing)
- Laboratórne váhy (Kern)
- Varič (ETA)
- Tlakový hrniec
- Chladnička pre uchovávanie kultivovaných mikroorganizmov (2–8 °C)
- Chladnička pre uchovávanie priravených médii a agarov (2–8 °C)
- Chladnička pre uchovávanie roztokov PL, ATB a ďalších chemikálií (2–8 °C)
- Laminárny box UVC/T-M-AR (Biosan)
- Laminárny box II. triedy
- Mraziaci box pre uchovávanie mikroorganizmov (-80 °C)
- Denzitometer DEN-1 (Biosan)

- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Nastaviteľné poloautomatické multikanálové pipety Finnpipette F2
- Inkubátor (Biosan)
- Spektrofotometer FLUOstar Omega (BMG Labtech)
- Počítač

4.1.5 Pomôcky

- Odmerný valec
- Erlenmayerove banky
- Kadičky
- Lyžička, špachtlička
- Sklenená tyčinka
- Indikačná páska pre sterilizáciu v autokláve a tlakovom hrnci
- Hliníková fólia
- Jednorazové rukavice
- Mikrotitračné doštičky
- Sterilné jednorazové špičky pre pipety
- Sterilné jednorazové skúmavky
- Sterilné jednorazové Petriho misky
- Sterilné jednorazové mikrobiologické kľučky
- Sterilné jednorazové denzila skúmavky
- Stojan na skúmavky
- Mikroskúmavky typu Eppendorf
- Kryovialky so šrubovacím uzáverom
- Plastové sáčky
- Plastové vaničky

4.2 Metódy

4.2.1 Príprava kultivačných médií a pevných živných pôd

Pri príprave tekutého média MHB bolo odvážených 21 g prášku, ktorý bol rozpustený v 1 litri destilovanej vody v Erlenmeyerovej banke. Roztok bol následne rozdelený do menších baniek zakrytých alobalom a prelepených indikačnou páskou. Banky boli sterilizované 30 minút v Papinovom tlakovom hrnci. Po vybratí z hrnca bola skontrolovaná zmena zafarbenia indikačnej pásky zo žltej na čiernu, ktorá potvrdila priebeh sterilizačného procesu. Po vychladnutí bolo médium označené a uložené do chladničky.

Pri príprave tuhého média sa postupovalo rovnako ako pri tekutom, avšak v bankách pripravených na sterilizáciu bol do roztoku pridaný agaru v prášku (30 g/l).

Pripravené banky boli zahrievané na variči, až kým sa agar úplne nerozpustil. Sterilizácia prebehla rovnakým spôsobom a ešte teplé médium bolo naliate asepticky do Petriho misiek.

4.2.2 Revitalizácia zmrazených bakteriálnych kultúr

Eppendorfky so zmrazenými mikroorganizmami sa vybrali z mrazničky a miernym zahrievaním v rukách sa prispôsobili izbovej teplote, čo umožnilo ich odber na očkovanie. V laminárnom boxe pomocou očkovacej sľučky boli mikroorganizmy metódou krížového rozteru prenesené na pripravenú živnú pôdu v Petriho miske. Takto naočkovaná Petriho miska bola označená dátumom očkovania a názvom mikroorganizmu, umiestnená do inkubátora na 24 hodín pri teplote 37 °C.

Obrázok 13: Nárast kolónií *S. aureus* po 24 hodinách (foto autor)

4.2.3 Príprava inokula

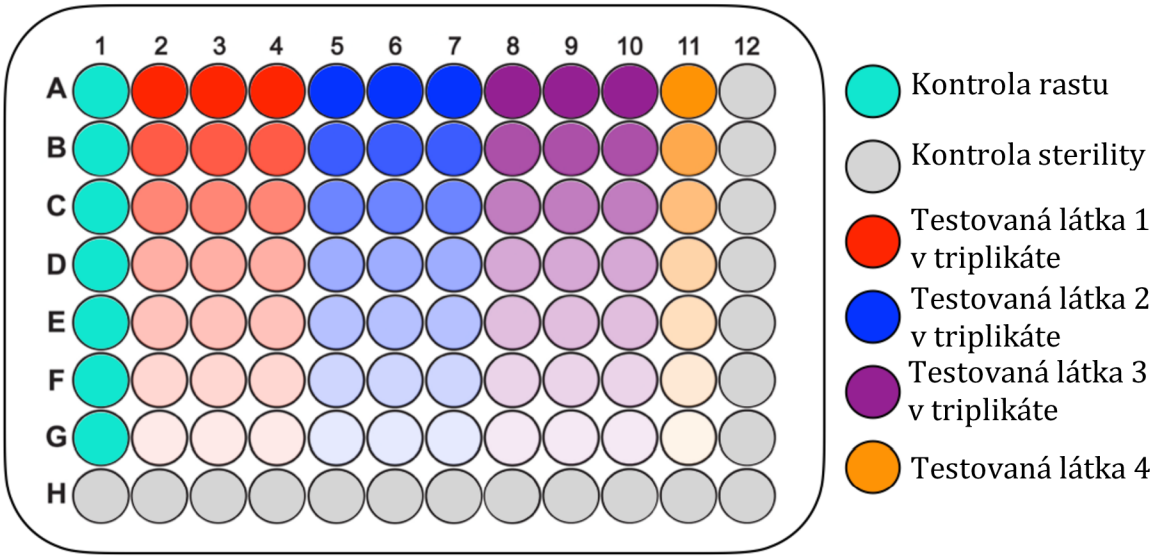
Po 24-hodinovej inkubácii sa časť bakteriálnych kolónií preniesla očkovacou sľučkou do 3 ml tekutého média MHB. Zmes sa následne vortexovala, čím sa zabezpečilo dôkladné premiešanie, a potom sa za pomoci denzitometra optimalizovala jej hustota na 0,5 McFarland. Na dosiahnutie riedenia 1:100 sa odobralo 0,1 ml tejto suspenzie a pridalo sa do 9,9 ml MHB. Po opätovnom premiešaní bolo inokulum pripravené na ďalšie používanie.

4.2.4 Mikrodilučná metóda pre stanovenie MIC testovaných látok

V tejto štúdii bola antimikrobiálna aktivita testovaných PL a ATB hodnotená pomocou mikrodilučnej metódy v súlade s normami EUCAST (Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti). Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) sa uskutočňovalo s použitím 96-jamkových mikrotitračných doštičiek (Obrázok 14). MIC predstavuje najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, ktorá inhibuje viditeľný rast mikroorganizmu po inkubácii.

Mikrodilučná metóda pre stanovenie MIC testovaných látok zahŕňala prípravu iniciálnych roztokov PL aj ATB o koncentrácii 2560 µg/ml v rozpúšťadle DMSO. Následne sme pripravovali pracovné roztoky vo vode, pričom koncentrácia DMSO nepresahovala 5 %. Na prípravu pracovného roztoku sa odobralo 20 µL iniciálneho roztoku, a doplnilo do 400 µL MHB. Do jamiek radu A (okrem A2 až A11) a do radov B až H sa pridalo 50 µL MHB. Do jamiek A2–A11 sa potom pridalo 100 µL pracovného roztoku testovanej látky, pričom pred každým použitím bolo potrebné roztok dôkladne zvortexovať. Následne sa vykonalo sériové riedenie, pri ktorom sa 50 µL radu A pomocou multikanálovej pipety premiestňovalo do radu B, kde sa roztok premiešal desaťkrát. Tento postup sa opakoval až po rad G, pričom pri každom prenose roztoku bolo dôležité dôkladne premiešať obsah jamiek. Po ukončení riedenia sa prebytočný roztok z radu G premiestnil do radu H. Do všetkých jamiek od stĺpca 1 po 11 (A–G) sa pridalo 50 µL inokula. Rad H slúžil ako kontrola sterility a obsahoval iba médium s testovanými látkami.

Po pridaní všetkých roztokov bola mikrotitračná doštička inkubovaná pri teplote 35 °C počas 18 ± 2 hodín pri vhodných inkubačných podmienkach. Každá látka bola testovaná v triplikáte voči šiestim kmeňom, pričom celý experiment bol vykonaný trikrát pre každú PL aj ATB, aby sa získala presná hodnota MIC a znížilo riziko pipetovacích chýb.



Obrázok 14: Schéma mikrotitračnej doštičky na stanovenie MIC (vlastná tvorba)

4.2.5 Vyhodnotenie doštičiek a stanovenie MIC

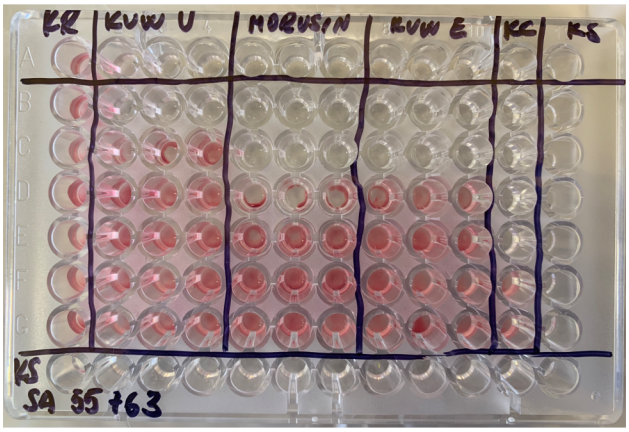
Doska sa po inkubácii pozorovala vizuálne proti čiernemu pozadiu. MIC bola odčítaná z poslednej jamky bez viditeľného zákalu. Následne sme spektrofotometricky zmerali absorbanciu v jednotlivých jamkách pri vlnovej dĺžke 600 nm a údaje zaznamenali do tabuľky v programe Microsoft Excel. Na základe absorbancie sa hodnotil stupeň

zakalenia v porovnaní s priemernými hodnotami z kontrolných jamiek čistoty a rastu. MIC bola určená ako koncentrácia, pri ktorej nebolo pozorované zakalenie. Percentuálna inhibícia rastu bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\%\ \text{inhibície} = 100 - \left[\left(\frac{\Delta\ \text{vzorka} - \Delta\ \text{kontrola čistoty}}{\Delta\ \text{kontrola rastu} - \Delta\ \text{kontrola čistoty}}\right) \times 100\right]$$

MIC sa stanovila ako najnižšia koncentrácia, pri ktorej bola inhibícia rastu minimálne 80 %.

Následne bol zákal v jamkách hodnotený pomocou TTC. Farbivo TTC, ktoré sa pri metabolizácii baktériami mení na červený formazán, bolo použité ako indikátor rastu baktérií. Táto metóda slúžila ako kontrola pre overenie správnosti spektrofotometrických výsledkov, obzvlášť v prípade vzniku zrazeniny alebo zmenami farby v dôsledku vysokej koncentrácie roztokov. Do každej jamky bolo pridaných 10 µL 1 % roztoku TTC a doska sa inkubovala ďalších 30 minút pri 35 °C. Po inkubácii sa vyhodnocovalo zafarbenie zákalu v jamkách (Obrázok 15).

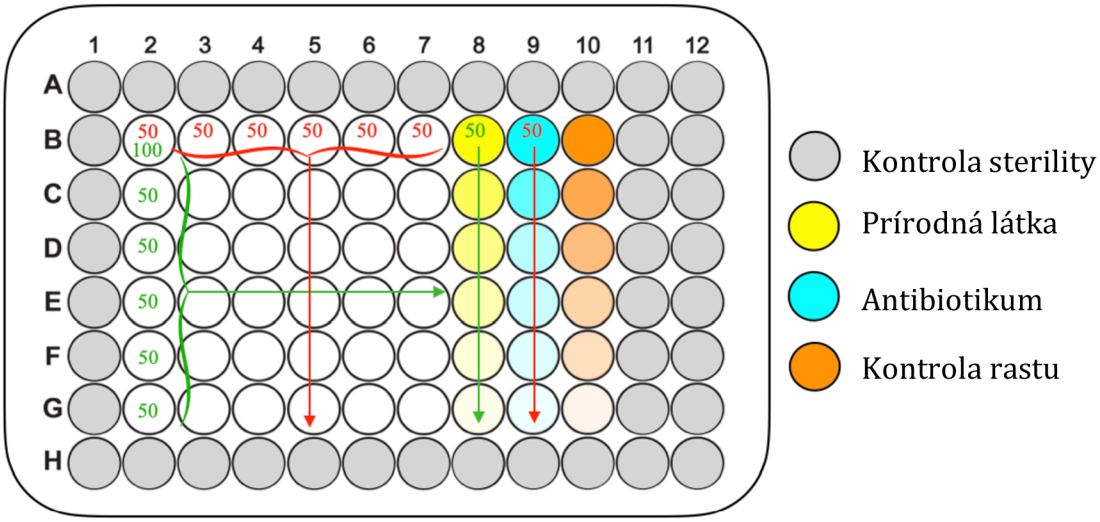


Obrázok 15: Stanovenie MIC vybraných PL (foto autor)

4.2.6 Testovanie synergií PL v kombinácii s ATB

Testovanie synergického účinku PL s kyselinou fusidovou voči kmeňom SA 65895, SA 55763, SA 58770, SA 59986, SA 62397 a SA 65354 prebiehalo šachovnicovou metódou (Obrázok 16). Pred samotným experimentom sa pripravili pracovné roztoky testovaných látok v médiu MHB s koncentráciou DMSO maximálne 5 %. Do všetkých jamiek mikrotitračnej doštičky, okrem jamky B2, sa najskôr pridalo 50 µl MHB. Pracovný roztok PL bol pridaný do jamky B2 v objeme 100 µl, pričom ďalších 50 µl roztoku sa následne pridalo do jamiek C2, D2, E2, F2, G2 a B8. Stĺpec 8 obsahoval iba PL a slúžil k stanoveniu MIC PL. Následne prebehlo sériové riedenie PL. Najskôr sa jamky druhého stĺpca premiešali 10-krát multikanálovou pipetou a 50 µl sa presunulo do tretieho stĺpca, kde sa obsah opäť premiešal. Týmto spôsobom

sa postupovalo po stĺpec 7, odkiaľ sa posledných 50 µl prenieslo do jamky v stĺpci 11, ktorý slúžil ako kontrola sterility. V ďalšom kroku sa na doštičku pridávalo ATB. Pracovný roztok ATB v objeme 50 µl bol pridaný do jamiek B2–B7 a do jamky B9, kde sa sledovala MIC ATB. Riedenie v radoch B2–B9 sa uskutočňovalo prenosom 50 µl obsahu jamky, pričom posledných 50 µl bolo vypustených do radu H. Inokulum v objeme 50 µl sa pridalo do každej jamky v stĺpcoch 2–10 (okrem riadkov A a H). Doštička sa následne preniesla do plastového obalu a inkubovala sa 20 hodín pri 35 °C. Experiment bol vykonaný jedenkrát pre každú kombináciu.



Obrázok 16: Design mikrotitračnej doštičky na testovanie synergií (vlastná tvorba)

4.2.7 Vyhodnotenie synergií a stanovenie FIC

Index frakčnej inhibičnej koncentrácie (FIC) je kľúčovým ukazovateľom hodnotenia interakcií medzi antimikrobiálnymi látkami a určuje, či kombinácia látok vykazuje synergický, aditívny (parciálne synergický), indiferentný alebo antagonistický efekt. FIC index (FICi) je definovaný ako súčet pomerov MIC látky v kombinácii a MIC látky samostatne u oboch testovaných látok. Vypočíta sa podľa vzorca:

$$\mathrm{FIC_i} = \frac{\mathrm{MIC_{1\ v\ kombinácii}}}{\mathrm{MIC_{1\ samostatne}}} + \frac{\mathrm{MIC_{2\ v\ kombinácii}}}{\mathrm{MIC_{2\ samostatne}}}$$

kde MIC_1 v kombinácii označuje MIC ATB v prítomnosti PL v danej jamke, MIC_2 v kombinácii predstavuje MIC PL v kombinácii s ATB v tej istej jamke, MIC_1 samostatne je MIC ATB v jamke bez ďalších látok a MIC_2 samostatne je MIC PL v jamke, kde je PL testovaná izolovane od ATB.

Podľa hodnoty indexu FIC je následne možné stanoviť typ interakcie za využitia tabuľky 1 (84):

Tabuľka 1: Interpretácia výsledkov indexu FIC

Typ interakcie	Hodnota indexu FIC
Synergia	≤ 0,5
Aditivita (parciálna synergia)	> 0,5 ≤ 1
Indiferencia	> 1 ≤ 4
Antagonizmus	> 4

4.3 Výsledky

4.3.1 Výsledky MIC PL a ATB

Pomocou mikrodilučnej metódy boli stanovené MIC PL a ATB voči šiestim rezistentným kmeňom *S. aureus* (SA 65895, SA 55763, SA 58770, SA 59986, SA 62397, SA 65354), pričom výsledky sú zhrnuté v tabuľke 2. Výsledky testovania ukazujú, že mupirocín preukázal nízke MIC hodnoty, čím sa potvrdila jeho vysoká účinnosť a schopnosť inhibovať rast rezistentných kmeňov. Vykazoval MIC hodnoty 0,064 µg/ml pre kmeň SA 58770 a 0,125 µg/ml pre ostatné kmene. Kyselina fusidová vykazovala vyššie MIC hodnoty a to v rozmedzí 2 až 16 µg/ml.

Medzi testovanými PL vykazoval kuwanon C najnižšie MIC hodnoty medzi 4 a 8 µg/ml, čo naznačuje jeho silný antimikrobiálny účinok. DAA, kuwanon G a albafuran C, dosahovali MIC hodnoty 8 µg/ml, čo vyzdvihuje ich antimikrobiálny potenciál voči rezistentným kmeňom. Geranylové fenolické zlúčeniny, kuwanon E a kuwanon U, preukázali MIC hodnoty 16 µg/ml. Morusin vykazoval MIC hodnoty v rozmedzí 4–16 µg/ml. Naopak, komerčne dostupné PL, tymol a EGCG vykazovali vyššie MIC hodnoty (512 µg/ml pre tymol a 64–128 µg/ml pre EGCG).

Tabuľka 2: Zistené MIC PL a ATB

TESTOVANÉ LÁTKY	MIC [µg/ml]					
	SA 65895	SA 55763	SA 58770	SA 59986	SA 62397	SA 65354
TYMOL	512	512	512	512	512	512
EGCG	64	128	64	128	128	64
KUWANON G	8	8	8	8	8	8
ALBAFURAN C	8	8	8	8	8	8
KUWANON U	16	16	16	16	16	16
MORUSIN	8	16	8	8	8	4
KUWANON E	16	16	16	16	16	16

TESTOVANÉ LÁTKY	MIC [µg/ml]					
	SA 65895	SA 55763	SA 58770	SA 59986	SA 62397	SA 65354
KUWANON C	4	4	8	4	4	4
KYSELINA FUSIDOVÁ	16	16	2	8	16	8
MUPIROCÍN	0,125	0,250	0,064	0,125	0,125	0,125

Vysvetlivky: ATB – antibiotikum, EGCG – epigalokatechín galát, MIC – minimálna inhibičná koncentrácia, PL – prírodná látka, SA – klinický izolát *Staphylococcus aureus*

4.3.2 Výsledky synergického testovania PL s ATB

Šachovnicová titračná metóda bola použitá na hodnotenie synergického potenciálu ôsmich PL v kombinácii s ATB, kyselinou fusidovou, voči šiestim kmeňom *S. aureus*. Výsledky tohoto testovania sú zobrazené v tabuľke 3. Kombinácie geranylových flavonoidov, ako sú kuwanon E, kuwanon U, prenylovaných flavonoidov ako sú morusin a kuwanon C, a DAA, kuwanon G a albafuran C, preukázali parciálne synergické účinky voči aspoň jednému kmeňu *S. aureus*. Kuwanon C vykazoval parciálne synergický účinok s ATB proti piatim zo šiestich testovaných kmeňov *S. aureus*, čo potvrdzuje jeho vysokú účinnosť medzi testovanými látkami (Obrázok 17). Kombinácie tymolu s kyselinou fusidovou tiež ukázali parciálne synergický efekt voči štyrom kmeňom MRSA, čo je významné vzhľadom na to, že samotný tymol má vysoké MIC hodnoty. Pri kombinácii s kyselinou fusidovou EGCG preukázal parciálne synergický efekt voči dvom kmeňom MRSA, a to aj napriek svojej vyššej MIC v porovnaní s ostatnými testovanými PL. Pri žiadnej z testovaných kombinácií PL s kyselinou fusidovou sa nezistili synergické interakcie.

Obrázok 17: Stanovenie FICi pomocou zafarbenia TTC (foto autor)

Tabuľka 3: Výsledky synergického testovania PL s ATB

PL	MO	MIC				FICi	EFEKT
		PL	ATB	PL v kombinácii	ATB v kombinácii		
TYMOL	SA 65895	1024	16	256	8	0,75	PSYN
	SA 55763	512	32	512	32	2	IND
	SA 58770	512	1	256	0,5	1	PSYN
	SA 59986	1024	16	256	8	0,75	PSYN
	SA 62397	1024	8	128	8	1,125	IND
	SA 65354	1024	4	128	2	0,625	PSYN
EGCG	SA 65895	32	16	32	8	1,5	IND
	SA 55763	256	16	128	16	1,5	IND
	SA 58770	128	1	128	0,5	1,5	IND
	SA 59986	64	16	32	8	1	PSYN
	SA 62397	64	16	32	4	0,75	PSYN
	SA 65354	128	4	256	2	2,5	IND
KUWANON G	SA 65895	4	8	4	0,5	1,06	IND
	SA 55763	4	16	4	0,5	1,03	IND
	SA 58770	4	2	4	0,0625	1,03	IND
	SA 59986	4	16	4	1	1,06	IND
	SA 62397	8	8	4	4	2	IND
	SA 65354	4	4	2	2	1	PSYN
ALBAFURAN C	SA 65895	4	16	2	8	1	PSYN
	SA 55763	4	16	2	8	1	PSYN
	SA 58770	4	1	4	0,0625	1,06	IND
	SA 59986	4	16	4	0,5	1,03	IND
	SA 62397	4	8	4	0,5	1,06	IND
	SA 65354	4	4	1	2	0,75	PSYN
KUWANON U	SA 65895	16	8	16	0,5	1,06	IND
	SA 55763	8	16	8	0,5	1,03	IND
	SA 58770	8	1	8	0,0625	1,06	IND
	SA 59986	16	16	16	1	1,06	IND
	SA 62397	16	8	8	8	1,5	IND
	SA 65354	8	4	4	2	1	PSYN

PL	MO	MIC				FICi	EFEKT
		PL	ATB	PL v kombinácii	ATB v kombinácii		
MORUSIN	SA 65895	4	8	2	4	1	PSYN
	SA 55763	8	16	2	8	0,75	PSYN
	SA 58770	4	1	2	0,0625	0,563	PSYN
	SA 59986	8	8	4	8	1,5	IND
	SA 62397	8	16	2	8	0,75	PSYN
	SA 65354	2	4	2	0,5	1,125	IND
KUWANON E	SA 65895	8	8	8	0,5	1,06	IND
	SA 55763	8	16	4	2	0,625	PSYN
	SA 58770	8	2	4	0,0625	0,531	PSYN
	SA 59986	8	16	8	0,5	1,03	IND
	SA 62397	8	16	8	1	1,06	IND
	SA 65354	8	4	2	2	0,75	PSYN
KUWANON C	SA 65895	4	16	4	0,5	1,03	IND
	SA 55763	2	16	1	1	0,5625	PSYN
	SA 58770	4	1	2	0,5	1	PSYN
	SA 59986	4	16	2	8	1	PSYN
	SA 62397	4	8	2	4	1	PSYN
	SA 65354	4	4	2	2	1	PSYN

Vysvetlivky: ATB – antibiotikum, FIC_i – index frakčnej inhibičnej koncentrácie, IND – indiferencia, MIC – minimálna inhibičná koncentrácia, MO – mikroorganizmus, PL – prírodná látka, PSYN – parciálny synergizmus

5 Diskusia

Hlavným cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bolo stanovenie MIC ôsmich PL, dvoch ATB a ich následné synergické testovanie. Na začiatok bolo potrebné určiť MIC všetkých testovaných antimikrobiálnych látok a ATB pre kmene *S. aureus* (SA 65895, SA 55763, SA 58770, SA 59986, SA 62397 a SA 65354).

Pomocou mikrodilučnej metódy sa najprv stanovili hodnoty MIC, ktoré boli následne porovnané s normami EUCAST. Tieto normy stanovujú hraničné hodnoty MIC pri použití topických ATB, a na základe nich rozlišujú medzi citlivými a rezistentnými kmeňmi mikroorganizmov. Pre *S. aureus* sú hraničné hodnoty MIC mupirocínu a kyseliny fusidovej stanovené na 1 μg/ml (85). Podľa našich meraní boli všetky naše kmene citlivé voči mupirocínu a rezistentné voči kyseline fusidovej.

Ďalej bola testovaná MIC ôsmich PL – dvoch komerčne dostupných (tymol, EGCG), a šiestich izolovaných fenolických látok z moruše bielej, a to prenylované flavonoidy – morusin, kuwanon C, geranylové flavonoidy – kuwanon U a kuwanon E a DAA – albafuran C a kuwanon G. Prenylované fenolické zlúčeniny kombinujú fenolický základ s terpenickým reťazcom, a preto boli vybrané komerčne dostupné látky EGCG, ako zástupca fenolických látok, a tymol ako zástupca terpenických zlúčenín. K výberu týchto látok prispelo nielen ich štrukturálne prepojenie s našimi izolovanými zlúčeninami, ale aj ich široké praktické využitie, najmä v magistraliter príprave, kde sú používané ako účinné farmaceutické zložky. EGCG sa využíva v dermatologických prípravkoch na liečbu akné a prevenciu starnutia pokožky vďaka svojim antioxidačným a protizápalovým vlastnostiam (86). Tymol sa bežne používa v antiseptických roztokoch, kloktadlách a mastiach na liečbu kožných infekcií (75). Z chemického hľadiska je tymol možné syntetizovať jednoduchým a nízkonákladovým spôsobom, prostredníctvom alkylácie *m*-krezolu izopropanolom za použitia kyslých katalyzátorov (87). Naopak, syntéza EGCG je náročnejšia pre jeho komplexnú štruktúru a nestabilitu (80). Preto sa EGCG zvyčajne získava extrakciou z listov zeleného čaju, avšak tento proces je taktiež časovo aj finančne náročný (88).

MIC týchto PL bola testovaná rovnako mikrodilučnou metódou. Vzhľadom na rozdiely v niektorých hodnotách bolo vykonaných niekoľko opakovaných meraní, kde ako MIC bola zvolená tá hodnota, ktorá sa najčastejšie opakovala. V rámci mikrobiológie je rozdiel MIC v jednom riedení tolerovaný a považovaný za správny výsledok. Príčiny väčších rozdielov môžu byť rôzne, napr. nepresnosti pri pipetovaní alebo individuálne rozdiely v reakcii baktérií.

V tejto súvislosti sa PL, najmä prenylované fenolické zlúčeniny, ukazujú ako významný zdroj účinných antimikrobiálnych látok. Zistené hodnoty MIC pre kuwanon C v tejto diplomovej práci sa pohybovali v rozmedzí 4–8 μg/ml. Niektoré PL izolované na Ústave prírodných liečiv Farmaceutickej fakulty Masarykovej univerzity boli v minulosti testované na Ústave molekulárnej farmácie Farmaceutickej

fakulty Masarykovej fakulty. Výsledky sú zhrnuté v publikácii Škovranová et al. (2022), ktorá pre kuwanon C uvádza hodnoty MIC v rovnakom rozsahu (55). Hodnota MIC pre albafuran C bola vo všetkých prípadoch rovnaká, a to 8 µg/ml, čo sa nachádza v rozmedzí hodnôt (4–16 µg/ml) uvedených v štúdii. V prípade morusinu boli hodnoty MIC zistené v tejto práci 4–16 µg/ml a sú porovnateľné s článkom Škovranová et al. (2022), ktorá uvádza MIC pre morusin v rozmedzí 2–8 µg/ml, a čiastočne sa zhodujú s výsledkami Aelenei et al. (2020), kde bola zistená MIC 6,25–12,5 µg/ml (55,89). Rozdiely sú však viditeľné pri porovnaní so štúdiou Guo Ying Zuo et al. (2018), ktorá uvádza širší rozsah MIC pre morusin (8–128 µg/ml), čo by mohlo byť spôsobené rozdielmi v testovaných kmeňoch alebo experimentálnych podmienkach (90). Pre kuwanon U bola v tejto práci stanovená MIC pre všetky testované kmene 16 µg/ml. To je mierne vyššie v porovnaní s výsledkami Škovranová et al. (2022), kde bola zistená MIC 4–8 µg/ml, a v súlade s článkom Čulenová et al. (2020), ktorá uvádza MIC nižšiu ako 16 µg/ml (52,55). V prípade kuwanonu E bola hodnota MIC 16 µg/ml pre všetky testované kmene, čo je vyššia hodnota v porovnaní s výsledkami Škovranová et al. (2022) (MIC 4–8 µg/ml) (55). Avšak výsledky Guo Ying Zuo et al. (2018) uvádzajú širší rozsah hodnôt MIC (4–128 µg/ml), čo naznačuje potenciálne rozdiely v citlivosti testovaných kmeňov (90). Kuwanon G mal v tejto práci hodnotu MIC 8 µg/ml pre všetky testované kmene, čo je v súlade s výsledkami Aelenei et al. (2020), ktorá uvádza hodnoty MIC v rozsahu 6,25–12,5 µg/ml (89). EGCG vykazoval hodnoty MIC v rozmedzí od 64–128 µg/ml. Tieto hodnoty sú podobné výsledkom Feilcke et al. (2023), ktorí uvádzajú MIC pre EGCG na úrovni 100 µg/ml, pričom menšie odchýlky môžu byť spôsobené variabilitou v metódach testovania (91). Tymol mal vo všetkých prípadoch hodnotu MIC 512 µg/ml, čo zodpovedá výsledkom Engel et al. (2017), ktorí zistili hodnotu MIC na úrovni 662 µg/ml (92). Táto zhoda potvrdzuje nízku antibakteriálnu aktivitu tymolu v porovnaní s prenylovanými flavonoidmi.

Tieto výsledky celkovo naznačujú, že prenylované fenoly, spolu s DAA môžu byť účinnými antimikrobiálnymi látkami, hoci ich účinnosť nedosahuje úroveň bežných ATB, ako je mupirocín. Prenylované flavonoidy a DAA však vykazovali výrazne nižšie hodnoty MIC v porovnaní s tymolom a EGCG, veľmi známe a široko dostupné látky. Navyše ide o prírodné zlúčeniny, pričom doposiaľ nebola popísaná rezistencia na flavonoidy, čo z nich robí perspektívnych kandidátov pre ďalší výskum v oblasti antimikrobiálnych látok.

Testovanie synergických interakcií PL s kyselinou fusidovou preukázalo parciálny synergizmus pre viaceré kombinácie voči kmeňom MRSA. Tento efekt možno pripísať schopnosti prenylovaných fenolov a DAA zvýšiť permeabilitu bakteriálnej membrány, čo uľahčuje prienik kyseliny fusidovej do bakteriálnej bunky, ako uvádza aj Aelenei et al. (2020) (89). Tieto výsledky naznačujú, že práve prenylované fenoly a DAA by mohli prispieť k rozšíreniu spektra účinných látok antibakteriálnej liečby.

EGCG a tymol, napriek svojim vyšším individuálnym MIC hodnotám (EGCG 64–128 µg/ml, tymol 512 µg/ml), preukázali parciálnu synergiu v kombinácii s kyselinou

fusidovou voči dvom až štyrom kmeňom MRSA. Tymol dosiahol parciálnu synergiu s kyselinou fusidovou voči kmeňom SA 65895, SA 58770, SA 59986 a SA 65354, pričom zníženie MIC kyseliny fusidovej v týchto kombináciách poukazuje na možné interakcie medzi molekulami PL a ATB. Jeho lipofilný charakter, ktorý pôsobí na bunkovú membránu, spôsobuje disperziu polypeptidových reťazcov bunkovej membrány a destabilizuje jej permeabilitu, čo bolo potvrdené aj v štúdii Veras et al. (2013) (93). EGCG preukázal parciálnu synergiu s dvoma kmeňmi MRSA (SA 59986, SA 62397), a to aj napriek svojim vyšším MIC hodnotám pri individuálnom testovaní. Pri žiadnej z kombinácií testovaných PL sa nezistili synergické účinky. Tieto látky predstavujú významné príklady komerčne dostupných prírodných zlúčenín s preukázanou antimikrobiálnou aktivitou, avšak ich účinnosť je nižšia v porovnaní s izolovanými prenylovanými fenolickými zlúčeninami a DAA, ktoré vykazovali výrazne nižšie MIC hodnoty voči rovnakým kmeňom MRSA.

Výsledky tejto diplomovej práce ukazujú, že je nevyhnutné pokračovať vo výskume rastlinných PL, pretože prinášajú sľubné výsledky v boji proti *S. aureus*. Náš výskum sa zameriaval na hľadanie nových možností liečby topických infekcií a rán, preto sme porovnávali a testovali topické ATB. Prenylované flavonoidy a DAA sa javia ako perspektívne zlúčeniny vďaka ich schopnosti pôsobiť antibakteriálne, protizápalovo, antioxidačne a podporovať hojenie rán. Tieto účinky by mohli prispieť k efektívnejšej terapii topických infekcií a rýchlejšiemu hojeniu rán. Parciálne synergický účinok, ktorý sa prejavil pri použití kuwanonu C, morusinu a albafuranu C v kombinácii s kyselinou fusidovou, ukazuje ich veľký potenciál pri doplnkovej terapii. Tieto prírodné produkty majú nielenže antibakteriálne účinky, ale tiež zvyšujú účinnosť bežných ATB. To znamená, že na dosiahnutie rovnakého efektu je potrebná nižšia dávka ATB, čo môže pomôcť zmierniť niektoré vedľajšie účinky spojené s vysokými dávkami. Tento synergizmus je obzvlášť dôležitý v čase rastúcej antibiotickej rezistencie, pretože ponúka nádej na obnovu účinnosti existujúcich ATB voči rezistentným kmeňom. Okrem toho, vďaka ich multitargetovému účinku, a pôsobení na viacero cieľov v bakteriálnych bunkách, tieto látky vykazujú nižšiu pravdepodobnosť vzniku rezistencie v porovnaní s konvenčnými ATB, ktoré zväčša účinkujú inhibíciou jednej konkrétnej dráhy.

6 Záver

Antibiotická rezistencia je jedným z hlavných problémov súčasnej medicíny, a preto je hľadanie nových terapeutických prístupov nevyhnutné. Táto práca sa zamerala na testovanie antibakteriálnych vlastností vybraných prírodných látok (PL) a ich potenciálu zvýšiť účinnosť topických antibiotík v terapii infekcií spôsobených meticilín rezistentnými kmeňmi *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Medzi testovanými prenylovanými flavonoidmi dosiahol najlepšie výsledky kuwanon C, ktorý vykázal nízke hodnoty MIC (4–8 µg/ml) a preukázal parciálny synergizmus v kombinácii s kyselinou fusidovou voči piatim testovaným kmeňom MRSA. Albafuran C a kuwanon G dosiahli MIC 8 µg/ml, pričom albafuran C preukázal parciálny synergizmus voči trom kmeňom a kuwanon G voči jednému kmeňu MRSA. Kuwanon E a kuwanon U s MIC 16 µg/ml vykazovali parciálne synergický efekt v kombinácii s kyselinou fusidovou voči jednému alebo trom kmeňom MRSA. Morusin s MIC v rozmedzí 4–16 µg/ml dosiahol parciálny synergizmus v kombinácii s kyselinou fusidovou voči štyrom kmeňom MRSA.

Komerčne dostupné PL, EGCG a tymol, ktoré sa často využívajú v praxi, preukázali omnoho vyššie hodnoty MIC (64–128 µg/ml pre EGCG a 512 µg/ml pre tymol) v porovnaní s prenylovanými fenolickými látkami. Aj napriek týmto vyšším hodnotám MIC preukázali parciálny synergický efekt s kyselinou fusidovou. EGCG vykazoval parciálny synergizmus voči dvom kmeňom MRSA, zatiaľ čo tymol vykazoval parciálny synergizmus voči štyrom kmeňom.

Výsledky tejto práce potvrdzujú, že PL, najmä prenylované flavonoidy a Diels-Alderove adukty, môžu významne prispieť k zlepšeniu topickej liečby infekcií spôsobených MRSA. Ich parciálne synergický efekt s kyselinou fusidovou naznačuje možnosť zníženia dávok antibiotík, čím by sa minimalizovalo riziko vzniku rezistencie a vedľajších účinkov. Ako najsľubnejšieho kandidáta môžeme označiť kuwanon C, ktorý dosiahol najlepšie výsledky v hodnotách MIC aj z hľadiska synergického potenciálu.

Táto práca zdôrazňuje význam ďalšieho výskumu PL a ich aplikácie v kombinovanej terapii, čo predstavuje perspektívny prístup v boji proti narastajúcej antibiotickej rezistencii a komplikáciám spojeným s terapiou infekcií MRSA. V rámci ďalšieho výskumu by bolo vhodné zamerať sa na kombináciu kuwanonu C s kyselinou fusidovou a otestovať túto kombináciu in vivo, a zároveň sa bližšie zamerať na zmeny v genóme MRSA pod vplyvom PL v kombinácii s antibiotikami.

Výsledky tejto diplomovej práce boli taktiež prezentované formou posteru na konferencii Phytochemical Society of Europe – Trends in Natural Products 2024 Young Scientists' Meeting v Brne. Poster je k dispozícii v prílohe tejto práce.

Použité zdroje

1. Scientific Commitees. European Commission. (n.d.) [cit 25. január 2025]. Glossary: Antimicrobial. Available at: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/triclosan/en/glossary/abc/antimicrobial.htm

2. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. (n.d.) [cit 24. január 2025]. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

3. Erwin DZ, Chen P. Mupirocin. V: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cit 25. január 2025]. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599499/

4. Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. J Antimicrob Chemother. 2015;70(10):2681–92.

5. Fernandes P. Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(1):a025437.

6. Yang Y, Qu L, Mijakovic I, Wei Y. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases. Microb Cell Factories. 2022;21(1):176.

7. Yadav H, Park EJ, Singh TP. Microbiota in skin inflammatory diseases. Frontiers Media SA; 2023. 189 s.

8. Tang Q, Xue N, Ding X, Tsai KHY, Hew JJ, Jiang R, et al. Role of wound microbiome, strategies of microbiota delivery system and clinical management. Adv Drug Deliv Rev. 2023;192:114671.

9. Yang Y, Huang J, Zeng A, Long X, Yu N, Wang X. The role of the skin microbiome in wound healing. Burns Trauma. 2024;12:tkad059.

10. Ersanli C, Tzora A, Voidarou C (Chrysa), Skoufos S, Zeugolis DI, Skoufos I. Biodiversity of Skin Microbiota as an Important Biomarker for Wound Healing. Biology. 2023;12(9):1187.

11. Patel BK, Patel KH, Huang RY, Lee CN, Moochhala SM. The Gut-Skin Microbiota Axis and Its Role in Diabetic Wound Healing—A Review Based on Current Literature. Int J Mol Sci. 2022;23(4):2375.

12. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(5):877–86.

13. Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner-Kerr T, Davidson J, et al. Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research. J Am Geriatr Soc. 2015;63(3):427–38.

14. Żwierełło W, Piorun K, Skórka-Majewicz M, Maruszewska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: Classification, Pathophysiology, and Treatment: A Review. Int J Mol Sci. 2023;24(4):3749.

15. Sayampanathan AA. Systematic review of complications and outcomes of diabetic patients with burn trauma. Burns. 2016;42(8):1644–51.

16. Chang WY, Liu HH, Huang DW, Chou Y yu, Ou KL, Wang CH, et al. Severe burn injury from the common Asian practice of heat application in patients with diabetic neuropathy. Int Wound J. 2022;19(4):845–52.

17. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in Burns. Surg Infect. 2016;17(2):250–5.

18. Peter Lengyel. Unilabs. 2021 [cit 18. marec 2025]. Popáleniny. Available at: https://www.unilabs.sk/clanky-invitro/popaleniny-1

19. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;13(5):605–13.

20. Mervis JS, Phillips TJ. Merck Manual Professional Edition. 2023 [cit 25. január 2025]. Pressure Injuries - Dermatologic Disorders. Available at: https://www.merckmanuals.com/professional/dermatologic-disorders/pressure-injury/pressure-injuries

21. Ranjan P. Nest Family Medicine. 2021 [cit 18. marec 2025]. What Are Bedsores and Where Can They Form on the Body? Available at: https://nestfamilymedicine.com/blog/what-are-bedsores-and-where-can-they-form-on-the-body

22. Lembcke-Grundy C. South Shore Foot & Ankle. 2022 [cit 18. marec 2025]. Should You Worry About a Diabetic Foot Ulcer? + Prevention and Treatment Options. Available at: https://southshorefootandankle.com/should-you-worry-about-a-diabetic-foot-ulcer-prevention-and-treatment-options/

23. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. Antibiotics. 2023;12(1):12.

24. Götz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol. 2002;43(6):1367–78.

25. Pouget C, Dunyach-Remy C, Pantel A, Schuldiner S, Sotto A, Lavigne JP. Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. Microorganisms. 2020;8(10):1580.

26. Bahgat M, Youghly NA. Biofilm Formation by Staphylococcus aureus in Wounds and Their Role in Antimicrobial Resistance. V: El-Dossoki F, Hassan M, Shehata A, editori. Proceedings of The First International Conference on Green Sciences. Cham: Springer Nature Switzerland; 2024. s. 331–43.

27. Watkins KE, Unnikrishnan M. Evasion of host defenses by intracellular *Staphylococcus aureus*. V: Gadd GM, Sariaslani S, editori. Advances in Applied Microbiology. Academic Press; 2020. s. 105–41.

28. Oliveira D, Borges A, Simões M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins. 2018;10(6):252.

29. Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. Staphylococcal Toxic Shock Syndrome: Mechanisms and Management. Curr Infect Dis Rep. 2010;12(5):392–400.

30. Abebe AA, Birhanu AG. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Mechanisms Underlying Drug Resistance Development and Novel Strategies to Combat. Infect Drug Resist. 2023;16:7641–62.

31. Stacey HJ, Clements CS, Welburn SC, Jones JD. The prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among diabetic patients: a meta-analysis. Acta Diabetol. 2019;56(8):907–21.

32. Giudice PD. Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus. Acta Derm Venereol. 2020;100(9):208–15.

33. National Health Service. NHS. 2017 [cit 18. marec 2025]. Impetigo. Available at: https://www.nhs.uk/conditions/impetigo/

34. Stamford Skin Centre - Medical Cosmetic Laser. ERYSIPELAS AND CELLULITIS [Internet]. Stamford Skin Centre. 2023 [cit 18. marec 2025]. Available at: https://stamfordskin.com/en/dermatology/erysipelas-and-cellulitis/

35. Linz MS, Mattappallil A, Finkel D, Parker D. Clinical Impact of Staphylococcus aureus Skin and Soft Tissue Infections. Antibiotics. 2023;12(3):557.

36. Sabat AJ, Wouthuyzen-Bakker M, Rondags A, Hughes L, Akkerboom V, Koutsopetra O, et al. Case Report: Necrotizing fasciitis caused by Staphylococcus aureus positive for a new sequence variant of exfoliative toxin E. Front Genet. 2022;13:964358.

37. Microbial Notes. Isolation and Identification of Staphylococcus aureus - Microbial notes [Internet]. 2024 [cit 26. január 2025]. Available at: https://microbialnotes.com/isolation-and-identification-of-staphylococcus-aureus

38. Neuschlova M. Staphylococci and other grampositive cocci [Internet]. (n.d.) [cit 27. január 2025]; Jessenius Faculty of Medicine in Martin. Available at: https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/VLa/Staphylococci_and_other_grampositive_cocci_pdf.pdf

39. Modric J. Staph Diagnosis (Lab Tests) and Epidemiology (Where It Lives) [Internet]. Health Hype. (n.d.) [cit 27. január 2025]. Available at: https://www.healthhype.com/lab-tests-for-staph.html

40. Hirai J, Suzuki H, Sakanashi D, Kuge Y, Kishino T, Asai N, et al. The First Case Report of Community-Acquired Infective Endocarditis Due to Sequence Type 1223 Staphylococcus argenteus Complicated with Convexity Subarachnoid Hemorrhage. Infect Drug Resist. 2022;Volume 15:4963–70.

41. Rocchetti TT, Martins KB, Martins PYF, Oliveira RA de, Mondelli AL, Fortaleza CMCB, et al. Detection of the *mec*A gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. Braz J Infect Dis. 2018;22(2):99–105.

42. Palomares C, Torres MJ, Torres A, Aznar J, Palomares JC. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;45(3):183–9.

43. Järvinen AK, Laakso S, Piiparinen P, Aittakorpi A, Lindfors M, Huopaniemi L, et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. BMC Microbiol. 2009;9(1):161.

44. Engelkirk PG, Duben-Engelkirk JL. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 780 s.

45. Jesseniova lekárska fakulta UK. STAPHYLOCOCCI [Internet]. Ústav mikrobiológie a imunológie; (n.d.). Available at: https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-mikrobiologie-a-imunologie/VLa/STAPHYLOCOCCI.pdf

46. Hartline R. Biology LibreTexts. 2022 [cit 18. marec 2025]. Coagulase Test. Available at: https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_Laboratory_Manual_(Hartline)/01%3A_Labs/1.24%3A_Coagulase_Test

47. Alksne L, Makarova S, Avsejenko J, Cibrovska A, Trofimova J, Valciņa O. Determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by MALDI-TOF MS in clinical isolates from Latvia. Clin Mass Spectrom. 2020;16:33–9.

48. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):547–603.

49. Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, et al. Identification of a Variety of Staphylococcus Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2010;48(3):941–5.

50. Yang ZG, Matsuzaki K, Takamatsu S, Kitanaka S. Inhibitory Effects of Constituents from Morus alba var. multicaulis on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cells. Molecules. 2011;16(7):6010–22.

51. Bukhari R, Sudan K. Analysis on the Effect of Different Mulberry Varieties on the Commercial Parameters of Mulberry Silkworm (Bombyx mori): A Review. J Exp Agric Int. 2021;43(8):22–8.

52. Čulenová M, Sychrová A, Hassan STS, Berchová-Bímová K, Svobodová P, Helclová A, et al. Multiple In vitro biological effects of phenolic compounds from *Morus alba* root bark. J Ethnopharmacol. 2020;248:112296.

53. Ramappa Venkatesh Kumar, Seema Chauhan. Mulberry: Life enhancer. J Med Plants Res. 2008;2(10):271–8.

54. Yuan Q, Zhao L. The Mulberry (Morus alba L.) Fruit—A Review of Characteristic Components and Health Benefits. J Agric Food Chem. 2017;65(48):10383–94.

55. Škovranová G, Čulenová M, Treml J, Dzurická L, Marova I, Sychrová A. Prenylated phenolics from Morus alba against MRSA infections as a strategy for wound healing. Front Pharmacol. 2022;13.

56. Gardenia Creating Gardens. Gardenia. (n.d.) [cit 18. marec 2025]. Morus alba (White Mulberry). Available at: https://www.gardenia.net/plant/morus-alba

57. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016;5:e47.

58. Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. J AOAC Int. 2019;102(5):1397–400.

59. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front Plant Sci. 2012;3:222.

60. Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. Molecules. 2023;28(13):4982.

61. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Sci World J. 2013;2013:162750.

62. Lv HW, Wang QL, Luo M, Zhu MD, Liang HM, Li WJ, et al. Phytochemistry and pharmacology of natural prenylated flavonoids. Arch Pharm Res. 2023;46(4):207–72.

63. Hošek J, Bartos M, Chudík S, Dall'Acqua S, Innocenti G, Kartal M, et al. Natural Compound Cudraflavone B Shows Promising Anti-inflammatory Properties in Vitro. J Nat Prod. 2011;74(4):614–9.

64. Donadio G, Mensitieri F, Santoro V, Parisi V, Bellone ML, De Tommasi N, et al. Interactions with Microbial Proteins Driving the Antibacterial Activity of Flavonoids. Pharmaceutics. 2021;13(5):660.

65. Panek-Krzyśko A, Stompor-Gorący M. The Pro-Health Benefits of Morusin Administration—An Update Review. Nutrients. 2021;13(9):3043.

66. Zelová H, Hanáková Z, Čermáková Z, Šmejkal K, DalÍ Acqua S, Babula P, et al. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Prenylated Substances Isolated from Morus alba and Morus nigra. J Nat Prod. 2014;77(6):1297–303.

67. Sychrová A, Škovranová G, Čulenová M, Bittner Fialová S. Prenylated Flavonoids in Topical Infections and Wound Healing. Molecules. 2022;27(14):4491.

68. Reusch W. Diels-Alder Cycloaddition [Internet]. LibreText; 2013 [cit 26. január 2025]. Available at: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Alkenes/Reactivity_of_Alkenes/Diels-Alder_Cycloaddition

69. Luo SY, Zhu JY, Zou MF, Yin S, Tang GH. Mulberry Diels–Alder-type adducts: isolation, structure, bioactivity, and synthesis. Nat Prod Bioprospecting. 2022;12(1):31.

70. Total Synthesis. Total Synthesis - Organic Chemistry. 2024 [cit 26. január 2025]. Diels Alder Reaction Mechanism, Orbitals & Examples. Available at: https://total-synthesis.com/diels-alder-reaction/

71. Luo SY, Tang ZY, Li Q, Weng J, Yin S, Tang GH. Total Synthesis of Mulberry Diels–Alder-Type Adducts Kuwanons G and H. J Org Chem. 2021;86(6):4786–93.

72. Jin SE, Ha H, Shin HK, Seo CS. Anti-Allergic and Anti-Inflammatory Effects of Kuwanon G and Morusin on MC/9 Mast Cells and HaCaT Keratinocytes. Molecules. 2019;24(2):265.

73. Dimitriu G. Preliminary studies regarding antimicrobial effect of various kuwanon G - antibiotic combinations on some MRSA strains [Internet]. Lucrări Științifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași; 2017 [cit 27. január 2025]. Available at: https://www.academia.edu/125311338/Preliminary_studies_regarding_antimicrobial_effect_of_various_kuwanon_G_antibiotic_combinations_on_some_MRSA_strains

74. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem. 2016;210:402–14.

75. Escobar A, Pérez M, Romanelli G, Blustein G. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. Arab J Chem. 2020;13(12):9243–69.

76. Liu Y, Yan H, Yu B, He J, Mao X, Yu J, et al. Protective Effects of Natural Antioxidants on Inflammatory Bowel Disease: Thymol and Its Pharmacological Properties. Antioxidants. 2022;11(10):1947.

77. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Taee H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. Front Pharmacol. 2017;8:380.

78. Khan ST, Khan M, Ahmad J, Wahab R, Abd-Elkader OH, Musarrat J, et al. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by Streptococcus mutans. AMB Express. 2017;7(1):49.

79. Mokra D, Joskova M, Mokry J. Therapeutic Effects of Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in Relation to Molecular Pathways Controlling Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2022;24(1):340.

80. Zhuang Y, Quan W, Wang X, Cheng Y, Jiao Y. Comprehensive Review of EGCG Modification: Esterification Methods and Their Impacts on Biological Activities. Foods. 2024;13(8):1232.

81. Zhang Y, Lin H, Liu C, Huang J, Liu Z. A review for physiological activities of EGCG and the role in improving fertility in humans/mammals. Biomed Pharmacother. 2020;127:110186.

82. Legeay S, Rodier M, Fillon L, Faure S, Clere N. Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. Nutrients. 2015;7(7):5443–68.

83. Frasheri L, Schielein MC, Tizek L, Mikschl P, Biedermann T, Zink A. Great green tea ingredient? A narrative literature review on epigallocatechin gallate and its biophysical properties for topical use in dermatology. Phytother Res. 2020;34(9):2170–9.

84. EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect. 2000;6(9):503–8.

85. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoints. (n.d.) [cit 17. marec 2025]. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Available at: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

86. Zheng XQ, Zhang XH, Gao HQ, Huang LY, Ye JJ, Ye JH, et al. Green Tea Catechins and Skin Health. Antioxidants. 2024;13(12):1506.

87. Mesbah M, Soltanali S, Bahranifard Z, Hosseinzadeh A, Karami H. Production of thymol from alkylation of m-cresol with isopropanol over ZSM-5 catalysts: Artificial Neural Network (ANN) modelling. J Indian Chem Soc. 2023;100(2):100882.

88. Hiep NT, Duong HT, Anh DT, Hoai Nguyen N, Thai DQ, Linh DTT, et al. Subcritical Water Extraction of Epigallocatechin Gallate from Camellia sinensis and Optimization Study Using Response Surface Methodology. Processes. 2020;8(9):1028.

89. Aelenei P, Rimbu CM, Horhogea CE, Lobiuc A, Neagu AN, Dunca SI, et al. Prenylated phenolics as promising candidates for combination antibacterial therapy: Morusin and kuwanon G. Saudi Pharm J SPJ. 2020;28(10):1172–81.

90. Zuo GY, Yang CX, Han J, Li YQ, Wang GC. Synergism of prenylflavonoids from *Morus alba* root bark against clinical MRSA isolates. Phytomedicine. 2018;39:93–9.

91. Feilcke R, Bär V, Wendt C, Imming P. Antibacterial and Disinfecting Effects of Standardised Tea Extracts on More than 100 Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Plants. 2023;12(19):3440.

92. Engel JB, Heckler C, Tondo EC, Daroit DJ, da Silva Malheiros P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. Int J Food Microbiol. 2017;252:18–23.

93. Veras HNH, Rodrigues FFG, Botelho MA, Menezes IRA, Coutinho HDM, Costa JGM. Enhancement of aminoglycosides and β-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. Arab J Chem. 2017;10:S2790–5.

Príloha A Poster – Phytochemical Society of Europe – Trends in Natural Products 2024

MUNI PHARM

Antimicrobial properties of phenolics against fusidic acid-resistant MRSA in wound healing

PSE

Gabriela Škovranová[1,2]*, Monika Trembecká[1], Helena Žemličková[3,4], Alice Sychrová[2]

[1]Department of Molecular Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Palackého tř. 1946/1, 612 00 Brno, Czechia
[2]Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Palackého tř. 1946/1, 612 00 Brno, Czechia
[3]Centre of Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 00 Vinohrady, Czechia
[4]Department of Microbiology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Královské Vinohrady and National Institute of Public Health, Ruská 87, 100 00 Prague, Czechia
*Corresponding author: skovranovag@pharm.muni.cz

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a pathogen known to cause skin and soft-tissue infections. The emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has resulted in the ineffectiveness of antibiotic treatment, including topical antibiotics. Plant-derived compounds, particularly prenylated phenolics, provide a significant source of potent antimicrobial agents.[1] Additionally, they offer promise in wound healing and topical infection management due to their diverse biological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant effects. Their capacity to promote tissue regeneration while preserving cell viability highlights their potential therapeutic value in wound care.[2]

Morus alba L., root bark
Diels-Alder adducts, prenylated flavonoids

Paulownia tomentosa (Thunb.) Steud., fruits
prenylated flavonoids

METHODS

1) The antimicrobial activity of eight compounds was tested against six MRSA clinical isolates resistant to fusidic acid. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the microdilution method.
2) The potential synergistic interaction with fusidic acid was evaluated using the checkerboard titration technique, and the fractional inhibitory concentration (FIC) described synergy (FIC ≤0.5), additive effect (0.5< FIC ≤1); and indifference (1< FIC ≤4).
3) To utilize natural compositions in wound healing, it is crucial to assess their impact on human cells. The effect on cell viability of human keratinocytes (HaCaT) was evaluated using MTT assay or reported in the literature.

RESULTS

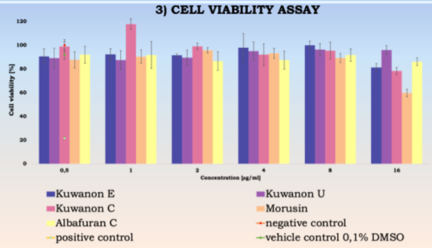
1) ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST MRSA

COMPOUNDS	MIC [µg/ml]					
	SA 65895	SA 55763	SA 58770	SA 59986	SA 62397	SA 65354
THYMOL	512	512	512	512	512	512
EGCG	128	128	64	128	128	64
KUWANON G	8	8	16	8	8	8
ALBAFURAN C	8	8	8	8	8	8
KUWANON U	16	16	16	16	16	16
MORUSIN	16	16	16	8	8	8
KUWANON E	16	16	16	16	16	16
KUWANON C	4	8	8	4	4	4
FUSIDIC ACID	16	16	2	8	16	8
MUPIROCIN	0.125	0.250	0.064	0.125	0.125	0.125

EGCG – epigallocatechin gallate MIC – minimum inhibitory concentration SA – *Staphylococcus aureus*

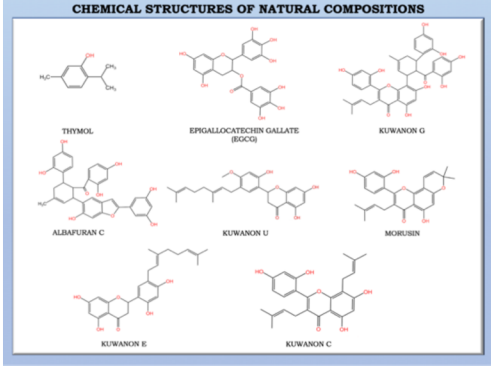
MRSA growth was inhibited by prenylated phenolics in a range of 4–16 µg/ml. All clinical isolates were found to be resistant to fusidic acid, as demonstrated by MIC values of ≥2 µg/ml.

3) CELL VIABILITY ASSAY



Prenylated flavonoids and DAAs at concentrations equivalent to the MICs against MRSA strains did not affect cell viability and are considered non-toxic for HaCaT.[1] Recent data shows the cell viability of HaCaT treated with kuwanon G is >100% at a concentration similar to MIC.[3] Thymol is the most toxic compound, showing cell viability of less than 15% at a concentration of 100 µg/ml.[4] EGCG also shows cell viability of less than 50% at a concentration similar to MIC.[5]

CHEMICAL STRUCTURES OF NATURAL COMPOSITIONS



2) SYNERGISTIC POTENTIAL OF PHENOLICS

NC	MICROORGANISM	MIC				FIC	EFFECT
		NC	ATB	NC in combination	ATB in combination		
THYMOL	SA 65895	1024	16	256	8	0.75	ADD
	SA 55763	512	32	512	32	2	IND
	SA 58770	512	1	256	0.5	1	ADD
	SA 59986	1024	16	256	8	0.75	ADD
	SA 62397	1024	8	128	8	1.125	IND
	SA 65354	1024	4	128	2	0.625	ADD
EGCG	SA 65895	32	16	32	8	1.5	IND
	SA 55763	512	16	128	16	1.25	IND
	SA 58770	256	1	128	0.5	1	ADD
	SA 59986	64	16	32	8	1	ADD
	SA 62397	64	16	32	4	0.75	ADD
	SA 65354	256	4	256	2	1.5	IND
KUWANON G	SA 65895	4	8	4	0.5	1.06	IND
	SA 55763	4	16	4	0.5	1.03	IND
	SA 58770	4	1	4	0.063	1.06	IND
	SA 59986	4	16	4	1	1.06	IND
	SA 62397	8	8	4	4	2	IND
	SA 65354	4	4	2	2	1	ADD
ALBAFURAN C	SA 65895	4	16	2	8	1	ADD
	SA 55763	4	16	2	8	1	ADD
	SA 58770	4	1	4	0.063	1.06	IND
	SA 59986	4	16	4	0.5	1.03	IND
	SA 62397	4	8	4	0.5	1.06	IND
	SA 65354	2	4	1	2	1	ADD
KUWANON U	SA 65895	16	8	16	0.5	1.06	IND
	SA 55763	8	16	8	0.5	1.03	IND
	SA 58770	8	1	8	0.063	1.06	IND
	SA 59986	16	16	16	1	1.06	IND
	SA 62397	16	8	8	8	1.5	IND
	SA 65354	8	4	4	2	1	ADD
MORUSIN	SA 65895	4	8	2	4	1	ADD
	SA 55763	2	2	2	1	1.5	IND
	SA 58770	2	1	2	0.063	1.06	IND
	SA 59986	8	8	4	8	1.5	IND
	SA 62397	8	16	2	8	0.75	ADD
	SA 65354	2	4	2	0.5	1.125	IND
KUWANON E	SA 65895	8	8	8	0.5	1.06	IND
	SA 55763	4	16	2	4	0.75	ADD
	SA 58770	4	2	4	0.063	1.03	IND
	SA 59986	8	16	8	0.5	1.03	IND
	SA 62397	8	16	8	1	1.06	IND
	SA 65354	4	4	2	2	1	ADD
KUWANON C	SA 65895	4	16	4	0.5	1.03	IND
	SA 55763	2	16	1	1	0.563	ADD
	SA 58770	4	1	2	0.5	1	ADD
	SA 59986	4	16	2	8	1	ADD
	SA 62397	4	8	2	4	1	ADD
	SA 65354	4	4	2	2	1	ADD

ADD – additive effect ATB – antibiotic EGCG – epigallocatechin gallate FICi – fractional inhibitory concentration
IND – indifference MIC – minimum inhibitory concentration NC – natural composition

The combination of kuwanon E, U, morusin, and the Diels-Alder adducts (DAAs) kuwanon G and albafuran C exhibited additive effects against at least one MRSA isolate. The combination of kuwanon C and the antibiotic proved to be the most effective as it showed an additive effect against five strains of MRSA. When combined with fusidic acid, thymol and EGCG showed partial synergism against at least three MRSA strains, despite having higher MICs (≥32 µg/ml). No synergistic interactions were observed for any combinations of the selected compounds with fusidic acid.

CONCLUSION

To sum up, prenylated phenolics show promise as potential antimicrobial agents targeting MRSA, while also exhibiting anti-inflammatory and antioxidant properties. Additionally, they may aid in wound healing without adversely affecting the viability of HaCaT at concentrations comparable to the MICs, except for thymol and EGCG. Thus, these compounds hold significant potential for treating skin infections.

REFERENCES
[1] Škovranová, G. *et al.* Prenylated phenolics from Morus alba against MRSA infections as a strategy for wound healing. *Frontiers in Pharmacology* 2022.
[2] Sychrová, A. *et al.* Prenylated Flavonoids in Topical Infections and Wound Healing. *Molecules* 2022, *27* (14), 4491.
[3] Jin, S.E. *et al.* Anti-Allergic and Anti-Inflammatory Effects of Kuwanon G and Morusin on MC/9 Mast Cells and HaCaT Keratinocytes. *Molecules* 2019, *24*, 265.
[4] de Sousa Cutrim *et al.* New thymol-derived triazole exhibits promising activity against *Trichophyton rubrum*. *Braz J Microbiol* (2024).
[5] Leonilla Eibling *et al.* Hydrogen peroxide mediates EGCG-induced antioxidant protection in human keratinocytes, Free Radical Biology and Medicine, Volume 49, Issue 9, 2010, Pages 1444-1452, ISSN 0891-5849.