

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A
EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK
ROSTLIN
I. VLIV LÁTEK NA NĚKTERÉ ZÁSTUPCE RODU
EIMERIA

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT METABOLITES.
I. INFLUENCE OF PLANT CONSTITUENTS ON SOME SPECIES
OF THE GENUS EIMERIA.

Hradec Králové, květen 2006

Jana Kvapilová

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal CSc.

Děkuji Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi CSc.
za jeho ochotu, pomoc a odborné vedení, které
mi poskytl při vypracování mé diplomové
práce.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně a použila pouze zde uvedenou literaturu.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Fyziologie eimerií	10
3.2 Kontrola kokcidiózy	10
3.3 Antikokcidika přírodního původu	13
3.4 Substance a drogy používané pro přípravu extraktů	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	21
4.1 Příprava extraktů	22
4.2 Ztráta sušením	23
4.3 Příprava roztěrů	23
▪ Příprava roztěrů ze suchých extraktů	24
▪ Příprava roztěrů z tekutých extraktů	24
4.4 Metodika a výsledky experimentů	24
5. DISKUSE	46
6. SOUHRN	50
7. LITERATURA	51

1. ÚVOD

Kokcidióza celosvětově zůstává, a to i přes značný pokrok v oblasti chemoterapie, managementu chovu, výživy a genetiky, jedním z nejčastějších onemocnění drůbeže. Na vysoce konkurenčním trhu tak může výskyt nejen klinické, ale i subklinické formy kokcidiózy v chovu znamenat citelnou finanční újmu. Jedná se o ztráty způsobené nejen úhynem jednotlivých kusů drůbeže, ale i nižšími přírůstky hmotnosti a sníženou snáškovostí celých chovů. Velké škody lze zaznamenat rovněž v chovech králíků.

S touto velice nakažlivou nemocí se lze setkat všude tam, kde jsou kuřata chována, v malochovech i velkochovech, ale je pravidelným nálezem i u divoce žijících zvířat. Zejména existence velkochovů by byla neúnosná bez trvalé ochrany proti této parazitární invazi. V průmyslovém výkrmu drůbeže je tedy kladen zvýšený důraz především na prevenci kokcidiózy. Nabývá na důležitosti zejména proto, že doba, kdy jsou kuřata krmena, se neustále zkracuje.

Při běžných způsobech chovu s možností kontinuálního nakažení, by bez soustavného profylaktického podávání potřebných dávek velká část kuřat uhynula. Zde se nabízí možnost využití látek přírodního původu, především průběžným přidáváním do krmiva, tedy jako součást biofaktorů. Z dosavadních reakcí se dá předpokládat, že jejich aplikace by byla pro veřejnost daleko přijatelnější než použití látek syntetického, či biosyntetického původu. Stále obezřetněji se totiž sledují možné účinky antikokcidik na přírodu, a tedy i možnosti zpětného vlivu na člověka. U látek přírodního původu můžeme počítat s menším ekologickým dopadem na životní prostředí.

Hledání nových syntetických i přírodních antikokcidik má stále svůj význam, a to i přes rostoucí důležitost vakcinace. Dá se předpokládat, že výzkum bude i nadále intenzivně probíhat ještě minimálně příštích deset let. Rozhodně se nejedná o přežitek, či zbytečně vynaložené prostředky. Vakcinace určitě má svoje výhody, ale značná ekonomická nákladnost jejího výzkumu a vývoje a určitá nejistota v aplikaci se bude muset při konečném použití zaplatit.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) provést rešerši literatury s ohledem na rostliny nebo látky, které jsou aktivní vůči některým protozoálním původcům chorob hospodářských zvířat, zejména vůči zástupcům rodu *Eimeria*,
- 2) vybrat z tohoto přehledu 5 rostlin (resp. rostlinných částí) nebo čistých látek, které mají nejen účinky proti zástupcům rodu *Eimeria*, ale pokud možno disponují i jinými účinky (zejména antimikrobiálními a protizánětlivými),
- 3) připravit extrakty z vybraných rostlin (zajistit čisté látky),
- 4) připravit disperzi těchto látek v krmivu pro laboratorní zvířata (*Mastomys coucha*, myši CD1) v koncentraci 100 ppm sušiny extraktu (látky),
- 5) vyhodnotit výsledky biologických pokusů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 FYZIOLOGIE EIMERIÍ

Rod *Eimeria* (podtřída *Coccidia*) je jedním z nejvýznamnějších reprezentantů parazitických prvoků drůbeže. U kura domácího se vyskytuje až sedm druhů kokcií rodu *Eimeria*, ne všechny jsou však stejně patogenní. Pouze čtyři z nich jsou ekonomicky významné v intenzivních chovech drůbeže. Jedná se o *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, a *E. necatrix*.

S infekcí se setkáváme především u mladých jedinců. Největší vnímavost je u kuřat ve stáří čtyři až šest týdnů.

K nákaze dochází alimentární cestou, tedy požitím sporulovaných oocyst. Oocysty přežívají, zejména díky odolným obalům, ve vnějším prostředí až několik měsíců. Po jejich požití se do lumen střeva uvolňují sporozoiti (vývojová infekční fáze) a pronikají do buněk hostitele, kde po několikerém pomnožení vznikají merozoiti (nepohlavní stádium vývoje). U části merozoitů dochází k transformaci na stádia pohlavního množení, gamonty. Oplozením vzniká zygota postupně se vyvíjející v oocystu.

Vývojový cyklus končí vylučováním nesporulovaných, tedy neinfekčních stádií oocyst do vnějšího prostředí. V podestýlce drůbežáren dozrávají oocysty do infekčního stádia sporulovaných oocyst, schopných infikovat zdravou drůbež. Celý vývojový cyklus se v hostiteli uskuteční za čtyři až sedm dní v závislosti na druhu prvoka.

U kura se setkáváme především se střevní formou infekce. Paraziti způsobují různý stupeň rozpadu epitelu sliznice střeva. Charakteristické změny se objevují zejména u těch druhů kokcií, které prodělávají svůj vývoj v hloubce sliznice. Dochází k poškození krevních kapilár a v řadě případů tedy i ke krvácení do lumen střeva. Zmenšuje se aktivní povrch sliznice, podstatně je tedy snížena i resorpce živin a jejich transport. Nastává celková porucha látkové výměny a objevují se i rychlé ztráty živé hmotnosti. Lokalizace patogenních druhů kokcií ve střevech se liší v závislosti na druhu. Můžeme je nalézt v tenkém střevě (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitos*, *E. necatrix*) i ve střevě slepém (*E. tenella*). Zde však možný zásah do metabolismu prvoka znamená, kvůli uzavřenosti slepého střeva, problém.

3.2 KONTROLA KOKCIDIÓZY

Mimořádná reprodukční schopnost kokcií a poměrně rychlý rozvoj rezistence znamenají hlavní problémy spojené s kontrolou infekce.

Zbavit chovy kokcidií je prakticky nemožné. Zásahy proti onemocnění musí být vedeny důsledně a na několika úrovních:

1. zvýšit čistotu chovů - její zajištění je velmi významným faktorem diseminace oocyst, a tedy předpokladem pro zabránění reinfekce zvířat. Nevýhodou je značná resistance vůči desinfekčním prostředkům a pracnost provedení. Pro likvidaci oocyst se stále úspěšně používá především peroxid vodíku s bazickými sloučeninami (pH min. 7,5). Tímto způsobem je výrazně snížena sporulace oocyst po exkreci zvířaty u *Eimeria tenella*¹,
2. vakcinace - je přirozeným způsobem ochrany před vzplanutím klinické nebo subklinické formy kokcidiózy. U kuřat je navozena aktivní imunita. Ta je pro každý druh specifická, tzn. že nevzniká současně zkřížená imunita proti dalším druhům kokcidií. Je žádoucí vakcinovat kuřata proti ekonomicky významným druhům kokcidií co nejdříve, aby se imunita mohla vyvinout ještě před obdobím, kdy se klinická kokcidióza obvykle objevuje, což bývá mezi 21. – 28. dnem stáří kuřat.

Vakcíny proti kokcidióze drůbeže obsahují buď živé sporulované oocysty patogenních druhů (virulentní vakcíny) nebo živé sporulované oocysty oslabených kmenů rodu *Eimeria* (atenuované vakcíny). Nevýhodou virulentních vakcín je zejména fakt, že dochází k promořování okolního prostředí velkým počtem plně patogenních oocyst a je tu tedy i možnost, při případných poruchách imunity zvířat, propuknutí infekce. Při používání atenuovaných vakcín rozvoj klinické kokcidiózy nehrozí ani při oslabené imunitě,

3. antikokcidika - používají se terapeuticky (kokcidiocida) při zjištění klinické kokcidiózy, v podmínkách velkochovů však hlavně profylakticky (kokcidiostatika), tj. kontinuálně v krmných směsích.

Léčebná antikokcidika se aplikují ihned při prvním výskytu příznaků onemocnění, a to většinou prostřednictvím pitné vody². Musí být dodrženo doporučené schéma dávkování. Nepřetržité podávání nebo nesprávné koncentrace vedou k rozvoji rezistence.

Profylaktická antikokcidika mohou být rozdělena dle původu na syntetické, přírodní a biosyntetické látky².

Problematika aplikace antikokcidik

Aplikace antikokcidik musí být posuzována z řady hledisek:

- účinnost - protože infekce mají často směsný charakter, požadují se látky se širokým spektrem účinku,
- resistence - jsou vyžadována antikokcidika, která nevyvolávají vznik resistantních kmenů kokcií. Některé látky způsobují rychlý rozvoj resistance (v průběhu jednoho roku), jiné pomalejší (3 – 4 roky), u některých byla částečná resistance zjištěna až po osmi a více letech. Nástupu rezistence je nutné předcházet. Postupně byly vypracovány programy na tlumení kokcidióz, které nabídly chovatelům aplikaci antikokcidik střídavým nebo rotačním programem,
- imunita - u drůbeže určené k chovu jsou velmi vhodná antikokcidika, která umožňují tvorbu přirozené imunity proti kokcidióze, která ochrání kuřice před klinickou kokcidiózou po nezbytném vysazení přípravku na počátku snáškového období. Účinné přípravky však vývoj přirozené imunity nedovolují,
- snášlivost antikokcidik - vzhledem k dlouhodobé aplikaci těchto látek v krmivech se vyžaduje, aby měly nízkou toxicitu, co největší terapeutickou šíři a co nejméně vedlejších účinků. Především se sledují vedlejší účinky na snášku vajec a růst²,
- zdravotně – hygienické hledisko - antikokcidika a jejich rezidua nesmí ovlivnit kvalitu živočišných produktů. Pokud se tak děje, musí být vypuštěna z krmných směsí ve stanovené ochranné lhůtě před porážkou. U většiny antikokcidik se vyžaduje ochranná lhůta 3 – 5 dnů, u sulfonamidů 10 i více²,
- ostatní požadavky - důležité jsou také vlastnosti, které ovlivňují technologické aspekty využívání antikokcidik (dobrá homogenita ve směsích, dostatečná stabilita, odolnost, co nejnižší výskyt interakcí s ostatními složkami krmiv),

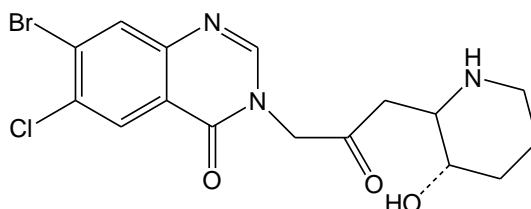
cena, dosažitelnost látek (v případě aplikace látek přírodní povahy), existence vhodných analytických metod pro stanovení látek i jejich intaktních residuí.

Vakcíny a antikokcidika nestojí proti sobě vždy jako rivalové. Vzhledem k tomu, že ve většině vakcín jsou vakcinační kmeny citlivé ke všem antikokcidikům, používají někteří producenti drůbeže rotační programy, ve kterých střídají po dvou až třech turnusech vakcinaci s antikokcidiky. Obnovuje se tím citlivost na kokcidií na antikokcidika.

3.3 ANTIKOKCIDIKA PŘÍRODNÍHO PŮVODU

Poslední dobou můžeme zaznamenat rostoucí nedůvěru veřejnosti ke všem hromadně používaným chemickým přípravkům v zemědělské praxi obecně. Roli hraje, kromě obav z účinku na zdraví lidí, i ekologické hledisko, tedy možný vliv látek na životní prostředí. Do přírody se totiž, spolu s podestýlkou z výkrmových hal, dostávají v mnohatunových množstvích ročně. V těchto souvislostech se nabízí možnost využití látek přírodního původu.

Výzkum v oblasti přírodních látek není příliš rozsáhlý. Jediným používaným a účinným přírodním kokcidiocidem je *halofuginon* (alkaloid z *Dichroa febrifuga*).



halofuginon

Jinak lze předpokládat, že látky přírodního původu budou mít spíše charakter kokcidiostatik než kokcidiocid. Existuje předpoklad profylaktické aplikace směsí látek z různých farmakoterapeutických skupin, které by působily vzájemně synergicky.

1. látky zvyšující imunitu střevní mukózy

Jejich význam spočívá především v zachování integrity střevní mukózy, která tak lépe odolává ataku invazního agens.

- *L-arginin* - stimuluje činnost thymu a T-lymfocytů, snižuje počet T supresorů/cytotoxických buněk, zvyšuje počet a aktivitu NK buněk³,

- *L-glutamin* - rovněž vykazuje imunomodulační aktivitu, hraje významnou roli v ochraně integrity GIT, tlumí katabolické procesy, zvyšuje fagocytární aktivitu buněk (neutrofilů, monocytů), zvyšuje syntézu glutathionu v intestinální oblasti, což hraje významnou roli v integritě střevní mukózy postižené např. oxidačním stresem^{4,5,6,7},
- *kvasinkové β-glukany* - získávají se extrakcí ze stěny buněk pivovarských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*). Mají imunomodulační aktivitu, mohou se vázat na řadu buněk uplatňujících se v imunitní odpovědi (makrofág, neutrofilů)^{8,9}.

2. látky ovlivňující růst patologických mikroorganismů ve střevní flóře

Střevo může být sekundárně osídleno patogenní mikroflórou (kvasinky, patogenní houby, bakterie aj.), která oslabuje imunitní funkce střevního epitelu a tím následně usnadňuje penetraci kokcií. Je tedy vhodné podávat látky zabraňující růstu patogenních agens (tedy s bakteriostatickým účinkem). Užívané koncentrace by měly být malé kvůli zabránění případnému antinutričnímu efektu.

- Zástupci rodu *Allium*, především silice z *Allium sativum* - česnek setý má významné antimutagenní, antimikrobiální, anthelmintické, antifungální a antiprotozoální účinky^{10,11}.
- Vůči běžným patogenům jsou také účinné silice z rostlinných taxonů, např. z *Citrus aurantium*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Melaleuca alternifolia* („tea tree“), *Mentha spicata*, *Majorana hortensis*, *Pimpinella anisum*, *Pogostemon patchouli* (pačuli), *Salvia officinalis* (šalvěj lékařská), *Syzygium aromaticum*, zejména však *Cymbopogon martinii*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* a nejvíce *Cymbopogon citratus*¹².
- Mohou být rovněž použity extrakty z léčivých drog obsahující antisepticky působící silice dohromady s dalšími látkami, především s tříslovinami a flavonoidy, jako např. *Carum carvi*, *Hyssopus officinalis*, *Matricaria recutita*, *Ocimum basilicum*, *Satureja hortensis*. Většina z těchto rostlin má zároveň účinky proti střevním parazitům.
- Některé silice mohou působit derivačně na střevní mukózu, zvyšovat její prokrvení, a tak dráždit. Setkáváme se s tím např. u silice získané ze zástupců čeledi Cupressaceae (*Juniperus oxycedrus*, *Pinus mugo* aj.) podobný účinek vykazují i oleoresiny (*Capsicum annuum*).

3. látky působící antidiarhoidálně

Kokcidióza, stejně jako další střevní infekce, vede k exkreci nestrukturovaných výkalů, často s příměsí krve. Průjem mohou ovlivňovat strukturně různé sloučeniny, např.:

- *komplexní polysacharidy (potravní vláknina) - Eimeria acervulina*, u kuřat s enteritidou se po kukuřičné dietě snížil počet nekrotických lézí¹³,
- *isochinolinové alkaloidy (berberin a podobné alkaloidy) - zástava průjmu při protozoálních infekcích (vyzkoušeno humánně)*¹⁴.

U antidiarhoidálních látek můžeme zaznamenat výrazně antinutriční efekt, tedy snížení využitelnosti krmné dávky. Zdá se, že kompromis může být v tomto případě realizován použitím sloučenin na bázi flavan-3,4-olů (tzv. oligomerních procyanidinů), které jsou přítomny v různých léčivých drogách, např. v:

- *Agrimonia eupatoria* - řepík lékařský - obsahové látky nati působí příznivě na játra, zvyšují vylučování trávicích šťáv, tonizují střevní peristaltiku, mají adstringentní, mírně dezinfekční, protizánětlivé a mírné antiparazitární účinky,
- *Camellia sinensis* - čajovník čínský - dekofeinovaný extrakt obsahuje oligomerní procyanidiny s nízkým adstringentním, ale s výrazným antioxidačním účinkem,
- *Fragaria vesca* - jahodník obecný - obsahové látky listů mají svíravý a bakteriostatický účinek,
- *Vitis vinifera* - réva vinná - semena obsahují oligomerní procyanidiny podobného charakteru jako v případě *Camellia sinensis*.

4. látky ovlivňující metabolismus kokcií

U steroidních sapogeninů (aglykony) byla zaznamenána antivirová¹⁵, antimikrobiální¹⁶ a antifungální aktivita¹⁷. V rostlinných surovinách nacházíme aglykony ve směsi spolu s glykosidy (saponiny). Tyto látky lze využít k zásahu proti kokciím, protože se jedná o látky povrchově aktivní. Konkrétně k ovlivňování integrity stěny oocyst, jejich virulence a dalšího vývoje.

Steroidní saponiny můžeme nalézt např. v těchto rostlinných taxonech: *Aesculus, Allium, Asparagus, Avena, Dioscorea, Solanum, Tribulus, Trigonella* aj..

Účinek přírodních látek perspektivních v terapii kokcidióz (viz. výše) může být potencován použitím některých vitaminů či anorganických látek.

- *Kyselina askorbová (vitamin C)* - kromě své role v syntéze kolagenu, karnitinu, 1,25-dihydroxyvitaminu D, adrenalinu a nadledvinkových hormonů, významně aktivuje imunitní systém.
- *Vitamin A* - rovněž zlepšuje imunitní profil u kuřat infikovaných *Eimeria acervulina*¹⁸.
- *Natrium-hydrokarbonát* - v kombinaci s ionoforovými antikocidiky (salinomycin) má velmi příznivý vliv na produkci brojlerů¹⁹.

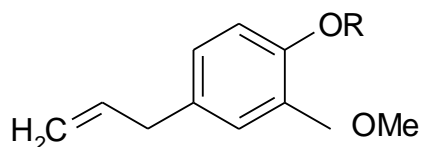
3.4 SUBSTANCE A DROGY POUŽÍVANÉ PRO PŘÍPRAVU EXTRAKTŮ

- *Caryophylli flos*

Mateřská rostlina - *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae)

Makroskopický popis drogy - droga je silně aromatického zápachu, ostré kořenité chuti. Je tvořena usušenými květními pupeny s květní číškou, které jsou sbírány před rozkvetem. Poupata mají červenohnědou až tmavě hnědou barvu a jsou 12 až 17 mm dlouhá, číšky 3 až 4 mm silné, poněkud smáčklé, čtyřhranné skoro až válcovité, ke spodu zúžené, zevně hustě jemně vrásčité. Nahoře vybíhají ve čtyři neopadavé, trojhranné, odstávající kališní cípy. Koruna je tvořena čtyřmi kulatými, za sucha žlutohnědými plátky, skloněnými v kulatou čepičku²⁰.

Obsahové látky - můžeme zde najít až 20 % silice, pro kterou je charakteristická přítomnost eugenolu (60 – 90 %), eugenol-acetátu (2 – 27 %) a seskviterpenů α - a β -karyofylenu (5 – 10 %). Silice dále obsahuje i methyl-salicylát, methyleugenol, benzaldehyd, methylamylketon (způsobuje charakteristickou vůni silice) a α -ylangen. Mezi další obsahové látky je řazen kemferol, lipidy, kys. oleanolová, rhamnetin, sitosterol, stigmasterol, vitaminy²¹.



eugenol R = H
eugenol acetát R = CO-CH₃

Farmakologický účinek - u hřebíčku byly zaznamenány mírné antiseptické, analgetické a lokálně anestetické vlastnosti, které jsou přisuzovány především eugenolu²¹. Eugenol rovněž vykazuje *in vitro* v různých koncentracích širokospektrou antibakteriální a antifungální aktivitu²². U silice je uváděno, že má antihistaminový a spasmolytický účinek²¹. Sama droga se ordinuje jako aromatikum a stomachikum.

▪ *Ocimi sancti herba*

Mateřská rostlina - *Ocimum sanctum* (Lamiaceae)

Makroskopický popis drogy - drogu tvoří sušené natě. Listy jsou stopkaté, zelené až hnědozelené barvy, 2,5 – 7,5 cm dlouhé, 1 – 3 cm široké, vejčitého tvaru s ostrou špičkou. Okraj listu je na bázi celistvý, dále pak vroubkovaný nebo pilovitý až zoubkovaný. Klasy nesou šestikvěté nepravé přesleny, tvořené krátce stopkatými, souměrnými a zřetelně dvoupyskatými květy. Koruna má červenou nebo žlutobílou barvu, horní pysk kratší klínovitý, dolní čtyřzubý; kalich je chlupatý a skládá se z horního přilbicovitého a dolního čtyřzubého pysku²³.

Obsahové látky - hlavními složkami jsou třísloviny (4,6 %) a silice (až 2 %). Množství a složení silice kolísá dle původu rostliny – eugenol (až 62 %), methyleugenol (až 86 %) a α - a β -karyophyllen (až 42 %). Přítomný je také methylchavicol, linalool a 1,8-cineol²⁴.

Farmakologický účinek - extrakt z listů (získaný 95% lihem) zastavuje růst *Staphylococcus aureus*, *S. citreus* a *Mycobacterium tuberculosis in vitro*²². Ve studii provedené *in vitro* na králíciích střevech byl u vodného extraktu prokázán inhibiční vliv na svalové spasmy vyvolané karcholem, histaminem a acetylcholinem. Po intragastrickém podání silice krysám (100 mg/kg tělesné váhy) byla zaznamenána zvýšené hladina IgE protilátek²³. Droga se používá jako karminativum, spasmolytikum a stomachikum.

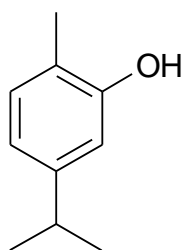
▪ *Origani herba*

Mateřská rostlina - *Origanum vulgare* (Lamiaceae)

Makroskopický popis drogy - je to usušená kvetoucí nať. Droga má aromatický zápach a kořenitě nahořklou chuť. Listnatý stonek je okrouhle čtyřhranný, často fialově naběhlý. Listy krátce řapíkaté, vejčité, celokrajné nebo mělce vroubkované, žlaznatě tečkované, tupé. Vidlanovitou latu skládají jedno až trojkvěté lichopřesleny. Květy jsou krátce stopkaté, kalich

trubkovitě zvonkovitý. Koruna má růžově červenou barvu, zřídka špinavě bílou, je 4 až 7 mm dlouhá, horní pysk krátký, dolní delší, sehnutý²⁰.

Obsahové látky - v droze nalezneme především silici (0,15 – 1,0 %), ve které hlavní složku tvoří karvakrol (až 16 %), potom α -terpinen, p-cymen, thymol, myrcen a α -pinen. Zastoupení jednotlivých složek silice je proměnlivé v závislosti na původu drogy. Např. v rostlinách původem z Izraele lze najít až 60 – 80 % tymolu, v Řeckých rostlinách byl zaznamenán zvýšený obsah fenolů a terpenických alkoholů (linalool)²⁵. Z dalších obsahových látek jsou zde zastoupeny také flavony (luteolin, apigenin, peonidin), katechin (flavan) a flavonglykosidy²⁶. Najdeme zde také arylalkanové kyseliny a jejich deriváty jako např. kys. skořicovou, kávovou, vanilovou²⁷. Zastoupeny jsou i minerální látky (645 ppm hliníku²⁸).



karvakrol

Farmakologický účinek - byla zaznamenána antimikrobiální aktivita²⁹. Při inokulaci vlhkou směsí (kašovitá konzistence) dobromysli s *Aspergillus parasiticus* nebyla po třiceti dnech pozorována žádná tvorba mycelia, u dvou kmenů *A. flavus* bylo myceliem pokryto jen 25 % a 37 % povrchu. Tvorba aflatoxinů a spór nebyla zaznamenána ani v jednom případě³⁰. Droga se používá především jako antiseptikum, choleretikum, karminativum, stomachikum a spasmolytikum. Více známá je ovšem jako koření.

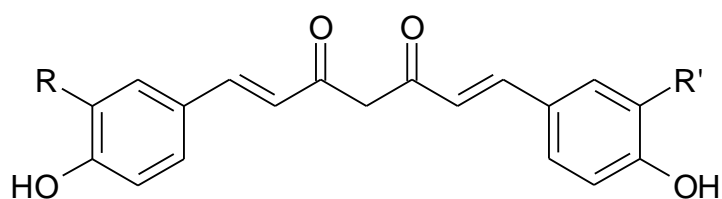
- ***Curcumae longae radix***

Mateřská rostlina - *Curcuma longa* (Zingiberaceae)

Makroskopický popis drogy - je tvořena těžkými a tvrdými kusy usušených oddenků. Vykopávají se především primární (hlavní) oddenky, používají se však rovněž sekundární (vedlejší) oddenky, které se po spaření horkou vodou suší. Primární oddenky jsou hlízovité, vejčité, sekundární válcovité, dlouhé a tlusté asi jako prst. Mají rohovitý až voskovitý vzhled, který droga získává spařením, a tedy zmazováním škrobu. Současně žluté barvivo vystupuje

z exkrecčních buněk do okolního pletiva. Oddenky mají žlutohnědou barvu, na řezu rovnoměrně pomerančovou a žlutě tečkovanou. Droga je slabě aromatického zápachu, kořeněné pálivé chuti a silně barví sliny³¹.

Obsahové látky - v droze najdeme slabě žlutou až oranžovožlutou silici. Obsah silice se pohybuje od 3 do 5,5 %. Je složena z monoterpenů a seskviterpenů, které zahrnují především α - a β -turmeron, *ar*-turmeron (zápach silice je způsoben právě turmerony), zingiberen (asi 25 %), kurkumen. Druhou skupinu obsahových látek tvoří barviva, tedy kurkuminoidy (5 %), které jsou z 50-60 % tvořeny směsí kurkuminu, monodesmethoxykurkuminu a bisdesmethoxykurkuminu²¹. Vedlejšími látkami jsou cukry a velké množství škrobu³².



kurkumin	R = OCH ₃ , R' = OCH ₃
desmethoxykurkumin	R = OCH ₃ , R' = H
bisdesmethoxykurkumin	R = H, R' = H

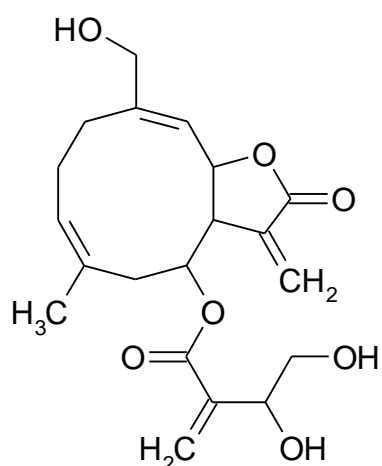
Farmakologický účinek - kurkumin a jeho deriváty představují účinné protizánětlivé složky drogy. Kurkumin brzdí zánětem vyvolanou tvorbu prostaglandinů. Rovněž u něj byla zaznamenána schopnost zhaset kyslíkové radikály vznikající v průběhu zánětlivého procesu. Účinek drogy u experimentálně vyvolaného zánětu u krys byl srovnatelný s účinkem indometacinu nebo hydrokortison-acetátu^{21,33}. U lihového extraktu (50 mg/ml) a u silice (100 μ g/ml) byly zaznamenány baktericidní účinky proti *Staphylococcus sp.*, u kurkuminu (100 μ g/ml) pouze bakteriostatické³⁴. Droga se uplatňuje jako stomachikum, choleretikum a cholekinetikum (barviva). Ve formě prášku slouží jako koření.

▪ *Knicin*

Látka izolovaná z natě *Cnicus benedictus* (Asteraceae).

Chemický název - 10-hydroxymethyl-6-methyl-3-methylene-2-oxo-2,3,3a,4,5,8,9,11a-oktahydro-cyklodeka[b]furan-4-yl ester kyseliny 2-(1,2-dihydroxy-ethyl)-akrylové

Vzorec -



Farmakologický účinek - α -metylen- γ -laktonová část molekuly je považována za nezbytnou pro antibakteriální a antitumorový účinek knicinu³⁵. Protinádorová aktivita byla u lymfoidní leukémie doložena testováním na myších. Rovněž byl *in vitro* prokázán jeho protizánětlivý účinek, který je prakticky rovnocenný účinku indometacinu²¹. Knicin je spolu s dalšími hořčinami zodpovědný za tradiční použití natě *Cnicus benedictus* jako drogy zvyšující sekreci trávicích šťáv, slin a zlepšující trávení³⁶.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ

Extrakty byly připravovány ze suchých rostlinných částí. Před vlastní extrakcí bylo nutné je upravit na potřebnou velikost, tedy aby částice drogy měly rozměr asi do 2 mm. Úprava byla provedena rozemletím na mixéru.

Vlastní extrakce byla prováděna kontinuální metodou, perkolací. Jako rozpouštědlo byl použit 80% ethanol. Zařízením použitým ke kontinuální extrakci byl perkolátor (válcovitá nádoba, jejíž výška odpovídá zhruba trojnásobku průměru s výpustí u dna)³⁷.

Rozdrobněnou drogu (asi 200 g) bylo nejprve nutné provlhčit dostatečným množstvím rozpouštědla (asi 50-100 ml 80% lihu), dokonale promíchat a ponechat v uzavřené nádobě (kádinka uzavřená alobalem) asi jednu hodinu v klidu. Na dno nádoby perkolátoru byla před vlastním plněním vložena inertní hmota, konkrétně smotek vaty. Plnění probíhalo tak, že perkolátor se naplnil nejprve asi do ¼ 80% lihem a postupně se do něj po malých částech a bez míchání vsypávala provlhčená droga až do doby, kdy dosáhla hladiny. Poté se přidalo další rozpouštědlo a pokračovalo se stejným způsobem až do naplnění nádoby. Po vložení celého množství drogy zůstalo v nádobě asi 5 cm volného místa, které mělo fungovat jako zásobník rozpouštědla. Po naplnění se povrch drogy zakryl kotoučkem filtračního papíru, zatížil skleněnou zátkou a zalil rozpouštědlem. Celé zařízení se nechalo alespoň přes noc v klidu.

Těchto 200 g drogy se při pokojové teplotě perkolovalo asi 1800 ml 80% lihu tak, aby operace byla v průběhu dvou dnů hotova. Rychlost jímání extraktu se pohybovala kolem 120 ml za hodinu za současného dodávání čistého rozpouštědla ze zásobníku k hlavě perkolátoru.

Vzniklý extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce. Cílem bylo získání odparku v žádané konzistenci. Zahušťování probíhalo nejprve ve dvoulitrové destilační baňce, potom byl extrakt převeden do 250 ml baňky a odpařen relativně do sucha.

V případě knicinu jsem již obdržela izolovanou substanci (bílý prášek) z natě *Cnicus benedictus*, vlastní extrakci jsem tedy neprováděla.

Tab. 1 Konkrétní údaje u jednotlivých extraktů

Droga	<i>Caryophylli flos</i>	<i>Ocimi sancti herba</i>	<i>Origani herba</i>	<i>Curcumae longae radix</i>
Množství použité drogy pro perkolaci [g]	178,3	203,0	177,5	201,7
Objem použitého rozpouštědla [ml]	1607,7	1827,0	1265,0	1815,7
Množství připraveného extraktu [g], sušina [%]	51,7 (50,64)	29,4 (81,24)	28,7 (74,61)	35,8 (84,93)

4.2 ZTRÁTA SUŠENÍM

Ztrátou sušením se rozumí úbytek hmotnosti zkoušené látky vznikající únikem těkavých složek za předepsaných podmínek³⁸. Sušina byla stanovena dle podmínek uvedených ve čtvrtém vydání Československého lékopisu. U každého z připravených a zahuštěných extraktů byla určena na základě dvou měření, z nichž byl vypočítán průměr.

V případě knicinu jsem obdržela již izolovanou substanci, stanovení ztráty sušením jsem tedy neprováděla.

Tab. 2 Konkrétní údaje u jednotlivých extraktů

	<i>Caryophylli flos</i>	<i>Ocimi sancti herba</i>	<i>Origani herba</i>	<i>Curcumae longae radix</i>
Sušina [%] (navážka č.1)	50,58	81,41	74,33	84,81
Sušina [%] (navážka č.2)	50,70	81,07	74,89	85,05
Sušina [%] (průměr)	50,64	81,24	74,61	84,93

4.3 PŘÍPRAVA ROZTĚRŮ

Roztěry byly připravovány tak, aby v konečném množství 200 g byly nasorbovány 2 g suchého extraktu.

▪ Příprava roztěrů ze suchých extraktů

Odvážené množství práškové látky se v melaminové třecí misce smíchalo nejprve jen s částí celozrnné hrubé mouky (asi 50 g). Postupně se za stálého míchání přidával zbytek mouky až do konečného množství roztěru (200 g) a provedla se homogenizace.

Tento postup přípravy se týkal pouze knicinu.

▪ Příprava roztěrů z tekutých extraktů

Potřebné množství zhomogenizovaného hustého extraktu bylo odváženo do porcelánové odpařovací misky a rozpuštěno asi v 5 – 10 ml 95% ethanolu. Podle potřeby se přidalo asi 20 g hrubé celozrnné mouky a dokonale smísilo. Dále se roztěr mírně sušil na vodní lázni až do uniknutí lihu. Nakonec se přidalo tolik hrubé mouky, aby konečné množství roztěru bylo 200 g a byl dokonale homogenní. Tento roztěr byl dispergován do krmiva pro myši a krysy tak, aby výsledná koncentrace byla 100 ppm.

Tab. 3 Konkrétní údaje u jednotlivých extraktů a knicinu

	<i>Caryophylli flos</i>	<i>Ocimi sancti herba</i>	<i>Origani herba</i>	<i>Curcumae longae radix</i>	<i>Knicin</i>
Navážka extraktu pro přípravu roztěru [g]	3,95	2,47	2,68	2,35	2,00

4.4 METODIKA A VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ

Vlastní experiment byl prováděn pod vedením MVDr. Davida Modrého Ph.D. na katedře Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Každý z extraktů byl testovaný v jednom experimentu. Testovaná látka byla podávána pokusné skupině zvířat v krmivu, s aplikací se začalo sedm dní před inokulem. Kontrolní skupina zvířat dostávala stejné krmivo, ale bez přídavku testované látky. Poté byla zvířata obou skupin p. o. infikována suspenzí oocyst *Eimeria sp.* (izolát z Malawi) v dávce 1000 oocyst na jedno zvíře. Jednou denně se od zvířat individuálně odebíral trus a stanovoval počet vylučovaných oocyst přepočtený na jeden gram trusu. Pokusná skupina se skládala z 5 - 10 myší CD1 (Anlab) a z 5 - 10 krys *Mastomys coucha*. Počty zvířat v kontrolní skupině byly totožné. U knicinu proběhlo testování pouze na myších.

Kokcidistatický efekt se zjišťoval jako rozdíl v kvantitě vylučovaných oocyst mezi testovanou a kontrolní skupinou.

Délka jednoho experimentu se pohybovala kolem asi 7 – 8 dnů, což odpovídá jednomu kompletnímu vývojovému cyklu parazita.

Konkrétní údaje u jednotlivých extraktů a knicinu:

- *Caryophylli flos*

Tab. 4 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

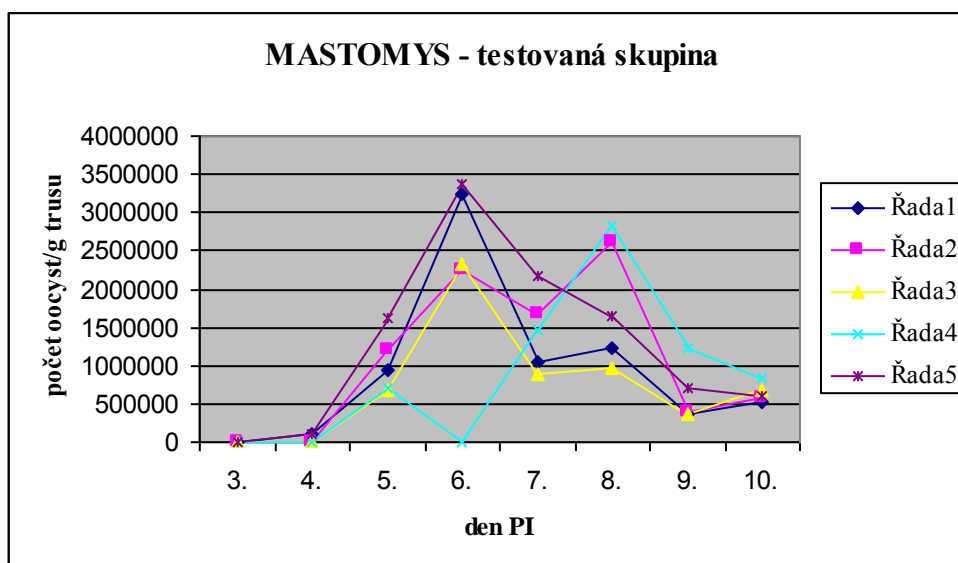
MASTOMYS - testovaná skupina								
myš/den	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1	0	96 519	938 333	3 250667	1 054487	1 237600	365 400	522 400
2	0	136	1 192500	2 260000	1 683590	2 614333	379 556	576 000
3	0	667	678 333	2 316000	896 000	966 000	374 889	680 000
4	0	3 167	716 667	0	1 472333	2 823333	1 235500	826 000
5	0	102 444	1 628333	3 366000	2 158000	1 638000	701 150	599 200

Modrá čísla = nešly odebrat vzorky trusu

Tab. 5 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

MASTOMYS - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	39353537
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	7870707

Graf 1 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



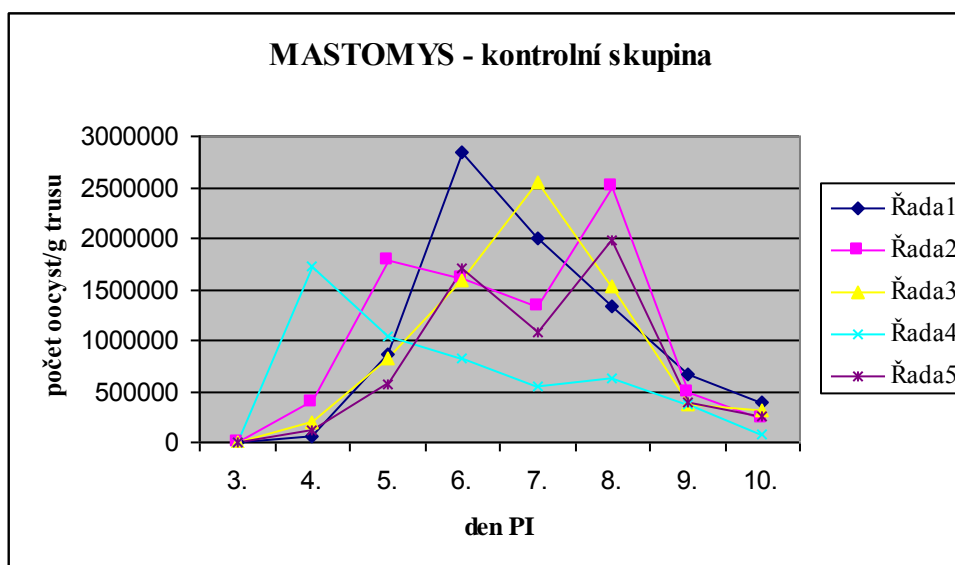
Tab. 6 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS – kontrolní skupina								
myš/den	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1	0	66 666	853 333	2 836667	2 001856	1 328000	666 000	393 000
2	0	400 133	1 775000	1 608833	1 330000	2 506000	491 167	239 000
3	0	203 333	828 000	1 597556	2 542105	1 532000	365 167	304 000
4	0	1 726666	1 048000	832 222	549 091	630 000	367 500	74 667
5	0	124 733	572 000	1 701000	1 075362	1 978667	400 750	258 500

Tab. 7 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

MASTOMYS – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	35206974
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	7041395

Graf 2 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



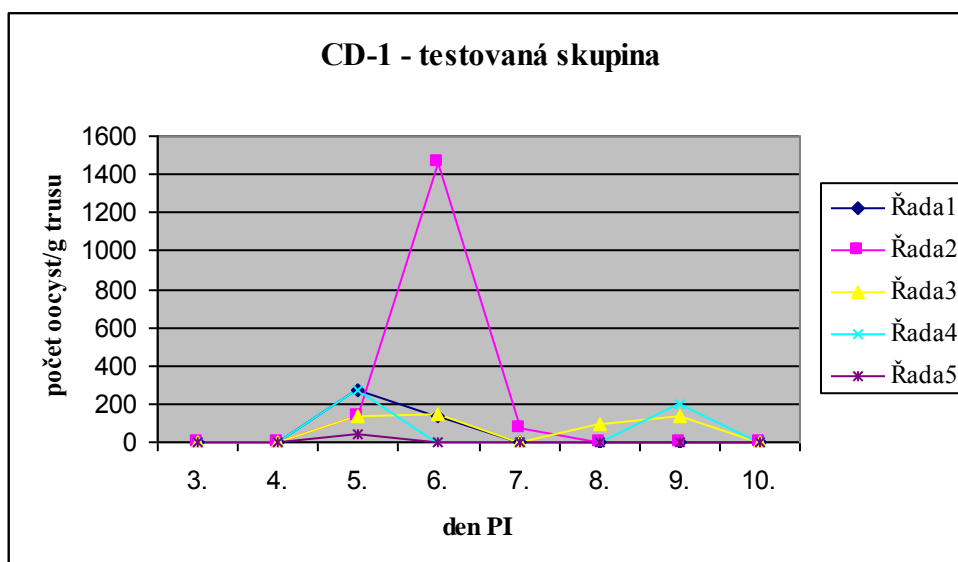
Tab. 8 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD1 - testovaná skupina								
myš/den	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1	0	0	267	133	0	0	0	0
2	0	0	133	1 467	76	0	0	0
3	0	0	133	148	0	89	133	0
4	0	0	267	0	0	0	200	0
5	0	0	44	0	0	0	0	0

Tab. 9 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

CD1 - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	3090
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	618

Graf 3 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



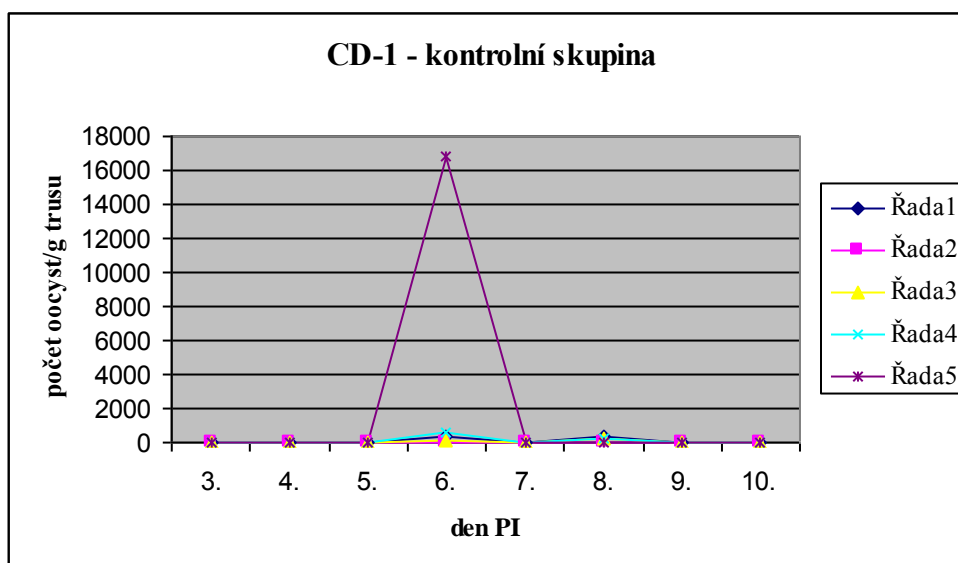
Tab. 10 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 – kontrolní skupina								
myš/den	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1	0	0	0	400	0	333	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	133	0	267	0	0
4	0	0	0	533	0	267	0	0
5	0	0	0	16 800	0	0	0	0

Tab. 11 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

CD1 – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	18733
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	3747

Graf 4 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



- *Ocimi sancti herba*

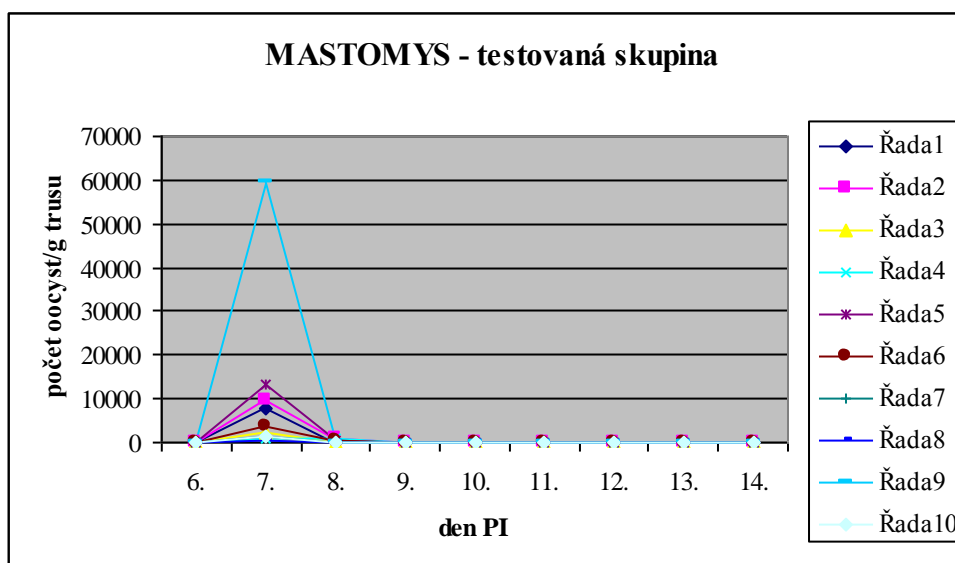
Tab. 12 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS - testovaná skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	7 593	0	0	0	0	0	0
2	0	9 833	1 042	0	0	0	22	0
3	0	2 167	0	40	0	0	124	0
4	0	750	726	0	0	0	0	0
5	0	13 250	424	0	0	0	0	0
6	0	3 667	310	0	0	0	22	0
7	0	1 333	167	0	13	0	0	0
8	0	458	194	0	0	0	0	0
9	0	59 444	167	0	0	0	0	0
10	0	1 333	100	0	0	0	0	0

Tab. 13 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

MASTOMYS - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	103179
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	10318

Graf 5 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



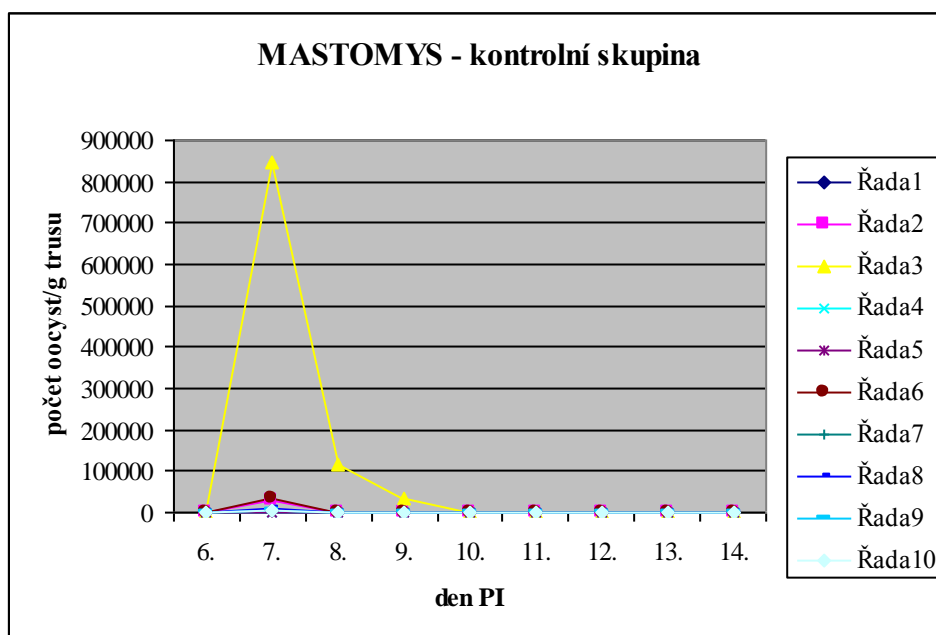
Tab. 14 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS – kontrolní skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	3 000	56	250	0	0	0	0
2	0	26 875	611	42	0	22	0	0
3	0	846 000	117 667	34 167	474	124	67	0
4	0	1 333	0	667	0	0	0	0
5	0	0	21	0	0	0	0	0
6	0	33 333	250	0	0	22	0	0
7	0	3 250	1 583	22	22	0	0	0
8	0	10 185	292	0	0	0	0	0
9	0	2 500	125	0	33	0	0	0
10	0	5 000	500	0	0	0	0	0

Tab. 15 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

MASTOMYS – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1088493
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	108849

Graf 6 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



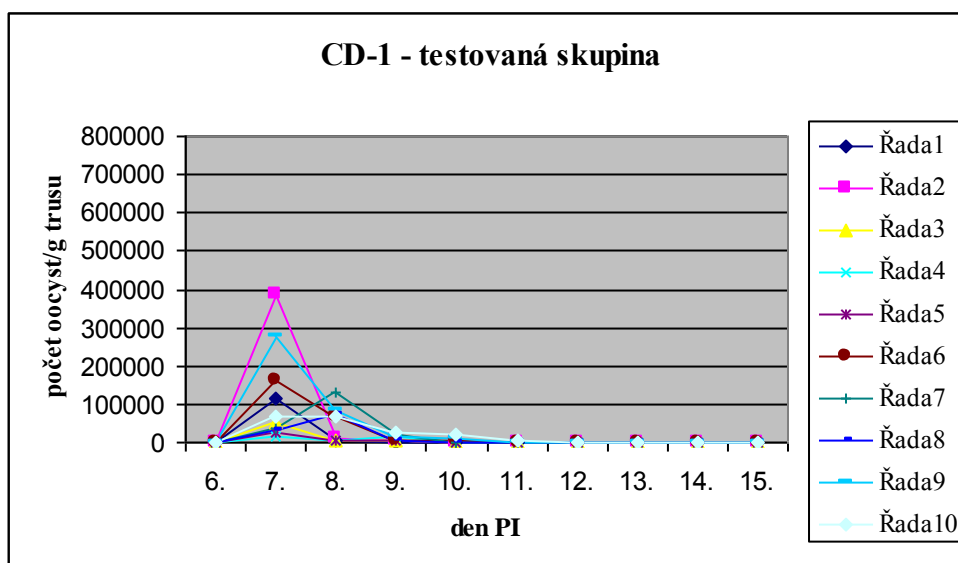
Tab. 16 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 - testovaná skupina										
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1	0	114000	3000	667	0	0	200	0	0	0
2	0	386000	9167	4333	167	100	22	0	0	0
3	0	50750	3500	2917	111	148	67	0	0	0
4	0	14333	4875	16667	735	107	33	0	0	0
5	0	24583	3167	6500	833	67	22	0	0	0
6	0	162000	70000	5867	3933	489	22	0	0	0
7	0	38889	129750	18533	2422	422	33	0	0	0
8	0	33778	72667	4800	1511	289	0	0	0	0
9	0	276722	83667	17000	9511	1733	200	0	0	0
10	0	67000	70250	27100	20800	2689	280	0	0	0

Tab. 17 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

CD1 - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1769428
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	176943

Graf 7 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



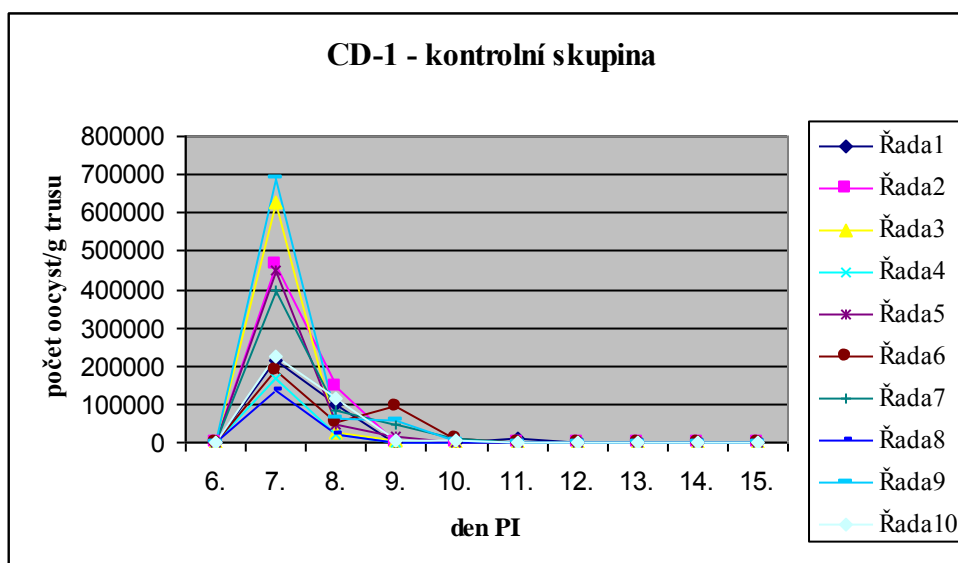
Tab. 18 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 - kontrolní skupina										
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1	0	216000	96889	2407	2167	9074	600	0	0	0
2	0	467667	148400	1444	1333	1167	133	0	0	0
3	0	630000	25259	4167	0	185	100	0	0	0
4	0	168000	22067	2250	0	0	17	0	0	0
5	0	452000	49333	15778	2000	1296	400	0	0	0
6	0	187500	52417	93000	11833	0	467	33	133	0
7	0	398000	86000	45333	11333	833	167	33	0	0
8	0	138000	20926	1375	2000	167	0	0	0	0
9	0	692000	62000	55000	5833	1500	111	0	0	0
10	0	223000	116000	7250	6500	333	100	0	0	0

Tab. 19 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

CD1 – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	4539177
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	453918

Graf 8 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



▪ *Origanum herba*

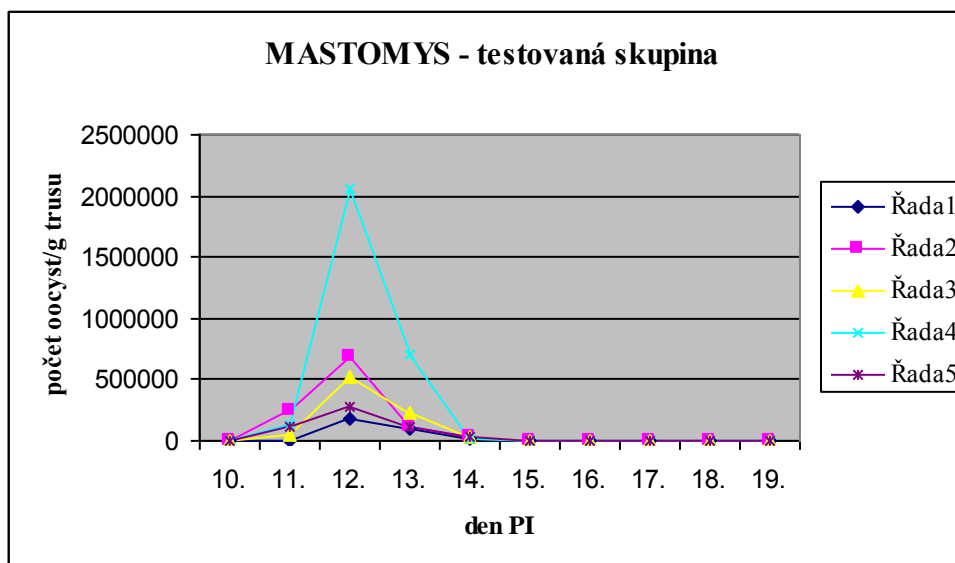
Tab. 20 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS - testovaná skupina										
myš/den	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1	0	4 333	181 666	101 410	15 591	980	0	42	387	0
2	0	250 000	682 500	121 969	34 848	923	222	0	0	0
3	0	45 926	523 389	227 500	30 952	1 033	391	22	0	0
4	0	132 000	2 060 000	700 000	9 583	294	0	0	0	0
5	0	113 454	282 285	114 074	38 596	4 028	0	0	0	0

Tab. 21 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

MASTOMYS - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	5678011
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	1135602

Graf 9 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



Tab. 22 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

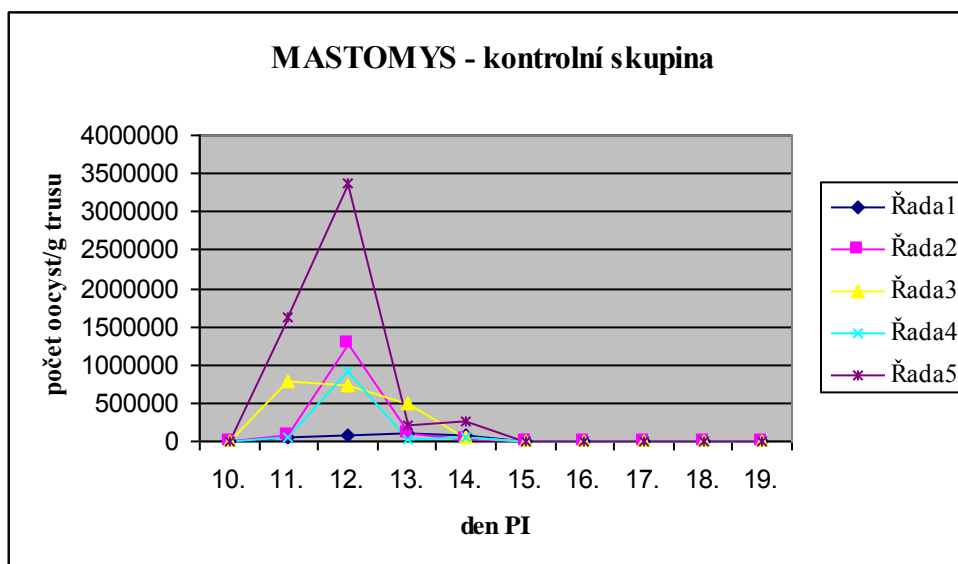
MASTOMYS – kontrolní skupina										
myš/den	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1	0	45 222	78 718	97 310	66 333	10 888	10 392	1 136	442	0
2	0	91 200	1 286 250	98 809	21 875	1 818	222	73	0	0
3	0	775 500	737 442	491 320	44 290	1 852	3 889	0	0	0

MASTOMYS – kontrolní skupina										
myš/den	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
4	0	45 230	918909	30 625	51 282	1 378	202	77	0	0
5	0	1 610000	3 380000	212 121	252885	6 373	294	2 250	0	0

Tab. 23 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

MASTOMYS – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	10376165
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	2075233

Graf 10 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



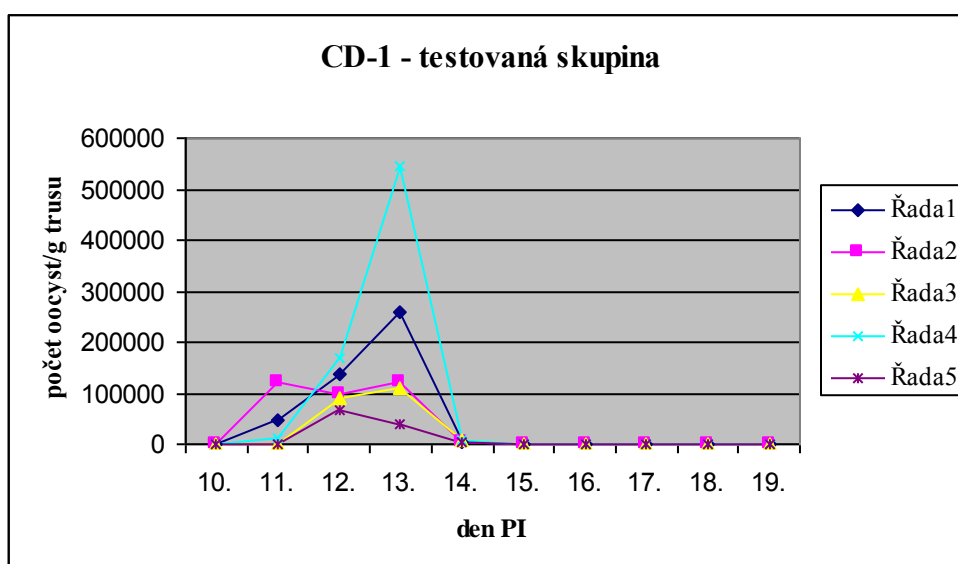
Tab. 24 Počet trusu oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 - testovaná skupina										
myš/den	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1	0	48 978	139 125	260 000	2 833	1 711	154	21	0	0
2	0	122 666	96 444	120 000	2 576	600	38	0	0	0
3	0	933	90 967	110 500	8 509	407	67	0	0	0
4	0	11 200	169 091	544 000	8 833	1 118	467	133	0	0
5	0	533	65 846	40 666	4 222	1 222	0	0	0	0

Tab. 25 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

CD1 - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1853860
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	370772

Graf 11 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



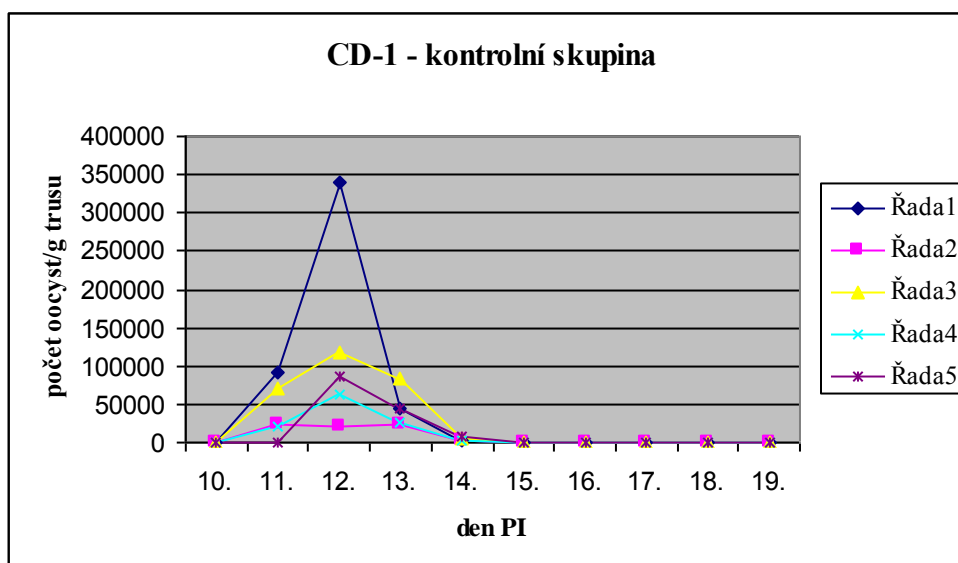
Tab. 26 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 – kontrolní skupina										
myš/den	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1	0	90 666	339 818	45 250	2 667	583	36	0	0	0
2	0	24 500	20 969	24 800	3 425	83	0	0	0	0
3	0	70 000	116 625	83 625	5 926	666	108	0	0	0
4	0	21 778	63 222	26 000	1 742	306	118	21	0	0
5	0	952	85 600	44 333	8 250	467	0	0	0	0

Tab. 27 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

CD1 – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1082536
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	216507

Graf 12 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



▪ *Curcumea longae radix*

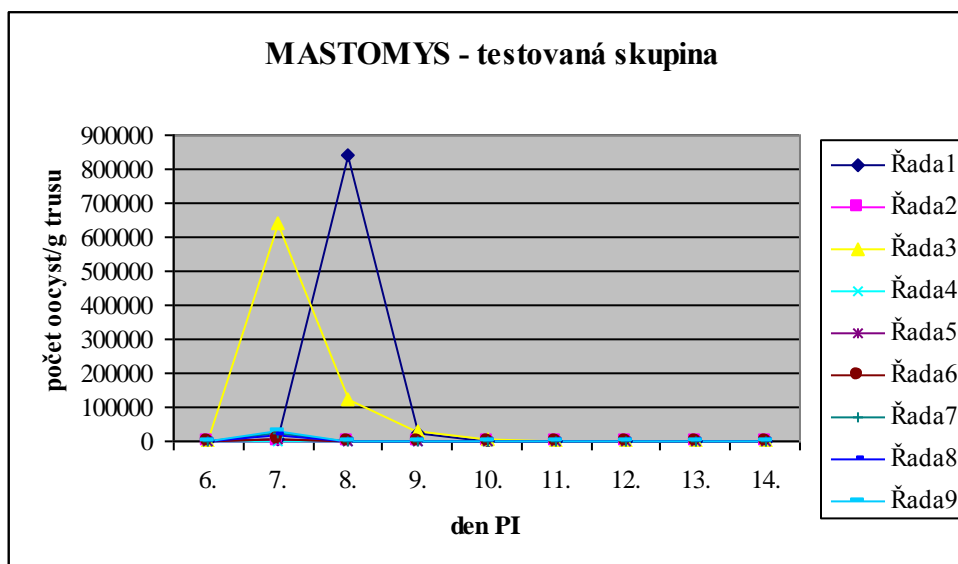
Tab. 28 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS - testovaná skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	6 667	840 000	23 286	1 000	22	22	0
2	0	2 033	38	40	0	0	0	0
3	0	640 000	126 333	30 217	6 600	1 483	333	22
4	0	2 333	15	111	0	0	0	0
5	0	7500	53	167	0	0	0	0
6	0	2 963	400	370	0	0	0	0
7	0	25 167	600	33	0	0	0	0
8	0	18 500	933	133	8	0	0	0
9	0	27 083	144	67	0	0	0	0

Tab. 29 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

MASTOMYS - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1764676
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	196075

Graf 13 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



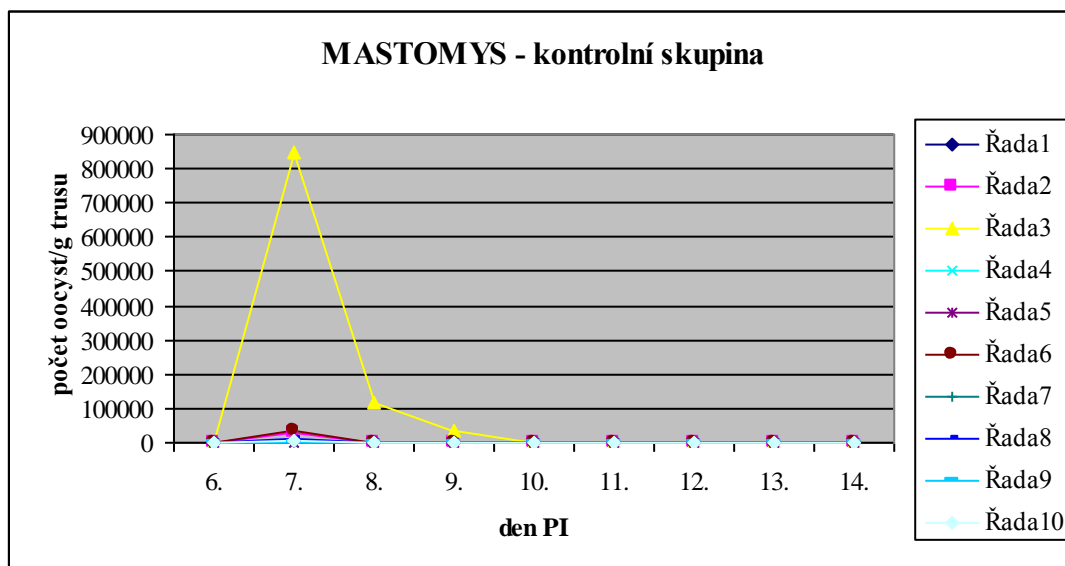
Tab. 30 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

MASTOMYS – kontrolní skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	3 000	56	250	0	0	0	0
2	0	26 875	611	42	0	22	0	0
3	0	846 000	117 667	34 167	474	124	67	0
4	0	1 333	0	667	0	0	0	0
5	0	0	21	0	0	0	0	0
6	0	33 333	250	0	0	22	0	0
7	0	3 250	1 583	22	22	0	0	0
8	0	10 185	292	0	0	0	0	0
9	0	2 500	125	0	33	0	0	0
10	0	5 000	500	0	0	0	0	0

Tab. 31 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

MASTOMYS – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1088493
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	108849

Graf 14 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



Tab. 32 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

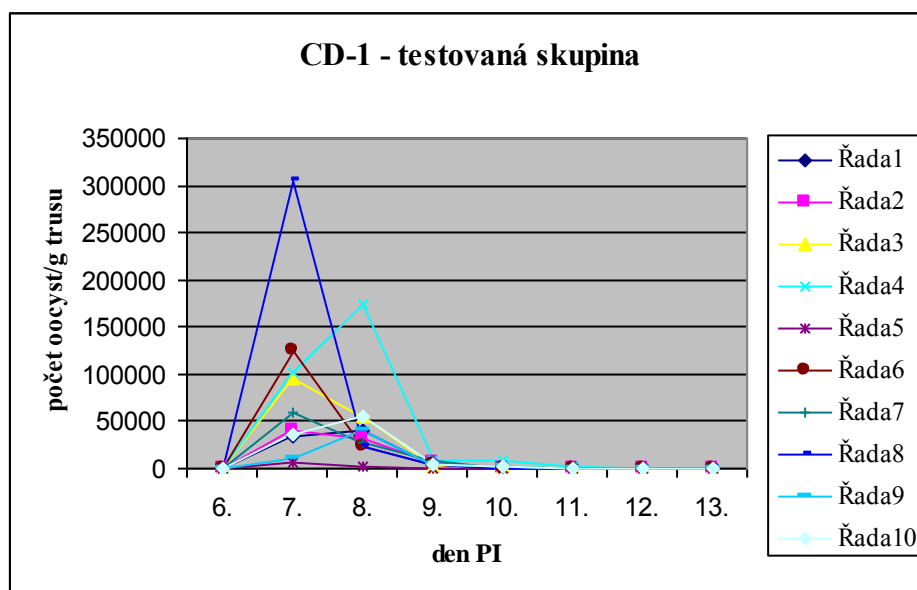
CD-1 - testovaná skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	33889	39333	4867	1333	200	0	0

CD-1 - testovaná skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
2	0	40750	31056	6289	370	577	17	0
3	0	95000	54500	1844	1600	100	0	0
4	0	102500	174000	8100	7667	2200	89	0
5	0	5583	2000	800	0	0	0	0
6	0	125556	23500	3717	433	400	0	0
7	0	58500	27500	8933	167	67	0	0
8	0	304500	23389	3911	1033	0	0	0
9	0	11500	40000	4867	1067	296	0	0
10	0	36389	54167	4417	1333	0	0	0

Tab. 33 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

CD1 - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1350306
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	135031

Graf 15 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



Tab. 34 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

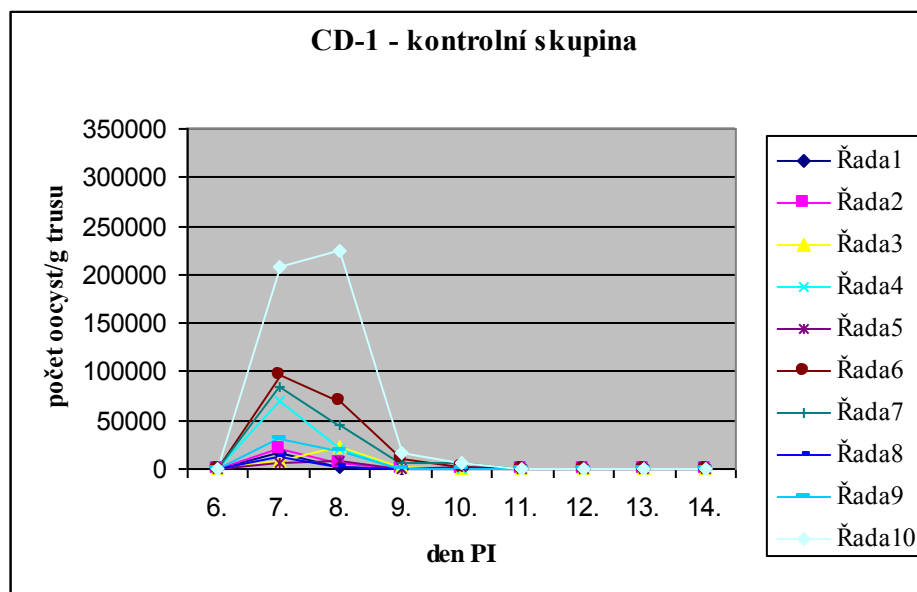
CD-1 - kontrolní skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
1	0	15778	2333	733	0	0	0	0
2	0	20167	7167	450	300	44	0	0
3	0	7750	22667	1717	200	67	11	0

CD-1 - kontrolní skupina								
myš/den	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
4	0	69250	21417	693	89	50	33	8
5	0	6100	7333	767	1481	67	0	0
6	0	96000	70333	10300	3037	67	33	0
7	0	85000	45000	6556	5852	200	44	22
8	0	12444	2500	556	0	0	0	0
9	0	30083	19333	650	267	0	0	0
10	0	207000	225000	16367	5667	689	44	0

Tab. 35 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

CD1 – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	1029716
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	102972

Graf 16 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



- *Knicin*

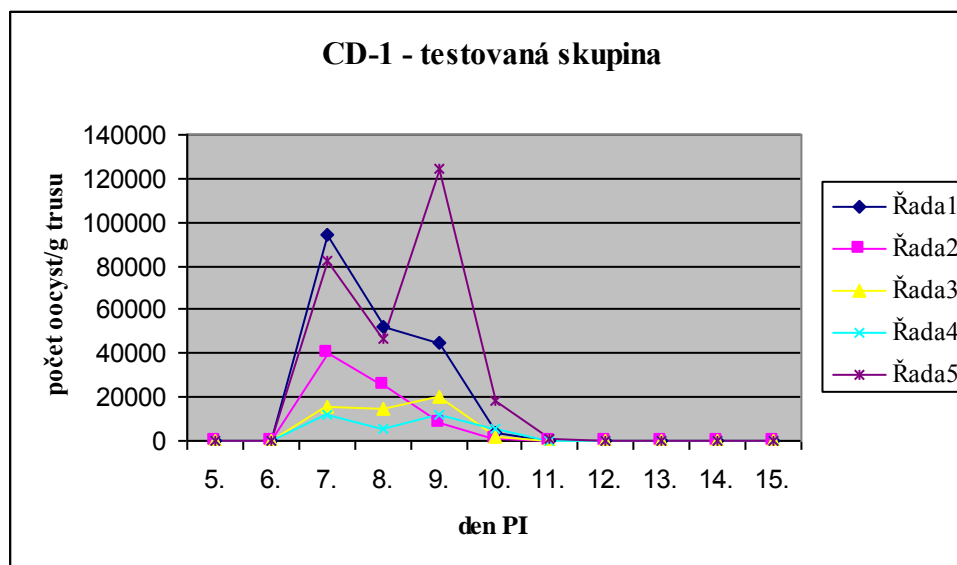
Tab. 36 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu

CD-1 - testovaná skupina											
myš/den	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1	0	78	94 556	52 200	45 100	4 000	157	0	0	0	0
2	0	0	40 667	26 000	8 483	741	0	86	0	0	0
3	0	0	15 175	15 077	20 000	1 839	367	32	0	0	0
4	0	0	11 800	5 250	11 800	5 267	298	0	37	0	0
5	0	0	82 152	46 353	124 500	18 313	1 152	103	44	0	0

Tab. 37 Počet vyloučených oocyst v testované skupině

CD1 - testovaná skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	631546
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	126309

Graf 17 Počet oocyst vylučovaných v testované skupině přepočtený na jeden gram trusu



Tab. 38 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu

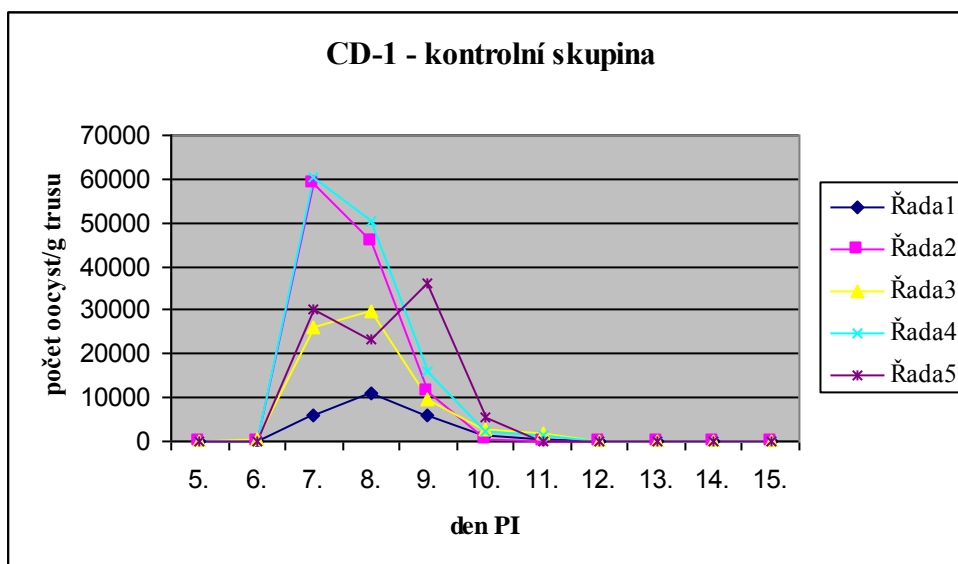
CD-1 – kontrolní skupina											
myš/den	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1	0	167	6 000	11 153	6 044	1 296	356	0	46	0	0
2	0	118	58 857	45 917	11 438	649	44	200	0	0	0
3	0	314	26 000	29 892	9 423	2 733	1 846	91	33	0	0

CD-1 – kontrolní skupina											
myš/den	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
4	0	0	60 593	50 375	16 000	2 240	1 152	44	0	0	0
5	0	0	30 095	23 556	36 250	5 500	56	0	0	0	0

Tab. 39 Počet vyloučených oocyst v kontrolní skupině

CD1 – kontrolní skupina	
Počet vyloučených oocyst celkem	438399
Počet vyloučených oocyst přepočtený na jedno zvíře	87680

Graf 18 Počet oocyst vylučovaných v kontrolní skupině přepočtený na jeden gram trusu



Výsledné vyhodnocení

Tab. 40 Počet vyloučených oocyst v testovaných a kontrolních skupinách

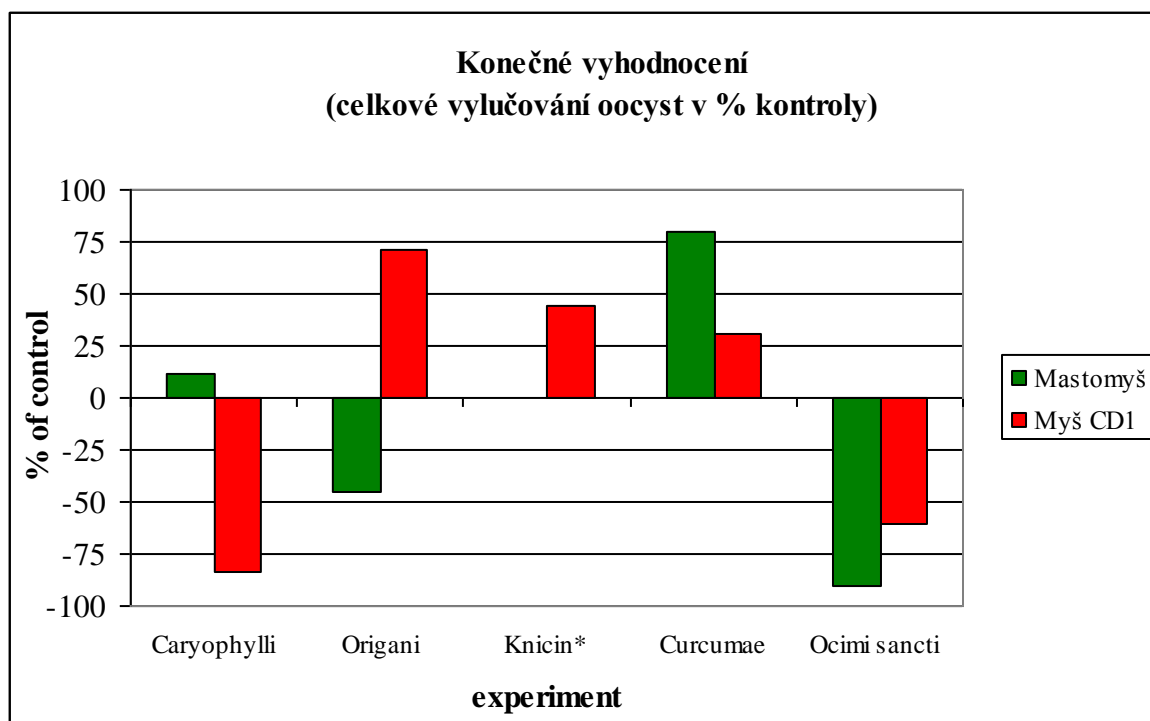
		<i>Caryophyll i flos</i>	<i>Origanum herba</i>	<i>Knicin</i>	<i>Curcuma e longae radix</i>	<i>Ocimum sanctum herba</i>
Mastomyš	Testovaná skupina	7870707	1135602	nebylo testováno	196075	10318
	Kontrolní skupina	7041395	2075233	nebylo testováno	108849	108849
Myš CD1	Testovaná skupina	618	370772	126309	135031	176943
	Kontrolní skupina	3747	216507	87680	102972	45391

						8
--	--	--	--	--	--	---

Tab. 41 Vyjádření vylučování oocyst v testovaných skupinách vůči kontrolní skupině v procentech

	<i>Caryophylli flos</i>	<i>Origani herba</i>	<i>Knicin</i>	<i>Curcumae longae radix</i>	<i>Ocimi sancti herba</i>
Mastomyš [%]	11,77768	-45,2783	nebylo testováno	80,13447	-90,5209
Myš CD1 [%]	-83,505	71,25158	44,05735	31,13383	-61,0187

Graf 19 Srovnání vylučování oocyst v průběhu pokusu



5. DISKUSE

Každý výskyt kokcidiózy (respektive protozoóz) v chovu je spojen se značným ekonomickým dopadem na jeho prosperitu. U kurovitých se setkáváme zejména s kokcidiemi rodu *Eimeria*, konkrétně se jedná o *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, a *E. necatrix*. Postiženy však bývají také chovy krůt (tzv. černohlavost – histomoniáza).

Snížení rizika infekce představuje stále značný problém. Z používaných terapeutických antikokcidik přicházejí v úvahu především sulfadimidin, sulfaklozin, sulfadiazin, sulfadimethoxin, sulfachinoxalin a toltrazuril, které však musejí být střídány (rotací). Z profylaktických antikokcidik lze uvést amprolium, klopidol, diklazuril, robenidin a nikarbazin, na některé z nich však existuje resistance. Mezi úspěšná antikokcidika patří v podstatě antibiotika, dříve užívaná ke stimulaci růstu zvířat. Patří sem monesin, lasalocid, salinomycin, maduramicin, semduramicin a narasin. Tyto látky jsou však rozhodnutím Evropské unie od 1. 1. 2006 z veškerého použití vyčleněny. Doposud jediným zástupcem antikokcidik přírodního původu je halofuginon (alkaloid z *Dichroa febrifuga*).

Obtížnost prevence a terapie kokcidiózy je způsobena řadou velmi významných faktorů: mimořádnou reprodukční schopností původců nákazy, odolností vůči chemoterapeutikům (častá resistance, proto je nutná rotace), čistotou chovů (je velmi obtížné zbavit produkční plochy oocyst) a v neposlední řadě také finančními prostředky. Kokcidiózy v chovech nelze zlikvidovat, je možné je pouze udržet v přijatelné formě.

Po emisi ustanovení Evropské unie, které se týkají aplikace chemoterapeutik (ať už preventivních nebo pro vlastní terapii), jsou urychleně hledány nové cesty jak se s tímto faktem vyrovnat. Jednou z nich je soustředění pozornosti na prevenci a použití přírodních látek (zejména rostlinného původu), které jsou historicky prověřené a nepřinášejí významně negativní účinky ani pro zvíře ani pro konečného konzumenta.

V případě těchto doplňkových látek do krmiv je velmi výhodná skutečnost synergismu. Sumární extrakty totiž obsahují řadu účinných látek (těchto účinných substancí je více než deset), které svým komplexním mechanismem umožňují zasáhnout patologický proces do větší hloubky a šířky než aplikace jednoho léčiva s přesně definovaným a do jisté míry omezeným biologickým účinkem. Terapeutické efekty jednotlivých látek jsou značně rozdílné. Kromě antiinvazního účinku bývá zastoupen i účinek antimikrobiální, antiflogistický, imunostimulační a další. Celkový biologický efekt směsi není tedy založen na prostém součtu účinků jednotlivých složek, ale na jejich násobení. Tato skutečnost umožňuje podávat relativně nízké dávky a producent se tak nedostává do situace zvýšených finančních nákladů. Nezanedbatelným faktem je také to, že tyto sekundární metabolity jsou v přírodě snadno degradovatelné a jejich aplikace tedy není spojena se zatěžováním ekosystému.

V této studii byly vyzkoušeny čtyři sumární extrakty připravené z antimikrobiálně účinných drog - *Caryophylli flos*, *Curcumae longae radix*, *Ocimi sancti herba*, *Origani herba* a jedna izolovaná substance - *knicin* (z *Cardui benedicti herba*). Tyto studované extrakty a látka byly nanесeny na krmivo pro hlodavce (mastomys a myš CD1) tak, aby se jejich koncentrace pohybovala na hodnotě 100 ppm sušiny extraktu nebo čisté látky. Tento model (popsaný v experimentální části) se používá pro vyhodnocování účinnosti jak syntetických tak i přírodních látek na kokcidiózu³⁹.

Z grafu 19 vyplývá, že nejméně použitelný účinek se projevil u extraktu z *Curcumae radix* (dále jen CR). Produkce oocyst v testované skupině oproti kontrolní byla vyšší o ~ 81 % u mastomyši a o ~ 31 % u myši CD1. Samotný extrakt CR je tedy naprosto nepoužitelný z preventivního hlediska. Tento fakt je poměrně překvapující, protože právě u této drogy byly zjištěny zajímavé antimikrobní účinky proti řadě patogenů (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus cereus* aj.)⁴⁰. Nejedná se sice o protozoální organismy, nicméně přihlédneme-li k tomu, že obsahové látky CR (monoterpeny, seskviterpeny, kurkuminoidy) mají kromě antimikrobiálního účinku ještě i další efekty využitelné při léčbě kokcidióz (antioxidační, antiflogistický)^{32,41}, je tato skutečnost velice zvláštní. Předpokládám však, že by extrakt CR mohl být použit jako aditivní komponenta k jiným extraktům ve smyslu, jak jsem o něm hovořila výše.

Druhým velmi zajímavým účinkem byl nepovzbudivý výsledek v případě extraktu připraveného z *Origani herba* (dále jen OH). Pozitivní účinek byl doložen pouze u skupiny mastomyši (snížení vylučování oocyst v testované skupině oproti kontrolní o ~ 45 %), zatímco u myši CD1 došlo k výrazně vyšší produkci oocyst ve srovnání s kontrolní skupinou (o ~ 71 %). V tuto chvíli lze obtížně posuzovat rozdíl ve střevním metabolismu a odolnosti střevní mukózy mastomyši oproti myši CD1 a o to méně lze predikovat, jaký bude účinek u kura domácího. Silice z OH má především antimikrobiální²⁹ účinky. Hlavními obsahovými látkami jsou monoterpeny thymol a karvakrol, u kterých jsou s poměrně dobrými výsledky prováděny studie na jejich účinnost právě proti eimeriím⁴². Dále jsou zastoupeny i flavony, flavonglykosidy²⁶ a arylalkanové kyseliny²⁷. V praxi rovněž existuje řada premixů do krmiv, kde jsou využívány (zejména v oblasti Asie, Indie). Výrobci je uváděno, že účinky této silice přinášejí významné snížení průběhu kokcidiózy u drůbeže⁴³.

Knicin je germakranolid izolovaný z nati *Cnicus benedictus*. Jedná se o látku, u které byly popsány antiflogistické²¹, antifungální⁴⁴ a antimikrobiální účinky (proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginos*; *Streptococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi* aj.). Tato látka byla testována pouze na myších CD1 a bude podrobena ještě dalšímu studiu na

mastomyších. V testované skupině myši CD1 došlo ke nárůstu produkce oocyst oproti kontrolní skupině o ~ 45 %. Nezdá se tedy, že její účinky budou natolik přesvědčivé, aby se o ní mohlo uvažovat z hlediska zařazení do užší studie.

Velmi zajímavý účinek vykazoval extrakt z *Caryophylli flos* (dále jen CF). Tato droga obsahuje především silici s hlavními obsahovými látkami eugenolem, dále obsahuje eugenol-acetát, α - a β -karyofylen²¹ aj.. Z netěkavých látek s biologickým účinkem jsou přítomny flavonoidy (kemferol, rhamnetin, kvercetin, hyperosid, myrecetin a další), pentacyklické triterpeny (oleanolová kyselina) a jednoduché fenoly (kyselina elagová)⁴⁵. Do sumárního extraktu přešly siličné složky i složky netěkavé. U mastomyši bylo zaznamenáno mírné zvýšení vylučování oocyst o ~ 12%, avšak u myši CD1 se produkce oocyst v testované skupině oproti skupině kontrolní snížila o ~ 84 %. Tento účinek je patrně dán celým komplexem obsahových látek, protože je známo, že řada komponent tohoto komplexu má antibakteriální, protizánětlivý (COX 2 inhibitor), antioxidační, fungistatický, fungicidní, imunostimulační účinek a podporuje i hojení ran⁴⁵. Tento extrakt je tedy perspektivní pro další studium z hlediska antikokcidické aktivity.

Jednoznačně nejperspektivnější je však extrakt z *Ocimi sancti herba* (OSH). Tato rostlina je běžně pěstována a používána zejména v Indii, kde je známa pod označením Tulsi⁴⁶. Jedná se především o siličnou rostlinu (alkany, karyofylen, karvakrol, methyleugenol, eugenol), z netěkavých sloučenin obsahuje běžné fenolické látky (flavonoidy a triterpeny). Extrakt snižoval vylučování oocyst jak u mastomyši (o ~ 90 %), tak i u myši CD1 (pokles vylučování o ~ 61 %). Účinek vychází s největší pravděpodobností nejen z biologického efektu siličných složek (protože tyto složky jsou zastoupeny i v jiných drogách a markantní efekt nevykazují), ale také z látek netěkavých. Silice OSH vykazovala antimikrobiální aktivitu vůči běžným kmenům kutánní mikroflóry^{47,48}. Zdá se, že hlavní antimikrobiální účinek je patrně založen na přítomnosti eugenolu. Literatura neuvádí vliv obsahových látek OSH na *Eimerie*, zdá se, že toto poznání je nové a zaslouží si další pozornost.

Z hlediska dalších studií se zdá doporučitelné kombinovat extrakt z *Caryophylli flos* (nebo *Caryophylli etheroleum*) s extraktem získaným z *Ocimi sancti herba* a provést tuto studii na kuřatech.

6. SOUHRN

K přípravě extraktů a následnému testování bylo na základě literatury vybráno několik drog - *Caryophylli flos*, *Curcumae longae radix*, *Ocimi sancti herba*, *Origani herba* a jedna izolovaná substance knicin (z *Cardui benedicti herba*).

Z těchto drog jsem metodou kontinuální extrakce (perkolace) připravila extrakty a poté u nich stanovila sušinu. Potřebné množství zhomogenizovaného extraktu jsem sorbovala na celozrnnou mouku tak, aby v konečném množství roztěru 200 g byly nasorbovány 2 g suchého extraktu a byl dokonale homogenní. Tento roztěr byl dispergován do krmiva pro myši a krysy tak, aby výsledná koncentrace byla 100 ppm. V případě knicinu jsem obdržela již izolovanou substanci, příprava roztěru probíhala obdobným způsobem.

Každý z extraktů a knicin byly testovány v jednom experimentu, jehož délka se pohybovala kolem asi 7 – 8 dnů. Testovaná látka byla podávána pokusné skupině zvířat (mastomyši a myši CD1) v krmivu, kontrolní skupina zvířat dostávala stejné krmivo, ale bez přídavku testované látky.

Kokcidiostatický efekt se zjišťoval jako rozdíl v kvantitě vylučovaných oocyst mezi testovanou a kontrolní skupinou.

Dle grafu 19 je patrné, že nejlepší kokcidiostatickou aktivitu vykazovaly tři extrakty připravené z drog *Ocimi sancti herba*, *Caryophylli flos* a *Origani herba*. U *Ocimi sancti herba* bylo zaznamenáno snížení vylučování oocyst v testované skupině oproti kontrolní o ~ 90 % u mastomyši a o ~ 61 % u myši CD1.

V případě *Caryophylli flos* došlo ke snížení produkce oocyst v testované skupině oproti kontrolní pouze u myši CD1 (o ~ 84 %), ve skupině mastomyši bylo naopak zaznamenáno mírné zvýšení vylučování (asi o ~ 12 %).

U *Origani herba* je pozitivní účinek doložen pouze u skupiny mastomyši (snížení vylučování oocyst v testované skupině oproti kontrolní o ~ 46 %), zatímco u myši CD1 došlo k výrazně vyšší produkci oocyst ve srovnání s kontrolní skupinou (o ~ 71 %).

V případě knicinu došlo v testované skupině myši CD1 k nárůstu produkce oocyst oproti kontrolní skupině o 44,60 %. Testování na mastomyších neproběhlo. Z pohledu dalšího studia jsou perspektivní pouze *Caryophylli flos* a zejména extrakt z *Ocimi sancti herba*.

7. LITERATURA

-
- ¹ Yoshizawa, S., Nito, S., Ishihara, F.: Oocyst-killing agents containing hydrogen peroxide and basic compounds. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08268817* (1996).
- ² Ševčík, M., Lamka, J.: *Veterinární farmakologie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha 1993, s. 23-24.
- ³ Park, K. G. M., Gates, P. D., Garlick, P. J. et al.: Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginin. *Lancet* 337, 645-646 (1991).
- ⁴ Abcouwer, S. F., Souba, W. W.: Glutamine and arginine. In: Shils M. E., Olson, J. A., Shike, M., Ross, A. C. (eds.) *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th Ed., Baltimore MD, Williams and Wilkins, 1999, s. 559-569.
- ⁵ Bulus, N., Cersosimo, E., Ghishan, F., Abumrad, N. N.: Physiologic importance of glutamine. *Metabolism* 38 (Suppl.), 1-5 (1989).
- ⁶ Juany, E. Y., Lejny, S. W., Wang, C. J. et al.: Oral glutamine to alleviate radiation-induced oral mucositis a pilot randomized trial. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 46, 535-539 (2000).
- ⁷ Rohde, T., MacLean, D. A., Karlund, P. D.: Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand. J. Immunol.* 44, 648-650 (1996).
- ⁸ Babineau, T. J., Hackford, A., Kenler, A. et al.: A phase II multicenter, double-blind randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. *Arch. Surg.* 129, 1204-1210 (1994).
- ⁹ Babineau, T. J., Marcello, P., Swails, W. et al.: Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high risk surgical patients. *Arch. Surg.* 220, 601-609 (1994).
- ¹⁰ Singh, S. S., Agarwal, S. K., Verma, S., Siddiqui, M. S., Kumar, S.: Chemistry of garlic (*Allium sativum*) with special reference to alliin and allicin – a review. *J. Med. Aromat. Plant Sci.* 20(1), 93-100 (1998).

-
- ¹¹ Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D.: Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(3), 282-286 (2001).
- ¹² Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985-990 (1999).
- ¹³ Branton, S. L., Lott, B. D., Deaton, J. W., Maslin, W. R., Austin, F. W., Pote, L. M., Keirs, R. W., Latour, M. A., Day, E. J.: The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. *Poultry Sci.* 76(1), 24-28 (1997).
- ¹⁴ McDevitt, J. T.: Berberine alkaloids as a treatment for chronic, protozoally-induced diarrhea. *PCT Int. Appl. WO 9800018* (1998).
- ¹⁵ Marks, W.: Treatment of viral, viroidal, or oncogenic diseases with steroidal saponins or their aglycons. *Ger. Offen. DE 4303214* (1994).
- ¹⁶ Ochi, M., Tsuburaya, E.: Novel steroidal saponin and antimicrobial agents and antitumor agents containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10158295* (1998).
- ¹⁷ Magota, H., Okubo, K., Shomoyamada, M., Suzuki, M., Maruyama, M.: Isolation of steroidal saponin as antifungal agent. *Jpn. Kokai tokkyo Koho JP 03048694* (1991).
- ¹⁸ Dalloul, R. A., Lillehoj, H. S., Shellem, T. A., Doerr, J. A.: Effect of vitamin A deficiency on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in broiler chickens. *Poultry Sci.* 81(10), 1509-1515 (2002).
- ¹⁹ Hooge, D. M., Cummings, K. R., McNaughton, J. L., Quarles, C. L., George, B. A.: Dietary sodium bicarbonate, coccidial challenge and ionophore coccidiostats in broiler chicken. *J. Appl. Poult. Res.* 8(1), 89-99 (1999).
- ²⁰ Český farmaceutický kodex. X-Egem, Praha 1993.

-
- ²¹ Newall, C. A., Anderson, L. A., Phillipson, J. D.: Herbal medicines. The pharmaceutical press, London 1996, s. 79, 160.
- ²² WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 2, WHO, Ženeva 2002, s. 79, 118-121.
- ²³ Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlín a lesných plodov. Osveta, Martin 1982, s. 116.
- ²⁴ WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1, WHO, Ženeva 2002, s. 209-212.
- ²⁵ Carmo, M. M., Frazao, S., Venancio, F.: J. Essent. Oil. Res. 2:69-71 (1989).
- ²⁶ Antonescu, V., Sommer, L., Predescu, I., Barza, P.: Farmacia. 30:201-208 (1982).
- ²⁷ Mirovich, V. M., Peshkova, V. A., Shatokhina, R.K., Fedoseev, A. P.: Khim. Prir. Sordin. 25:850-851 (1989).
- ²⁸ Sullivan, D. M., Kehoe, D. F., Smith, R. L.: J. Assoc. Anal. Chem. 70:118-120 (1987).
- ²⁹ Beuchat, L. R.: J. Food Sci. 41:899-902 (1976).
- ³⁰ Llewellyn, G. C., Burkett, M.L., Eadie, T.: J. Assoc. Anal. Chem. 64:955-960 (1981).
- ³¹ Tomko, J. a kol.: Farmakognózia. Osveta, Martin 1999, s. 309.
- ³² Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, H.: Obecná farmakognosie II. Sekundární látky, Karolinum, Praha 1989, s. 264-265.
- ³³ Wagner, H., Wierer, M., Bauer, R.: Planta Med. 52:184-187 (1986).
- ³⁴ Lutomski, J., Kedzia, B., Debska, W.: Planta Med. 26:9-19 (1974).

-
- ³⁵ Schneider, G., Lachner, L.: *Planta Med.* 53:247–251 (1987).
- ³⁶ Bradley, P., R.: *British herbal compendium*. Vol. 1, British herbal medicine association, London 1992, s. 127.
- ³⁷ Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody 1, izolace obsahových látek*. Karolinum, Praha 1999, s. 39.
- ³⁸ *Československý lékopis 4. vydání*. Avicenum, Praha 1987, s. 76.
- ³⁹ Modrý, D.: Dosud nepublikováno.
- ⁴⁰ Chandra, D., Gupta, S. S.: *Ind. J. Med. Res.* 60:138-142 (1972).
- ⁴¹ Gupta, S. S., Chandra, D., Mishra, N.: *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 16:264 (1972).
- ⁴² Opletal, L.: Dosud nepublikováno.
- ⁴³ Zhang, K. Y., Zan, F., Keen, C. A., Waldroup, P. W.: Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 4(9), 612-619 (2005).
- ⁴⁴ Karioti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia, B., Harvala, C.: Secondary metabolites from *Centaurea deusta* with antimicrobial activity. *Journal of Biosciences*. 59(7/8), 612 (2004).
- ⁴⁵ Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., duCellier, J., Duke, P. A. K.: *CRC Handbook of medicinal spices*, CRC Press, Boca Raton 2003, s. 281-285.
- ⁴⁶ Prakash, P.: Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 49(2), 125-131 (2005).

-
- ⁴⁷ Chandra, D.: Antidandruff compositions containing tulsi oil and an synergistic antimicrobial. PCT Int. Appl. WO 2004006876 (2004).
- ⁴⁸ Chaumont, J. P., Mandin, D., Sanda, K., Koba, K., Aristide de Souza, C.: In vitro antimicrobial activities of five essential oils of Lamiaceae of Togo against representative strains of cutaneous microflora. *Acta Botanica Gallica*. 148(2), 93-101 (2001).