

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds
lauku attīstībai



Latvijas
Biozinātņu un
tehnoloģiju
universitāte

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

LATVIJAS BIOZINĀTŅU UN TEHNOLOĢIJU UNIVERSITĀTE
VETERINĀRMEDICĪNAS FAKULTĀTES

Projekta nr. :
18-00-A01620-000028

“Ārstniecības augu ekstraktus saturoša pretparazitārā fitolīdzekļa
izstrāde”

Zinātniskā atskaite

Īstenošanas periods: 01.03.2019-31.08.2023
Projekta kopējās izmaksas: EUR 99850.00



Projekta vadītāja: profesore, vadošā pētniece Līga Kovaļčuka

Projekta koordinators: LLU projektu administratore Ilze Vīķe: ilze.vike@llu.lv

Sadarbības partneri:



Jelgava, 2023

Saturs

PROJEKTA PARTNERI UN IZPILDĪTĀJI:	3
KOPSAVILKUMS	5
PROJEKTA MĒRĶIS UN UZDEVUMI	6
PROJEKTA PĀRSKATĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	7
IEVADS	8
MATERIĀLI UN METODEDES	11
Pētījuma vispārējais apraksts.	11
Projekta I fāze – materiāla iegūšana.	11
Ievāktu augu un drogu apraksts.....	12
Projekta II fāze – drogu materiāla apstrāde	14
Projekta III fāze – patoloģiskā materiāla iegūšana	14
Projekta IV fāze – parazitārā materiāla apstrāde, parazitū audzēšana un ekstraktu pārbaude <i>in-vitro</i>	15
Parazītu un to olu ieguve.....	15
Atšķaidījumu pagatavošana	16
Ovocīdās darbības noteikšana - <i>Egg hatch test</i> (olu aizmešanās tests)	17
Larvicīdās darbības noteikšana – <i>Larval development test</i> (kāpuru attīstības tests)	19
Datu statistiskā analīze.....	20
Projekta V fāze – materiāla apkopošana, publicitāte, semināra organizēšana	20
REZULTĀTI	21
I Fāzes rezultāti	21
II Fāzes rezultāti.....	21
III fāzes rezultāti.....	26
IV fāzes rezultāti.....	26
Ekstraktu ovocīdā iedarbība.....	26
Ekstraktu larvicīdā iedarbība.....	29
IV fāzes rezultāti.....	31
PĒTĪJUMĀ SASNIEGTIE MĒRĶI	34
SECINĀJUMI	35
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	36
PIELIKUMI	39

PROJEKTA PARTNERI UN IZPILDĪTĀJI:

1. Vadošais partneris:

Latvijas Lauksaimniecības universitāte (LLU (no 2022. gada Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte (LBTU)) Veterinārmedicīnas fakultāte – projekta administrēšana, literatūras izpēte, metodikas izstrāde, ārstniecības augu *in-vitro* zinātniskā izstrāde, zinātniskā interpretācija, rezultātu interpretācija.

www.llu.lv.

Izpildītāji:

- Vadošā pētniece, prof. Līga Kovaļčuka. kovalcuka@gmail.com, liga.kovalcuka@llu.lv
- Vadošā pētniece, asoc. prof. Dace Keidāne. dace.keidane@llu.lv
- Pētniece, Alīna Kļaviņa. Alina.klavina@llu.lv
- Laborants, Kristīne Ganola

2. Sadarbības partneri:

2.1. Rīgas Stradiņa universitāte, Farmācijas fakultāte (RSU FF)– Latvijas tradicionālo ārstniecības augu iegūšana, ekstraktu sagatavošana, izpēte, atšķaidījumu sagatavošana.

www.rsu.lv

Izpildītāji:

- Vadošā pētniece, prof., Dr.pharm., Dace Bandere dace.bandere@rsu.lv
- Vadošā pētniece, asoc. prof., Dr.paed., Rudīte Koka rudite.koka@rsu.lv
- Laborants Renāte Teterovska (Šukele) rsukele@gmail.com

2.2.SIA “Mikaitas” – projekta idejas autors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un nodrošināšana projekta vajadzībām.

www.mikaitas.lv

Izpildītāji:

- Veterinārārste, aitu saimniecības īpašniece - Aija Šneidere

2.3. SIA “Veterinārmedicīnas izglītības centrs” – projekta informācijas izplatīšana, semināra rīkošana.

www.vicinfo.lv

Izpildītāji:

- Projektu vadītāja - Sandra Skara Sirmā.

2.4. Biedrība Latvijas aitu audzētāju asociācija (LAAA) – projekta informācijas apkopošana, izplatīšana nozarei, semināra organizēšana.

www.laaa.lv

Izpildītāji:

- Prof. Daina Kairiša

KOPSAVILKUMS

Latvijā gremošanas sistēmas strongilīdu invāzijas aitū un kazū ganāmpulkos ir liela problēma, un invāzijas ekstensitāte atsevišķos ganāmpulkos sasniedz pat 70%- 80%.

Visbiežāk atgremotājdzīvnieki invadējas ar Trichostrongylidae dzimtas sekojošām ģintīm: Trichostrongylus, Haemonchus, Ostertagia, Cooperia un Nematodirus. Trihostrongilīdi parazitē atgremotājdzīvnieku īstajā kuņģī glūmeniekā un tievajās zarnās. Invadētiem dzīvniekiem novēro vairāk vai mazāk izteiktu diareju, dzīvnieki novājē, samazinās to produktivitāte, kā arī novēro anēmiju. Stipras invāzijas gadījumos no dzīvniekiem iegūtais piens un gaļas produkcijas daudzums samazinās pat par 50-70 %. Šo parazitū kontrole un iznīcināšana ir būtiska gan no dzīvnieku labturības un ganāmpulka veselības viedokļa, gan ekonomiskā viedokļa, samazinot zaudējumus lauksaimniecības saimniecībai. Latvijas tirgū pieejamo pretparazitāro medikamentu piedāvājums ir nepietiekams un, vienlaicīgi, parazitū rezistence pret atsevišķiem pretparazitāriem medikamentiem jau pastāv daudzās pasaules valstīs, tai skaitā Latvijā.

Tāpēc šī projekta mērķis bija izstrādāt jaunus, inovatīvus fitopreperātus, kas iegūti no Latvijas florai raksturīgo augu ekstraktiem atgremotājdzīvnieku gremošanas sistēmā parazitējošo parazitū strongilīdu kontrolei.

Projekta laikā tika veikta eksperimentālā izstrāde, jo līdz šim Latvijā nav veikti pētījumi par reģionam raksturīgo ārstniecisko augu pretparazitāro iedarbību. Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas fakultātes Farmācijas ķīmijas katedrā tika atlasīti, izstrādāti, izgatavoti vairāki Latvijas florai raksturīgi ārstniecisko augu ekstrakti, to atšķaidījumi. Latvijas Lauksaimniecības universitātē Veterinārmedicīnas Fakultātes Pārtikas un Vides Higienas institūta Parazitoloģijas laboratorijā *in-vitro* apstākļos tika izmēģinātas iegūto ekstraktu, to dažādas koncentrācijas pretparazitārā ietekme uz Latvijas aitū saimniecībās izolētu un laboratorijas apstākļos ataudzētu atgremotājdzīvnieku strongilīdu olām un kāpuru L1, L2, L3 stadijām.

No visiem analizētajiem augu drugu ekstraktiem pretparazitārā iedarbība tika noteikta vērmes un vībotnes lakstu un biškrēsliņa ziedu un lapu drugu spirta un acetona ekstraktiem. Projektā tika konstatēts, ka *in-vitro* visiem augu ekstraktiem piemīt larvicīdā iedarbība, un tā ir būtiski labāka nekā ovocīdā, īpaši ekstraktiem, kur drugu ekstraktu sagatavošanā kā šķīdinātājs tika izmantots acetons, ir izteiktāka iedarbībai uz parazitū olām. Tika konstatēts, ka tannīnu daudzums ekstraktā ir būtisks faktors pretparazitārajai efektivitātei, jo vērmes ekstraktiem novēroja zemāku kopējo tannīnu daudzumu un larvacīdo iedarbību. Kopumā jāatzīmē, ka 50% biškrēsliņa lapu ekstrakti uzrādīja vislabāko ovocīdo iedarbību un larvicīdo iedarbību. Tāpēc nākotnē plānots šo pētījumu turpināt, lai analizētu šo augu pretparazitāro ietekmi *in-vivo* – aitū organismā.

PROJEKTA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

Projekta mērķis ir izstrādāt jaunus, inovatīvus fitopreperātus, kas iegūti no Latvijas florai raksturīgo augu ekstraktiem lauksaimniecības praksē biežāk sastopamo atgremotājdzīvnieku gremošanas sistēmā parazitējošo Trichostrongylidae dzimtas parazītu kontrolei.

Projekta galvenais uzdevums ir, sadarbojoties lauksaimniecības organizācijām, dzīvnieku audzētājiem un starpnozaru pētniekiem, izpētīt un ieviest praksē zinātniski pierādītus, bioloģiskus, dzīvniekam un videi nekaitīgus fitopreperātus no Latvijā augošiem ārstnieciskiem augiem, kas paredzēti parazītožu kontrolei.

Jaunizveidotie fitopreparātu ekstrakti būtu parazītu faunai jauni, nezināmi bioloģiski aktīvo vielu kompleksi, kas saturētu vairākas, sarežģītas bioloģiski aktīvās vielas ar zemu rezistences veidošanās risku. Fitoterapeitisko līdzekļu pielietošana mazinātu potenciālos ekonomiskos zaudējumus, kas saistīti ar komerciāli pieejamo farmakoloģisko zāļu dārdzību. Jāatzīmē arī izdevumi, kas saistās ar produkcijas realizācijas ierobežojumiem dēļ zāļu ilgstošā izdalīšanās perioda.

Rezultātā tiks izstrādāta jauna, zinātniski pierādīta bioloģiski aktīva fitopreparāta izejviela ar pretparazītu ietekmi, kas paredzēta parazītu kontrolei.

PROJEKTA PĀRSKATĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

1. RSU FF – Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas fakultāte
2. LLU VMF – Latvijas Lauksaimniecības universitāte Veterinārmedicīnas fakultāte
3. LBTU VMF – Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte Veterinārmedicīnas fakultāte
4. PVHI – Pārtikas un Vides higiēnas institūts
5. KLIN – Klīniskais institūts
6. LAAS – Latvijas Aitu audzētāju asociācija
7. VIC – Veterinārmedicīnas Izglītības centrs
8. LAD – Lauku Atbalsta dienests
9. LR PVD - Latvijas Republikas Pārtikas un Veterinārais dienests
10. L1 – pirmās attīstības stadijas kāpurs/i
11. L2 – otrās attīstības stadijas kāpurs/i
12. L3 – trešās attīstības stadijas kāpurs/i

IEVADS

Pasaulē un arī Latvijā gremošanas sistēmas strongilīdu invāzijas aitū un kazu ganāmpulkos ir liela problēma, un invāzijas ekstensitāte atsevišķos ganāmpulkos sasniedz pat 70% - 80% (Torres-Acosta, Hoste, 2008; Keidāne et al., 2022) Visbiežāk atgremotājdzīvnieki invadējas ar Trichostrongylidae dzimtas sekojošām ģintīm: *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Cooperia* un *Nematodirus*. Trihostrongilīdi parazitē atgremotājdzīvnieku īstajā kuņģī - glumeniekā un tievajās zarnās (Kaplan, 2013). Invāzijas raksturojas ar dažādas pakāpes diareju, dzīvnieki novājē, samazinās to produktivitāte, kā arī novēro anēmiju. Slimībai attīstoties aitām novēro anēmiju, zemžokļa tūskas un nereti arī dzīvnieku nobeigšanos (Dehuri et al., 2021). Stipras invāzijas gadījumos no dzīvniekiem iegūtais piens un gaļas produkcijas daudzums samazinās pat par 50-70 % (Sargison et al., 2009, Mavrot et al., 2015). Šo parazītu kontrole ir būtiska gan no dzīvnieku labturības un ganāmpulka veselības viedokļa, gan ekonomiskā viedokļa. Latvijā aitām visbiežāk konstatē *Eimeria* spp. 97%, Trichostrongylidae 91% un *Strongyloides* spp. 76% (Keidāne et al., 2022).

Visiem gremošanas sistēmā parazitējošiem strongilīdiem raksturīgi, ka to olas izdalās ārējā vidē ar dzīvnieku fekālijām. Tādā veidā tiek piesārņotas dzīvnieku ganības un tiek nodrošināts parazītu tālākais attīstības cikls. Olu embrionēšanās un kāpuru attīstība ir atkarīga no apkārtējiem vides apstākļiem - temperatūras, mitruma. No olas izšķīlušas pirmās attīstības stadijas kāpurs (L1), kas ārējā vidē divas reizes maina apvalku un pārveidojas par invadētspējīgo jeb trešās attīstības stadijas kāpuru (L3), kas ir izturīgs pret ārējās vides apstākļiem un mūsu klimata apstākļos spēj pārziemot. Šo parazītu profilakse un kontrole ir būtiska gan no dzīvnieku labturības un ganāmpulka veselības viedokļa, gan no ekonomiskā viedokļa, samazinot invāzijas radītos zaudējumus saimniecībai (Belecke et al., 2021).

Dzīvnieki invadējas ar parazītiem, uzņemot ar barību vai ūdeni trešās stadijas (L3) strongilīdu kāpurus. Trešās stadijas kāpuri glumeniekā vēlreiz nomaina apvalku (L4) un kļūst pieauguši. Būtisku kaitīgumu aitām rada strongilīdu sugas *Haemonchus contortus* un *Ostertagia circumcincta*. Hemonhi ievaino glumenieka un tievo zarnu gļotādu, ne tikai radot asiņojumus, bet arī pašiem barojoties ar asinīm izsauc dzīvniekiem mazasinību. Pieauguši hemonhi diennaktī izsūc ap 0.5μl asiņu, bet vairāk kā 10 000 hemonhu izsauc dzīvnieka nāvi akūta asins zuduma dēļ.

Ostertāģiju kāpuriem attīstoties glumenieka dziedzeros samazinās klājšūnu skaits, bet pastiprināti savairojas skābi neproducējošās dziedzeršūnas. Vēlākā stadijā novēro glumenieka pH paaugstināšanos, izmaiņas asins ainā un organisma intoksikāciju ar kāpuru izdalītiem vielmaiņas galaproduktiem. Rezultātā tiek nopietni traucēta barības vielu uzsūkšanās gremošanas kanālā, kā rezultātā dzīvnieki atpaliek augšanā, attīstībā, bet stipru invāziju gadījumos no dzīvniekiem iegūtais piens un gaļas produkcijas daudzums samazinās pat par 50-70 % (Patterson et al., 1996; Урххарт et al., 2000; Balic et al., 2000; Taylor et al., 2007).

Saslimšana raksturojas ar vairāk vai mazāk izteiktu diareju, dzīvnieki novājē, samazinās to produktivitāte, kā arī novēro anēmiju. Smagu invāziju gadījumā, aitām parādās anēmijas un tūskas zemžokļa apvidū, pavēderē, kas nereti beidzas ar dzīvnieka nāvi. Sevišķi smagi slimo jēri. Strongilītu invāzijas parasti norit maišinvāziju veidā. Tas nozīmē, ka aitū gremošanas sistēmā vienlaikus var parazitēt gan hemonhi, gan ostertāģijas, bunostomas un citi iepriekš minētie dzimtu parazīti. Atkarībā no tā, kura veida parazitoze būs pārsvarā pār pārējām, tiks radītas vieglākas vai smagākas invāzijas klīniskās pazīmes.

Strongilīdu invadētspējīgie kāpuri ir izturīgi ārējā vidē un mūsu klimatiskajos apstākļos ir spējīgi arī pārziemot. Lai notiktu kāpuru izšķilšanās no olām un to tālāka attīstība, jābūt attiecīgai ārējās vides temperatūrai un mitrumam. Zināms, ka ārējās vides temperatūrā 9°C strongilīdu kāpuri neattīstās. Labvēlīga temperatūra, kāpuru attīstībai ir no 20°C līdz 26°C. Literatūrā aprakstīts, ka mērena klimata zonās, hemonhu kāpuri no L1 stadijas līdz invadētspējīgai L3 stadijai attīstību var sasniegt četrās dienās, ja vidējā diennakts temperatūra ir 25°C (Dwight, Bowman, 2008; Taylor et al., 2007). Lai notiktu parazitisko olu embrionēšanās ārējā vidē, mitrumam būtu jābūt 70% - 80% robežās.

Atgremotājdzīvniekiem LR Veterināro zāļu reģistrā atrodamas pretparazitārās zāles, kas satur ivermektīnu, moksidektīnu, eprinomektīnu, albendazolu, fenbendazolu, levamizolu un monipantelu (LR PVD, 2022), bet Latvijas tirgū pieejamo pretparazitāro medikamentu piedāvājums ir nepietiekams. Šo zāļu lietošana nav ieteicama būt biežāka kā divas reizes gadā. Medikamenti jāievada stingri noteiktās devās. Nav ieteicams divas reizes pēc kārtas lietot vienu un to pašu medikamentu, kā arī nebūtu vēlams atkārtoti lietot tās pašas grupas medikamentu. Ignorējot šos nosacījumus, pastāv risks gremošanas sistēmā parazitējošiem strongilīdiem izveidot rezistenci pret medikamentiem (Leathwick, Luo, 2017, Kovaļčuka et al., 2022).

Jāatzīmē, ka ivermektīns, moksidektīns un eprinomektīns ir makrocikliskie laktoni, tā ir viena medikamentu grupa, tā pat kā albendazols un fenbendazols, kas pieder pie benzimidazolu grupas. Rezultātā -atgremotājdzīvnieku dehelmintizācijas medikamentu izvēle samazinās. Benzimidazolu grupas medikamentu atliekvielas var konstatēt pat 1-3 nedēļas pēc medikamenta lietošanas un pirms kaušanas aizlieguma periods var sasniegt 7-29 dienas. Tāpat jāņem vērā fakts, ka daļu no grupas pārstāvjiem nedrīkst lietot laktējošiem dzīvniekiem. Lai gan benzimidazoli kopumā ir droši medikamenti, tomēr, piemēram, albendazols var būt teratogēns un embriotoksisks, kā arī visai benzimidazolu grupai novēro krustenisko rezistenci. Makrocikliskie laktoni ilgu laiku uzkrājas audos un pirmskaušanas aizlieguma laiks atgremotājdzīvniekiem var sasniegt pat 66 dienas pēc zemādas injekcijas. Tos nedrīkst lietot laktējošiem dzīvniekiem, tostarp grūsnēm dzīvniekiem 60 dienu laikā pirms atnešanās un dzīvniekiem, kuru pienu plānots izmantot pārtikā (Prichard, Geary, 2019; Kaplan, 2013).

Pasaulē strauji pieaug bakteriālā rezistence, kas ir viena no aktuālākajām problēmām medicīnā un veterinārmedicīnā visā pasaulē. Tomēr jāatzīmē, ka arī pretparazitārās rezistences problēma ir pieaugoša, it īpaši veterinārmedicīnā, kas rada ne tikai dzīvnieku labturības izaicinājumus, bet nodara būtiskus ekonomiskus zaudējumus lauksaimniecībā. Tas rada pieprasījumu pēc jauna veida ārstniecības līdzekļiem. Tādēļ fitofarmācija varētu kalpot par jaunu zāļu ieguves avotu.

Augu sekundārie metabolītiem piederošie fenola tipa savienojumi izplatīti visos augos. Viena no polifenola tipa savienojuma grupām ir tanīni jeb miecvielas. Tanīniem piemīt savelkoša garša, ko skaidro ar to spēju saistīt proteīnus gļotādā. Klasiski tos izmanto kā pretcaurejas līdzekļus vai saindēšanās gadījumā ar alkaloīdiem. Šobrīd tiek pievērsta uzmanība arī to citām ārstnieciskām īpašībām – antioksidantu, antibakteriālas, prettārpu, pretiekaisuma u.c (Kardel et al., 2013)

Fitoterapeitiskos preperātus paredzēts pielietot mazajiem atgremotājdzīvniekiem - aitām, gremošanas sistēmā parazitējošo strongilīdu kontrolei, lai vienlaicīgi samazinātu parazitāru radīto negatīvo ietekmi uz dzīvnieku veselību, imunitāti un produktivitāti, kā arī mazinātu ekonomiskos izdevumus lauksaimniecības uzņēmumiem. Jaunatklātu fitopreperātu izmantošana dotu iespēju lietot dzīvnieka organismam mazāk kaitīgus, dabiskus, bioloģiskas izcelsmes produktus, kas vienlaicīgi mazinātu potenciālos ekonomiskos zaudējumus, kas

saistīti ar komerciāli pieejamo zāļu dārdzību, zāļu radītām blaknēm un to novēršanu. Jāņem vērā arī iespējamo zāļu rezistenci.

Bioloģiskajās saimniecībās pēc pretparazitāru medikamentu lietošanas, gaļas un piena realizācijas laiks pagarinās par 70 dienām. Fitopreperātiem nav nepieciešams noteikt ierobežojumus dzīvnieku produkcijai, līdz ar to mazinātos izdevumi, kas saistīti ar produkcijas realizācijas ierobežojumiem pēc ķīmisko pretparazitāro līdzekļu lietošanas. Fitopreperātu lietošana būtiski uzlabotu un atvieglotu parazitāru kontroli bioloģiskajās saimniecībās, kur farmakoloģisko līdzekļu lietošana ir ierobežota un nav vēlama. Jāņem vērā, ka makrociklisko laktonu grupas zāles, tai skaitā ivermektīns, izdalās 98% caur fēcēm neizmainītā veidā un ir kaitīgs ārējā vidē esošiem kukaiņiem, kas barojas no dzīvnieku fekālijām, gan izteikti toksisks ūdens dzīvniekiem. Jaunizveidotie fitopreperāti nodrošinātu videi un dzīvniekam nekaitīgu pretparazītu profilaksi un kontroli.

Augi tika izvēlēti, balstoties uz literatūru, augu monogrāfijām un vēsturiski Latvijas folklorā minētiem augiem ar potenciālu pretparazitāru ietekmi (Sile et al., 2020; Sile et al., 2020). Projektā laikā tika izanalizēti augi, kuriem ir zinātniski konstatēti pierādījumi to pretparazitārai ietekmei (Kovaļčuka et al., 2022). Projekta ietvaros tika sagatavoti un analizēti dažādi ekstrakti, iegūti no sešām augu drogām (Biškrēsliņa ziedi un lapas, Ozola mizas, Virša laksti, Vērmeles laksti un Vībotnes laksti).

MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījuma vispārējais apraksts.

Pētījums tika uzsākts 2019. gada martā pēc Lauku Atbalsta dienesta (LAD) lēmuma par projekta iesnieguma Nr.18-00-A01620-000028 apstiprināšanu 28.02.2019. Projektā iesaistīti kā galvenais partneris Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultāte (LLU VMF) (no 2022. gada Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte (LBTU) un sadarbības partneri: SIA Veterinārmedicīnas izglītības centrs (VIC), Rīgas Stradiņa universitāte Farmācijas fakultāte (RSU FF), SIA "Mikaitas" un Biedrība "Latvijas aitu audzētāju asociācija" (LAAA).

Projekta gaita iedalīta četrās fāzēs. Projekts balstīts jaunu fitopreparātu efektivitātes noteikšanu *in-vitro* uz dažādas attīstības parazītu olu un kāpuru stadijām, kas iegūtas rutīnas klīniskās un parazitoloģiskās izmeklēšanas laikā no koproloģiskajiem paraugiem. Šī iemesla dēļ nav nepieciešama Latvijas Republikas Pārtikas un Veterinārā dienesta (LR PVD) atļauja dzīvnieku izmantošanai pētniecībā.

Projekta I fāze – materiāla iegūšana.

Projekta pirmajā fāzē praktisko izpēti uzsāka RSU FF pētnieki. Pētījumu uzsākot, tika ievāktas Latvijas florai raksturīgu ārstniecības augu viršu, vērmeles, vībotnes, biškrēsliņa un ozola mizas drogas (tabula 1.).

1. Tabula. Augu un drogu nosaukumi latīņu, latviešu un angļu valodā.

Augs latviski	Augs latīniski	Augs angļiski	Droga
Virsis	<i>Calluna vulgaris</i>	Heather	Laksti
Vērmele	<i>Artemisia absinthium</i>	Wormwood	Laksti
Vībotne	<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	Laksti
Ozols	<i>Quercus robur</i>	English Oak	Miza
Biškrēsliņš	<i>Tanacetum vulgare</i>	Common Tancy	Lapas
Biškrēsliņš	<i>Tanacetum vulgare</i>	Common Tancy	Ziedi

Ievākto augu un drogu apraksts

Sila virsis, arī parastais virsis (*Calluna vulgaris*) pieder ēriku dzimtas viršu ģintij. Virši ir mazi, mūžzaļi pundurkrūmi ar plašu augšanas areālu. Sastopami Eiropā, Islandē, Ziemeļāfrikā, Ziemeļamerikā (Behrend, Hohe, 2016; Spindelböck al., 2013.)

Latvijā sastopams visā valsts teritorijā. Izmēra ziņā tie variē no 20 līdz 100 cm. Lapas ir noturīgas, īsas un tieši ievietotas kāta pamatnē. Ziedi izkārtoti vienpusēji gala ķekaros, ziedkopas ir mazas, diametrā 3 līdz 4 mm, krāsa variē no rozā līdz violetai. Vainags ir sārts, dziļi sadalīts četrās daivās, kas saglabājas arī pēc žāvēšanas. Ziedēšanas process notiek no maija līdz oktobrim, un augļi nogatavojas rudenī. Virsis ir ārkārtīgi izturīgs pret aukstumu. (Ghedira, Goetz, 2013; Saaby et al., 2009; Delerue et al., 2018; Šoltés et al., 2014; Spindelböck et al., 2013. Virša lakstus (ziedus, lapas) ievāc jūlijā, augustā, sausā, saulainā laikā un kaltē līdz 60 °C temperatūrā, pēc žāvēšanas atdala koksnaino daļu (Eniņa, 2017).



1. attēls. Sila virsis.

Parastais biškrēsliņš (*Tanacetum vulgare* L. syn. *Chrysanthemum vulgare* L.) ir aromātisks, līdz 140 cm augsts, daudzgadīgs kurvjziežu dzimtas (*Asteraceae* syn. *Compositae*) lakstaugs, kas ir izplatīts Ziemeļu puslodes mērenajā joslā. Augam raksturīgie biotopi ir ceļmalas, upju krasti, grantsbedres, to audzē arī dārzos, Latvijā augs ir sastopams samērā bieži visā valsts teritorijā (Devrnja et al., 2017; Eniņa, 2017; Kļaviņš, 2020).

Parastā biškrēsliņa stublājs ir stāvs, galotnē nedaudz zarots. Lapas ir plūksnaini dalītas, izkārtotas pamīšus. Ziedi ir sīki, stobrveida, dzeltenī, sakārtoti nelielos kurvīšos, kas kopā veido vairogskaras gan stublāja, gan zaru galos. Auglis ir sēklenis. Ziedēšanas laiks ir no jūlija līdz septembrim, oktobrim. Biežāk izmantojamā auga daļa ir ziedi, bet izmanto arī lakstus. Ziedi ir jāvēc sausā laikā, kad kurvītī ir uzziedējusi aptuveni puse ziedu, nogriežot visu ziedkopu kopā ar aptuveni 4 cm garu kātu. Var vākt arī atsevišķus ziedu kurvīšus ar 2 cm garu kātu. Ziedi jāžāvē parastos apstākļos vai kaltēs līdz 40°C temperatūrā. Arī lakstus vāc ziedēšanas laikā, nogriežot tos līdz 30 cm garus. Tos žāvē tādos pašos apstākļos kā ziedus (Eniņa, 2017).



2. attēls. Parastais biškrēsliņš.

Ozols (*Quercus*) ģints, kurā ir aptuveni 400 ozolu sugu, pieder dižskābaržu dzimtai (*Fagaceae*). Ozoli izplatīti Eiropā, Āzijā un Amerikā (Deryabin, Tolmacheva 2015).

Saskaņā ar Eiropas farmakopeju ozolu sugas, no kurām iegūst drogu, ir *Quercus robur* (syn. *Quercus pedunculata*) jeb parastais ozols, *Quercus petraea* (syn. *Quercus sessiliflora*) jeb klinšu ozols un *Quercus pubescens* jeb pūkainais ozols. Mizu iegūst no jauniem zariem. Izžāvēta droga satur vismaz 3% miecvielu, pārrēķinot uz pirogallolu. Mizas ārējā puse ir gaiši pelēka vai zaļi pelēka, diezgan gluda ar nedaudzām lenticelām. Mizas iekšējā puse ir brūna vai sarkanbrūna. Lauzums ir skabargains un šķiedrains. Drogas pulveris ir brūns vai



3. attēls. Ozols.

sarkanbrūns un šķiedrains (EDQM, 2013; European Pharmacopoeia, 2010).

Mizu ievāc pavasarī, sulu cirkulācijas laikā no aprīļa līdz jūnijam. Žāvē parastos apstākļos, ēnā vai saulē (Eniņa, 2017).

Vērmele (*Artemisia absinthium*) ir daudzgadīgs asteru dzimtas lakstaugs. Parasti tā ir 80 cm gara, bet dažos biotopos tā sasniedz pat 1,5 m augstumu. Stumbrs ir pelēkzaļš, spēcīgs, stāvs, rievots. Tas ir klāts ar smalkiem zīdainiem matiņiem. Vērmeles lapas ir pelēkzaļas arī klātas ar matiņiem, sakārtotas pamīšus. Lapu forma ir atkarīga no tā kur tā atrodas uz auga. Apakšējās lapas ir ar trīskārt vai divkārt plūksnaini dalītu plātņi, bet augšējās sēdošas – lancetiskas. Ziediņi ir sīki, dzelteni, stobrveida, tie ir sakārtoti nelielos nokarenos kurvīšos, kas veido stāvas noliekušās skaras. Auglis ir 1 mm liels sēklenis bez lidmatiņiem. Uz vērmeles lapām ir ēteriskās eļļas matiņi jeb tā sauktie dziedzeri trihomi un pārklājošie T matiņi, tie aizsargā augu pret augstu temperatūru un pārmērīgu sausumu. (Szopa et al., 2020; Rezaeinodehi, Khangholi, 2008; EMA, 2017; Eniņa, 2017).

Vērmele aug dabiski uz neapstrādātas, sausas zemes, akmeņainās nogāzēs un to var kultivēt arī sausā augsnē (V.Eniņa, 2017). Visbiežāk tā ir sastopama tieši Polijā, Skotijā un Anglijā, bet tā ir arī ievesta Ziemeļamerikā, Dienvidamerikā, to var sastapt arī Austrālijā. Parastā vērmele ir sastopama pat 2100 cm augstumā.

Latvijā vērmele nav bieži sastopams augs, tā pārsvarā aug sausās vietās ceļu malās, pakalnos, kāpās pie jūras. Ievāc jūnijā-jūlijā, nogriežot no galotnes 25 cm garus lakstus, bez koksnainās daļas. Žāvē parastos apstākļos vai kaltē līdz 45 °C temperatūrā, plānā slānī (V. Eniņa, 2017). Centrālajā Eiropā ziedēšana ilgst pat līdz oktobrim (Szopa et al., 2020).



4. attēls. Vērmele.

Vībotne (*Artemisia vulgaris*). Daudzgadīgs, liels, 50-170 cm garš kurvjziežu dzimtas lakstaugs. Augs ar īpatnēju, ne sevišķi patīkamu smaržu. Stublājs stāvs, šķautņains, brūnsarkans, skraji apmatots, bagātīgi zaro. Augs blīvi aplapots. Lapas (garums līdz 20 cm) pamīšus, sēdošas (apakšējās ar īsu kātu), divkārt līdz trīskārt plūksnaini dalītas lancetiskās vai lineārās, smailās plūksnās (platums vismaz 0.2 cm) ar gludu vai attāli zobainu malu, pie pamata ar austiņām. Nereti lapas mala ierotījusies. Virspuse tumšzaļa, parasti kaila, apakšpuse pelēcīgāka. Ziedu kurvīšu daudz, tie sīki, šauri (platumā ap 0.3 cm), blīvās un īsās skarveidīgās ziedkopās. Vīkala lapas jumstiņveidīgas, sārti pelēcīgas, ārējās ar zaļu joslu vidū. Stobrziedi dzeltenīgi sārti vai brūnsārti (garumā ap 0.4 cm). Kausmatiņu nav. Auglis - kails, vārpstveidīgs sēklenis. Zied no jūlija līdz oktobrim (V. Eniņa, 2017)..

Eirāzijā plaši izplatīta suga. Ieviesusies Ziemeļamerikā. Mainīga izskata suga, kā ietvaros nodala zemākus taksonus. Latvijā ļoti bieži visā teritorijā. Atsevišķi eksemplāri un dažāda lieluma grupas visdažādākajos biotopos: no mežiem un pļavām līdz nezālienēm.

Lakstus ievāc, nogriežot 25 cm no galotnes pirms ziedēšanas vai tās sākumā jūlijā, augustā, lapas ievāc pirms ziedēšanas. Kaltē parastos apstākļos (V. Eniņa, 2017).



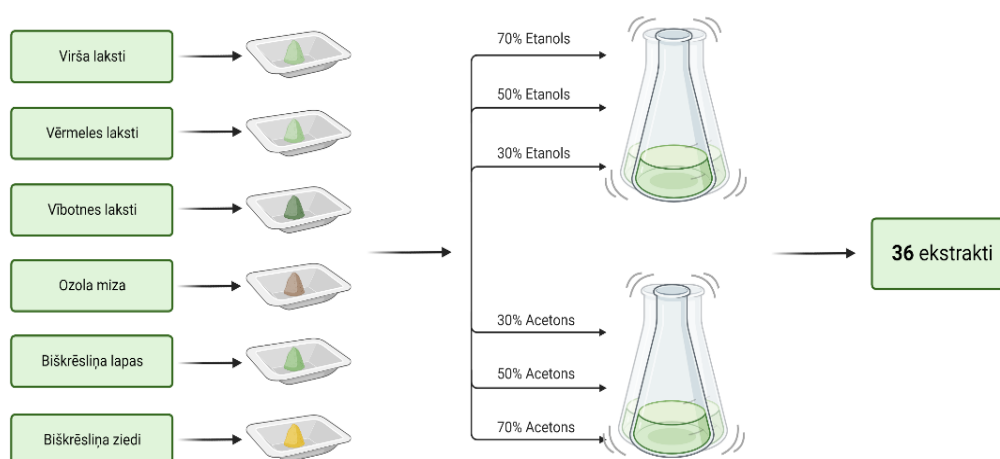
5. attēls. Vībotne.

Projekta II fāze – drogu materiāla apstrāde

Visi ārstniecības augi un drogas tika ievāktas, sagatavotas un žāvētas atbilstoši Eiropas farmakopejas vadlīnijām, kas apkopotas izdevumā (Rubine et al., 1974).

Ziedošiem augiem tika ievākti ziedi un laksti to ziedēšanas laikā no 2019. gada jūnija līdz augustam Rīgas un Siguldas novados (57.083579, 24.782287). Ozola miza tika iegādāta aptiekā (Rīgas farmaceitiskā fabrika).

Visu augu ekstrakti tika pagatavoti, izmantojot vienotu metodiku. 10 g drogas sasmalcinātas līdz daļiņu izmēram $\leq 2\text{mm}$, tika aplietas ar šķīdinātāju (30%, 50%, 70% etilspirts un 30%, 50%, 70% acetons), tad vienu stundu un 20 minūtes macerētas, filtrētas un ietvaicējot līdz 2mL tilpumam, liofilozētas -80°C . Rezultātā iegūti 36 ekstrakti (skat. 6. attēls), kas safasēti flakonos pa 2 mL un sasaldēti -20°C .



6. attēls. Ekstraktu iegūšanas shēma.

Pēc ekstraktu sagatavošanas RSU FF laboratorijā, veikta augu drogu ūdens izvilkumiem ķīmiskās analīzes, nosakot procentuālais kopējais polifenolu (Kähkönen et al., 1999) un kopējais tanīnu (miecvielu) daudzums pēc Eiropas Farmakopejas priekšrakstiem.

Projekta III fāze – patoloģiskā materiāla iegūšana

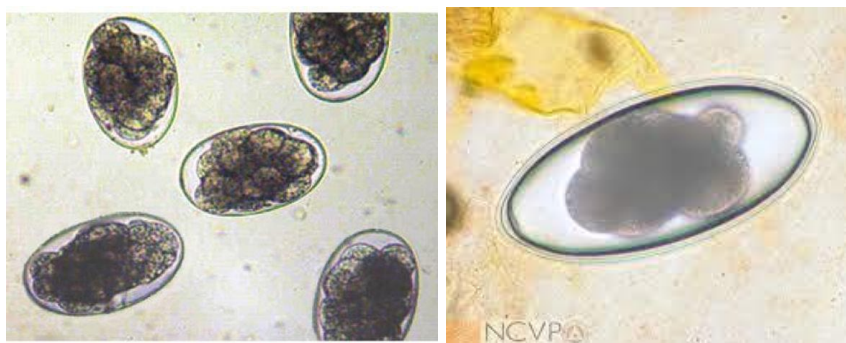
Projekta trešajā fāzē praktisko izpēti uzsāka SIA "Mikaitas" sadarbībā ar LLU VMF PVHI pētniekiem. Laika posmā no 2020. gada janvāra līdz 2021. gada decembrim vairākkārtīgi no partnera aitū ganāmpulka, tika atlasītas aitas un, veicot dzīvnieku pilnu klīnisko izmeklēšanu, tika noņemti fekālie paraugi no aitū resnās zarnas.

Paraugu iegūšanu veica sertificēts veterinārārsts, saimniecības īpašnieks kopā ar LBTU VMF pētniekiem rutīnas dzīvnieku izmeklēšanas laikā, kad plānveidā bija paredzēta parazitāro paraugu noņemšana parazitārās kontroles ietvaros. Koproloģiskais materiāls tika ievākts rektāli no dabiski invadētām aitām ar gremošanas sistēmas strongilīdiem

(Trichostrongylidae). Paraugi sagatavoti atbilstoši parauga transportēšanai ievietojot plastikāta iepakojumā, marķējot un uz laboratoriju Jelgavā, LLU VMF PVHI tika transportēti ar aukstumelementu, lai nodrošinātu +4°C temperatūru.

LBTU VMF PVHI Parazitoloģijas laboratorijā koproloģiskie paraugi tika izmeklēti pēc flotācijas metodes. Šobrīd ieteicamākā izmeklēšanas metode, kuru lieto plaši visā pasaulē ir MacMaster metode. Pēc MacMaster metodes var ne tikai diagnosticēt invāziju, bet arī noteikt invāzijas smaguma pakāpi.

Mikroskopiski identificēt strongilīdu olas ir tikpat kā neiespējami, jo morfoloģiski ir līdzīgas. Izņēmums ir *Nematodirus* spp., kuru parazitiskās olas ir divreiz lielākas izmēros par citām strongilīdu olām (skat. 7.attēls).



A

B

7.attēls. A – *Haemoncus contortus* ola; B – *Nematodirus* spp. ola gaismas mikroskopa attēlā (10x40 palielinājums).

Projekta IV fāze – parazitārā materiāla apstrāde, parazitū audzēšana un ekstraktu pārbaude *in-vitro*

Projekta ceturttā fāze risinājās LLU VMF PVHI parazitoloģijas laboratorijā laika posmā no 2020. gada janvāra līdz 2022. gada decembrim. Laboratoriskā *in vitro* izpēte tika veikta vairākos posmos.

Parazītu un to olu ieguve.

Katrs koproloģiskais paraugs tika izmeklēts pēc McMaster metodes (4 g fekālijas un 56 ml sāls šķīdums), lai noteiktu parazitū invāziju un tās pakāpi. Tādā veidā tika atlasīti paraugi, kurus tālāk izmantoja olu ieguvei – olu suspensijas pagatavošanai un kāpuru kultivēšanai. Olu ieguvei tika atlasīti paraugi ar invāzijas pakāpi vidēja līdz augsta (virs 500 olas/1 g fekāliju).

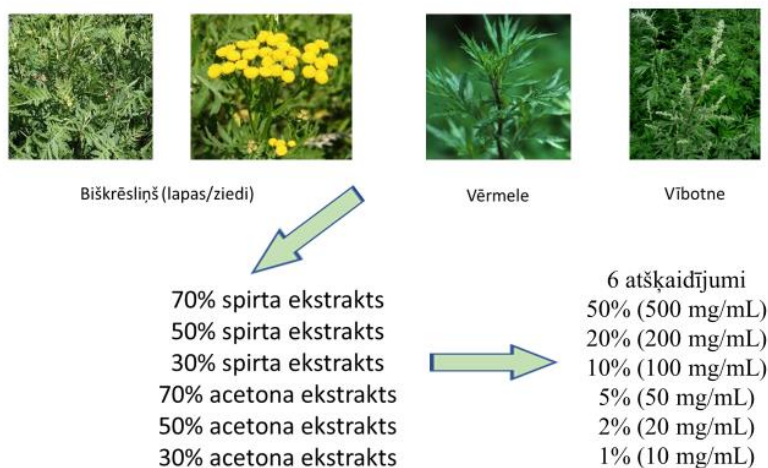
Lai pagatavotu olu suspensiju, 20 g aitu fekālijām tika pievienots 200 ml destilētā ūdens, ar pietas palīdzību fekālijas tika maisītas, kamēr veidojās homogenizēts šķidrums. Iegūtais šķidrums tika filtrēts caur četriem dažāda izmēra sietiem (1.- 1000 μm , 2.- 100 μm , 3.- 50 μm , 4. - 32 μm). Pēdējais siets tika skalots ar destilētu ūdeni, un nogulsnes tika ievāktas mērcilindrā. Iegūtais šķidrums tika ieliets sešos 40 ml stobros un tika centrifugēts 10 min 2000

rpm. Pēc centrifugēšanas tika nosūkts supernatants (šķidrums līdz nogulsnēm) un katrā stobrā tika pievienots 30 ml sāls šķidrums (NaCl, blīvums 1,018). Atkal tika veikta centrifugēšana 15 min 3000 rpm. Pēc centrifugēšanas supernatants tika filtrēts caur 32 µm sietu, nogulsnes sietā tika noskalotas ar destilētu ūdeni un ievāktas mērglāzē. Šis nogulsnes satur daudz parazitāras olas.

Sākotnēji kāpuru kultivēšana notika laboratoriskos apstākļos pēc standartizētās metodes - 40 g aitu fekālijas tika sajauktas ar vermikulītu un atstātas kultivēt istabas temperatūrā +23 °C. Katru dienu tās tika apsmidzinātas ar ūdeni, lai nodrošinātu nepieciešamo mitrumu. No olas līdz L3 stadijas kāpuram bija nepieciešamas 14 dienas. Pēc šī tika izmēģināta jauna metodika kāpuru kultivēšanai – mākslīgā barotne. Barotnes komponenti – bakterioloģiskais agars, kas kalpo kā pamatbāze platei, amfotericīns B – fungicīds, kas inhibē rauga sēnes, kas rodas kultivējot fekālijas ilgāku periodu un visbeidzot rauga ekstrakts, kura pagatavošana ir aprakstīta 4.posmā. Rauga ekstrakts nodrošina parazitāras kāpurus ar barības vielām un nodrošina nepieciešamo vidi to attīstībai. Kāpuri tika kultivēti termostatā +25°C. Šajā gadījumā kāpuru attīstība norit ātrāk, kontrolētos apstākļos (ir iespējams nodrošināt temperatūru un mitrumu) un nenovēro kāpuru nāvi.

Atšķaidījumu pagatavošana

Ekstraktu pretparazitārās aktivitātes noteikšanai *in vitro* no 36 ekstraktiem tika izmantoti 24 augu ekstrakti, kam ir atšķirīgs izmantotais augs, šķīdinātājs un koncentrācija. Katram ekstrakta veidam tika pagatavoti vēl seši atšķaidījumi (skat.8. attēls). Rezultātā, ir iegūti 144 augu ekstrakti.



8. attēls. Pētījumā izmantotie augu ekstrakti un to atšķaidījumi.

Ekstraktu atšķaidījumu gatavošana:

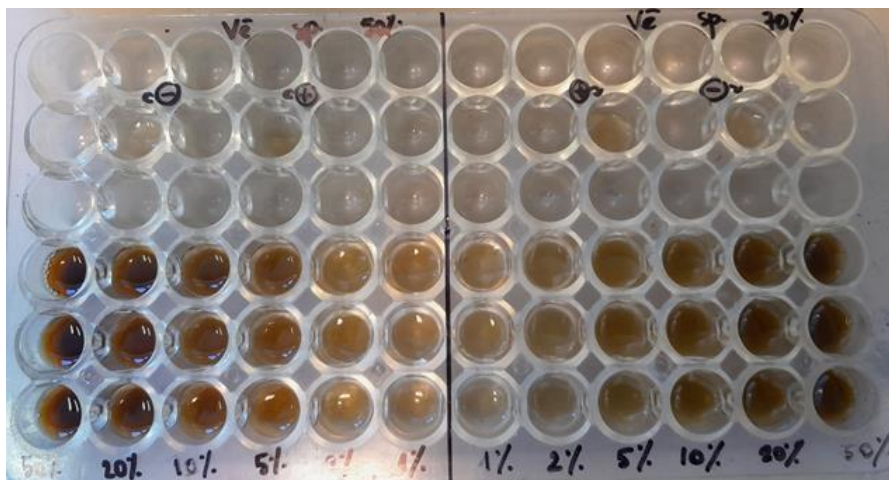
- 50% jeb 500 mg/mL (100 µl ekstrakts + 200µl destilēts ūdens)
- 20% jeb 200 mg/mL (100 µl ekstrakts + 500µl destilēts ūdens)
- 10% jeb 100 mg/mL (100 µl ekstrakts + 1000µl destilēts ūdens)

- 5% jeb 50 mg/mL (100 µl ekstrakts + 2000µl destilēts ūdens)
- 2% jeb 20 mg/mL (100 µl ekstrakts + 5000µl destilēts ūdens)
- 1% jeb 10 mg/mL (100 µl ekstrakts + 10000µl destilēts ūdens)

Ovocīdās darbības noteikšana - *Egg hatch test* (olu aizmešanās tests)

Šo testu pamatā izmanto, lai noteiktu benzimidazolu grupas medikamentu rezistenci. Pirmais, kas aprakstīja šo testu ir Le Jambre (1976), bet vēlāk tika ieviestas modifikācijas. Šobrīd tests ir veicams, balstoties uz Pasaules veterinārās parazitoloģijas attīstības asociāciju (WAAVP – World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) rekomendācijām, ko aprakstīja Coles et al., 1992. Šī testa princips – novērst olu embrionēšanos jeb aizkavē vai novērs L_1 stadijas kāpura veidošanos.

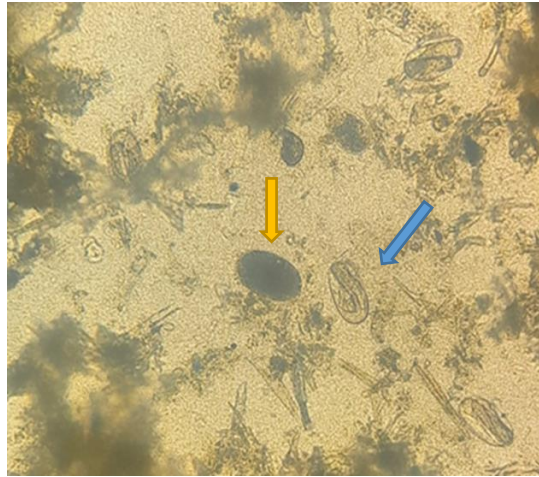
Apmēram 100 – 200 olas tika ievietotas katrā iedobē (no 72 iedobju plates), kopējais daudzums 350 µL. Parazītu olu ieguve aprakstīta 1. posmā. Tajā pašā iedobē tika pievienots 350 µL konkrētā ekstrakta (skat. 9. attēls). Katram ekstrakta veidam papildus tika izveidotas divas iedobes – pozitīvā (Ivermektīns “Biomectin 1%”) un negatīvā (destilētais ūdens) kontrole.



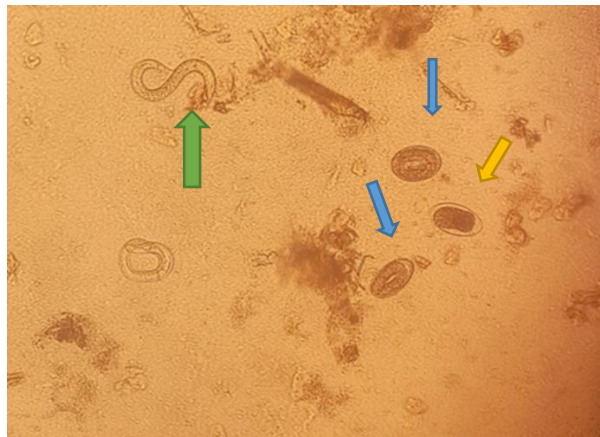
9. attēls. 72 iedobju plate ar aizpildītu vērmeles spirta 50% un vērmeles spirta 70% ekstraktiem

Katram ekstraktam tika veikti 3 atkārtojumi. Pēc plates sagatavošanas, tā tika ievietota termostatā +25°C 48 h. Pēc 48 h katrā iedobē tika iepilināts Lugola joda šķīdums, lai apstādinātu olu attīstību. Rezultātā tika izmeklēts katras iedobes saturs, skaitītas neembrionētas, embrionētas un L_1 stadijas kāpuri (skat. 10., 11., 12. attēls). Viena ekstrakta veida izmeklēšanai, piemēram, vērmeles 50% spirta ekstrakts, bija nepieciešamas 20 plates. Kopumā, lai noteiktu visu ekstraktu ovocīdo iedarbību, tika pielietotas un izmeklētas 480 plates.

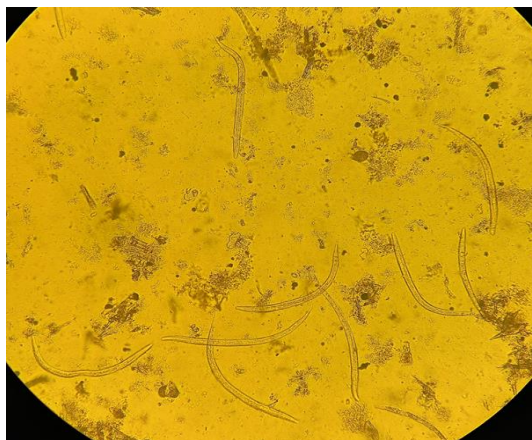
Vēlāk tika aprēķināti olu inhibēšanas %, balstoties uz formulu: $I_{olas} = 100 \times (1 - \frac{P_{ekstrakts}}{P_{negatīvā\ kontrole}})$, kur P = aizmetušās olas (embrionētās olas un L_1 stadijas kāpuri).



10. attēls. Neembrionēta ola (dzeltēna bulta) un embrionēta ola (zila bulta)



11. attēls. Neembrionēta ola (dzeltēna bulta), embrionētas olas (zilās bultas) un L₁ stadijas kāpurs (zaļa bulta)



12. attēls. Daudz L₁ attīstības kāpuri

Larvicīdās darbības noteikšana – *Larval development test* (kāpuru attīstības tests)

Šis tests pamatā ir piemērots benzimidazolas grupas medikamentu un levamizola rezistences noteikšanai. Tests nav objektīvs, izmantojot govju un cūku nematodes, bet ir piemērots aitām un zirgiem. Šī testa princips – inhibē L_3 stadijas kāpuru attīstību jeb neļauj veidoties L_3 stadijas kāpuram vai inhibē to kustības un apvalka maiņu.

The micro-agar larval development tests, tika veikts, balstoties uz Coles et al., 2006. Olu suspensijas ieguve aprakstīta 1.posmā. Pētījumam tiek izmantotas 72 iedobju plates. Katrā iedobē pievieno 150 μ L 2% agaru - Agar Bacteriological No. 1 (Oxoid™) 45°C temperatūra katrā platītē. Kad agars ir sacietējis, tad katrā iedobē pievieno 150 μ L olu suspensiju, kas satur apmēram 50 olas. Pirms olu suspensijas pievienošanas tā tika atšķaidīta ar Amfotericīnu B (Sigma - Aldrich®) (1:1). Pēc tam katrā iedobē tika pievienots 150 μ L rauga ekstrakts, kura pagatavošanu aprakstīja Hubert un Kerbouf, 1984 – 1 g rauga ekstrakts + 90 ml 0,85% NaCl, autoklāvē, tad ņem 27 ml pagatavoto šķidrumu un tam pievieno 3 ml 10x koncentrētu Earl's šķidrumu. Katram ekstrakta veidam papildus tika izveidotas divas iedobes – pozitīvā (Ivermektīns “Biomectin 1%”) un negatīvā (destilētais ūdens) kontrole. Katram ekstraktam tika veikti 3 atkārtojumi. Pēc iedobju iepildīšanas, tukšajās iedobēs pievieno destilētu ūdeni, lai novērstu testa iedobju izžūšanu. Sagatavota plate tika ievietota termostātā +25°C temperatūrā septiņas dienas. Pēc inkubēšanas testa iedobēs tika pievienots Lugola joda šķidrums, lai novērstu kāpuru attīstību. Rezultātā tika izmeklēts katras iedobes saturs, skaitītas olas (neembrionētas, embrionētas) un kāpuri (L_1 , L_2 un L_3 attīstības stadijas) (skat.13.,14. attēls). Viena ekstrakta veida izmeklēšanai, piemēram, vērmeles 50% spirta ekstrakts, bija nepieciešamas 20 plates. Kopumā, lai noteiktu visu ekstraktu larvicīdo iedarbību, tika pielietotas un izmeklētas 480 plates.



13. attēls. L_1 attīstības stadijas kāpuri



14. attēls. L₃ attīstības stadijas kāpurs

Vēlāk tika aprēķināti kāpuru inhibēšanas %, balstoties uz formulu: $I_{\text{kāpuri}} = 100 \times (L_1 + L_2 + \text{olas} / L_1 + L_2 + L_3 + \text{olas})$.

Datu statistiskā analīze

Inhibēšanās % tika aprēķināts ar programmu Microsoft Excel. Katra auga ekstrakta ovocīdais un larvicīdais efekts tika analizēts, izmantojot statistikas programmu STATA 17.0. Tika izmantota lineārā regresija (I_{olas} aprēķināšanai) un loģistiskā regresija ($I_{\text{kāpuri}} > 90\%$).

Projekta V fāze – materiāla apkopošana, publicitāte, semināra organizēšana

Projekta partneri RSU FF un LBTU VMF projekta laikā nodrošināja regulāru publicitāti par projekta gaitu, kā arī iegūtie rezultāti tika publicēti dažādās zinātniskās konferencēs un *Scopus/Web of Science* žurnālos. Noslēgumā visi iegūtie pētījuma dati tika apkopoti, apstrādāti, veikti statistiskie aprēķini un sagatavots nozares seminārs sadarbībā ar partneriem VIC un LAAA, kas ZOOM vidē tika organizēts kā attālināts seminārs Latvijas aitu audzētājiem un aitu veterinārārstiem 2023. gada 19. aprīlī.

REZULTĀTI

I Fāzes rezultāti

Projekta pirmajā fāzē tika ievāktas Latvijas florai raksturīgu ārstniecības augu viršu, vērmeles, vībotnes, biškrēsliņa un ozola mizas drogas, un tika pagatavoti augu ekstrakti (skat. 16-17 attēlus). Rezultātā iegūti 36 ekstrakti (skat. 15.attēls), kas safasēti flakonos pa 2 mL un sasaldēti -20°C



15. attēls. Sagatavotais ekstrakts flakonā.

II Fāzes rezultāti

Pēc ekstraktu sagatavošanas (16 -17.att.), RSU FF laboratorijā tika veikta augu drogu ūdens izvilkumiem ķīmiskās analīzes, nosakot procentuālais kopējais polifenolu un kopējais tanīnu (miecvielu) daudzumu pēc Eiropas Farmakopejas priekšrakstiem.



16. attēls. Augu ekstraktu sagatavošana ar kratītāju un nofiltrēti paraugi.

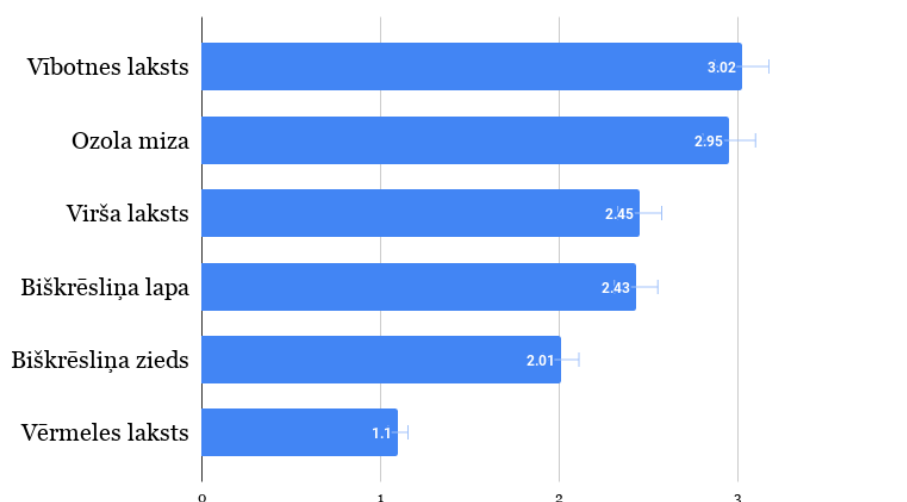


17. atēls. Augu ekstraktu pagatavošana ar rotācijas ietvaicētāju.

Analīžu rezultātā konstatēts, ka vībotnes lakstu ūdens izvilkums saturēja 3.02% (SD = ± 0.67) miecvielu, jeb tanīnu. Ozola mizas saturēja 2.95% (SD = ± 0.56) miecvielu, kas mazāk nekā ir minēts literatūrā. Virša lakstos un biškrēsliņa lapās bija līdzīgs daudzums ar miecvielām 2.45% (SD = ± 0.17) un 2.43% (SD = ± 0.37). Vismazāk miecvielu bija biškrēsliņa ziedos 2.01% (SD = ± 0.18) un vērmeles lakstos 1.10% (SD = ± 0.07). Tanīnu saturs drogās atspoguļots tabulā Nr.2

2.tabula. Tanīnu daudzums drogā %.

Tanīnu daudzums drogā %



Ar augstas precizitātes šķīdumu hromatogrāfijas palīdzību identificētas galluskābe un hlorogēnskābe augu drogās (tab.Nr.3). Gan galluskābe, gan hlorogēnskābe tika konstatēta biškrēsliņa ziedu, viršu lakstu un ozola mizas paraugos, tomēr biškrēsliņa lapu, vībotnes un vērmeles lakstos galluskābe netika konstatēta.

3.tabula .Identificētās atsevišķās fenolskābes augu paraugos.

Paraugs	Galluskābe	Ellagskābe	Hlorogēnskābe
Biškrēslīņa zieds	x	nd	x
Biškrēslīņa lapa	nd	nd	x
Virša laksts	x	nd	x
Ozola miza	x	nd	x
Vībotnes laksts	nd	nd	x
Vērmeles laksts	nd	nd	x

X – pozitīvs paraugs, nd – nav konstatēts



18. attēls. Paraugu sagataves polifenolu noteikšanai augu ekstraktos.

Tika noteikts kopējais polifenolu daudzums ekstraktos (skat. attēlu 18.). Tika salīdzinātas trīs dažādas koncentrācijas šķīdināji: 30%, 50%, 70% etilspirts un acetons. Katrai drogai labākais ekstrakcijas apjoms ir individuāli atkarīgs no šķīdinātāja (tab.4.).

4.tabula. Kopējā polifenolu, flavanoīdu un antiradikālā darbība.

Drogas paraugs	TPC (mg GAE/g liofilizēta ekstrakta wt), ±SD	TFC (mg QE/g liofilizēta ekstrakts wt), ±SD	IC ₅₀ vērtība DPPH antiradikālā darbība (µg/ml), ±SD
Askorbīnskābe	-	-	43.92 ± 1.15
<i>Vērmeles lakstu spirta ekstrakts</i>	68.22 ± 1.62	3.79 ± 0.43	509.33 ± 1.11

<i>Vībotnes lakstu spirta ekstrakts</i>	125.04 ± 6.06	15.25 ± 0.51	195.43 ± 1.12
<i>Virša spirta ekstrakts</i>	294.88 ± 14.20	51.13 ± 0.29	127.06 ± 1.07
<i>Ozola mizas spirta ekstrakts</i>	301.39 ± 10.17	5.11 ± 0.32	96.16 ± 1.03
<i>Biškrēsliņa ziedu spirta ekstrakts</i>	154.11 ± 7.95	25.12 ± 2.53	193.64 ± 1.10
<i>Biškrēsliņa lapu spirta ekstrakts</i>	158.48 ± 15.57	46.15 ± 0.29	185.35 ± 1.12
<i>Vērmeles lakstu acetona ekstrakts</i>	91.12 ± 1.09	5.26 ± 0.99	322.85 ± 1.13
<i>Vībotnes lakstu acetona ekstrakts</i>	179.21 ± 2.29	16.06 ± 0.53	164.44 ± 1.13
<i>Virša acetona ekstrakts</i>	285.61 ± 5.41	55.08 ± 2.23	104.71 ± 1.07
<i>Ozola mizas acetona ekstrakts</i>	316.02 ± 21.54	6.20 ± 0.22	83.95 ± 1.04
<i>Biškrēsliņa ziedu acetona ekstrakts</i>	155.38 ± 3.17	29.69 ± 0.02	181.97 ± 1.07
<i>Biškrēsliņa lapu acetona ekstrakts</i>	225.99 ± 3.69	52.75 ± 2.37	146.55 ± 1.05

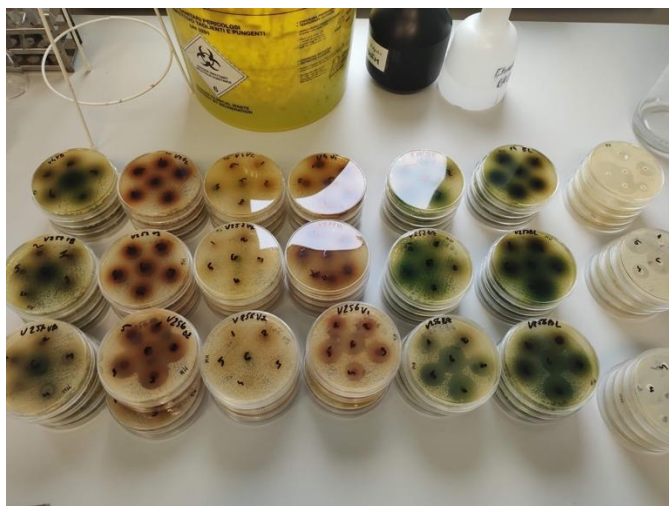
TPC: kopējais fenolu daudzums; TFC: kopējais flavonoīdu daudzums; GAE: Galluskābes ekvivalents; QE: Kvercetinā ekvivalents; wt: svars; DPPH: DPPH tests antiradikālās efektivitātes noteikšanai; SD- standartnovirze.

Ekstraktiem, kas iegūti ar koncentrāciju 50% etilspirta un 50% acetona tika noteikts arī polifenolu, flavonoīdu un antiradikālā darbība. Antiradikālā aktivitāte un kopējais fenolu daudzums visvairāk ir ozolam un virsim, taču flavonoīdu daudzums ozola mizā ir ļoti maz, jo miecvielas ir tās, kas dod augsto rezultātu fenolu un antiradikālās aktivitātes testā. Ja salīdzina vidējās vērtības visiem ekstraktiem, tad acetona ekstraktiem novēro nedaudz vairāk polifenolu un flavonoīdu un ir labāka antiradikālā aktivitāte ($r=-.986$, $p<0.01$). Pastāv korelācija starp kopējo fenola tipa savienojuma daudzumu un antiradikālo darbību acetona un spirta ekstraktiem ($R=1.00$, $p<0.01$), bet ne flavonoīdu daudzumu $p=0.468$ acetona, $p=0.397$ spirta ekstraktiem. Jāatzīmē, ka flavonoīdi nav tie, kas dod antiradikālo efektu, bet citi fenola tipa savienojumi, piemēram, miecvielas. Ozola un virša novārtījumos ir daudz miecvielu 2,45-

2.95%. Vībotnē arī novēro daudz miccvielu 3.02%, bet citus veidus. Antioksidantu aktivitātē ir būtiska atveseļošanās procesā (Puertllano et.al., 2011).

Papildus projekta uzdevumiem tika noteikta arī ekstraktu iedarbība uz govs mastītu izraisītājiem (skat. attēlu 19). Lai noteiktu antibakteriālo jutību un minimālo ekstrakta inhibējošo koncentrāciju, tika izmantoti *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus* klīniskie izolāti un *S. aureus* un *E. coli* references kultūras. Govju mastītu patogēni un to references kultūras:: *Escherichia coli* (ID. V-2019-4), *E. coli* (ID. V-2019-252), *E. coli* (ATCC 25922), *Streptococcus agalactiae* (ID. V-2019-171), *S. uberis* (ID. V-2019-243), *Serratia liquefaciens* (ID. V-2019-251), *Staphylococcus au-reus* (ID. V-2019-256), *S. aureus* (ATCC 25923).

Gan biškrēsliņu lapu, gan ziedu ekstrakts uzrādīja spēcīgāko antibakteriālo aktivitāti pret *S. aureus* celmiem. Biškrēsliņu ziedu 70% etanola ekstrakta MIC un MBC vērtības bija zemākas nekā lapu 70% etanola ekstraktam (MIC 3,4 mg/mL, MBC 3,4-6,8 mg/mL un MIC 15,7-31,4 mg/mL, MBC 62,9-125,9 mg/mL, attiecīgi). Biškrēsliņu ziedu ekstrakti uzrādīja aktivitāti pret *E. coli* (MIC 53,9 mg/mL, MBC 53,9-107,8 mg/mL), bet biškrēsliņu lapu ekstraktiem nebija ietekmes pret *E. coli*. Biškrēsliņu ekstraktiem bija minimāla antibakteriāla iedarbība pret *Streptococcus* celmiem (MIC bija 31,4-62,9 mg/ml, bet MBC 53,9-125,9 mg/ml) un *Serratia liquefaciens* (MIC un MBC 125,9 mg/mL). Biškrēsliņu ziedu ekstrakts minimāli kavēja *Streptococcus. agalactiae* augšanu (MIC un MBC 53,9 mg/mL), bet lapu ekstraktam bija minimāla iedarbība pret *Streptococcus uberis* (MIC 62,9 mg/mL un MBC 125,9 mg/mL) un *Serratia liquefaciens* (MIC un MBC 125,9). Lai gan ziedu ekstraktos bija lielāks polifenolu saturs nekā lapu ekstraktos (TPC bija 62-78 mg/1g sausa augs ziediem un 21-29 mg/1g sausa augs lapām), tas neietekmēja antibakteriālo iedarbību. Biškrēsliņu ziedu un lapu 70% etanola ekstraktus var kombinēt kopā, lai iegūtu plašāku un labāku antibakteriālo efektu.



19. attēls. Antibakteriālās aktivitātes noteikšana ar disku metodi.

III fāzes rezultāti.

Laika posmā no 2020. gada janvāra līdz 2021. gada decembrim vairākkārtīgi SIA "Mikaitas" atbildīgais veterinārārsts veica saimniecībā esošo aitu klīnisko izmeklēšanu, aitu atlasī, un kopā ar LBTU VMF pētniekiem tika noņemti koproloģiskie paraugi no aitu resnās zarnas. Paraugi tika sagatavoti atbilstoši parauga transportēšanai ievietojot plastikāta iepakojumā, marķējot un konteinerā ar temperatūru līdz +4⁰ C temperatūrā nogādāti Jelgavā, LLU VMF PVHI.

IV fāzes rezultāti.

SIA "Mikaitas" atbildīgā veterinārārsta iesūtītie paraugi tika izmeklēti LLU VMF PVHI Parazitoloģijas laboratorijā. No paraugiem tika izdalītas parazitū olas. Pētījuma ovocīdās iedarbības noteikšanai tika izmantotas paraugos atrastās olas, bet, lai veikti pētījumus larvacīdās ietekmes noteikšanai olas tika kultivētas specializēti pagatavotās barotnēs (agars, amfotericīns B, rauga ekstrakts), kas nodrošina kāpuru ātrāku attīstību līdz L₃ stadijai un nodrošina kāpuriem piemērotu vidi un barības vielas. Kā rezultātā specializētās barotnēs parazitū kāpuri L₃ stadiju sasniedz septiņās dienās, bet kultivējot parazitū kāpurus standartizētā veidā (imitējot dabisko parazitū vidi), to attīstība notiek 14 dienās.

Izvērtējot iegūto ekstraktu sagatavošanas un izstrādes izvērtējumu, tālākai ovocīdai un larvacīdai ekstrakta ietekmes izvērtēšanai tika izmantoti biškrēsliņa lapu un ziedu 30%, 50% un 70 % spirta un acetona šķīdinātāja ekstrakti (kopā 12 ekstrakti), vībotnes lakstu un vērmes lakstu 30%, 50% un 70 % spirta un acetona šķīdinātāja ekstrakti (kopā 12 ekstrakti), un katrs ekstrakts tika atšķaidīts izmantojot koncentrācijas: 500 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 20 mg/ml un 10 mg/ml, tātad no viena ekstrakta iegūstot sešas koncentrācijas, kā arī pozitīvo un negatīvo kontroli.

Visi iepriekš minētie augi ir vienas dzimtas – Kurvjziežu (Asteracea) un tiem visiem literatūrā ir aprakstīta pretparazitārā iedarbība. Tas saistīts ar tajos esošajiem augu sekundārajiem metabolītiem. Kopumā ir trīs galvenās augu sekundāro metabolītu grupas – terpēni, fenoli un slāpekli saturošu vielu grupas. To daudzumu augā ietekmē dažādi faktori, piemēram, klimats, auga daļa, augsne. To daudzums izmainās arī ekstrakta pagatavošanas laikā, īpaši no pielietotā šķīdinātāja veida. Šajā gadījumā tika izmantoti divi šķīdinātāji – spirts un acetons. Tie tiek plaši izmantoti arī citos līdzīgos pētījumos, jo to iedarbības rezultātā var ekstrahēt fenolu grupas aktīvās vielas. Tieši fenoli ir tās aktīvās vielas, kas nodrošina augu pretparazitāro iedarbību. Šajā pētījumā tika noteikta ekstrakta iedarbība uz Trichostrongylidae olām un kāpuriem.

Ekstraktu ovocīdā iedarbība

Analizējot iegūtos datus par augu ekstraktu ovocīdo iedarbību tika konstatēts, ka tiem ekstraktiem, kur drogu ekstraktu sagatavošanā kā šķīdinātājs tika izmantots acetons, ir izteiktāka iedarbība uz parazitū olām. Arī literatūrā tiek aprakstīta augu sekundāro metabolītu spēcīgāka ovocīdā iedarbība acetona ekstraktos. Kā redzams mūsu pētījumā, kopējo fenolu un flavonoīdu daudzums būtiski atšķiras acetona un spirta ekstraktos (tab.Nr.4) Tas nozīmē to, ka acetons spēj ekstrahēt vairāk aktīvās vielas no augiem nekā spirts. Fenoli ierosina olu apvalku caurlaidības izmaiņas, inhibē embrionēšanās enzīmus olās un spēj iedarboties uz

embrionēšanās receptoriem olu apvalkā (Vargas-Magana et al., 2014), kas izskaidro zemāk aprakstītos rezultātus.

Visiem izmeklētajiem ekstraktu paraugiem ir novērojama dažādas pakāpes ovocīdā iedarbība uz gremošanas sistēmas strongilīdiem (tab. Nr. 5.-8.). Tabulās ar sarkanu iekrāsoti ekstraktu rezultāti, kuriem efektivitāte ir ļoti augsta (90-100%) un ar dzeltenu krāsu – ekstraktu rezultāti ar efektivitāti augsta (80-90%).

Biškrēsliņa lapu un ziedu ekstraktu iedarbība

Biškrēsliņa lapu un ziedu ekstraktu ovocīdā iedarbība atspoguļota 5. un 6. tabulā.

Ja salīdzina atsevišķi augu daļas – lapas un ziedi, tas ir būtisks faktors, kas ietekmē pretparazitāro iedarbību. Lapu ekstraktiem ir spēcīgāka ovocīdā iedarbība nekā ziedu ekstraktiem. Ja augu daļu apskata kopā ar citiem faktoriem (piemēram, šķīdinātājs, koncentrācija), tad tā būtiski samazinās. Līdzīga situācija ir saistībā ar šķīdinātāju - ekstraktos, kur izmantots acetons kā šķīdinātājs, efektivitāte ir augstāka nekā spirtam. Savukārt vislabākie kopējie rezultāti ir lapu spirta ekstraktiem. Izteikti labāki rezultāti ir 50% ekstraktiem.

Vislabākie olu inhibēšanas rezultāti ir 50% acetona lapu 200 mg/mL atšķaidījuma (96%), 50% spirta lapu 500 mg/mL atšķaidījuma (93%) un 50% acetona lapu 500 mg/mL atšķaidījuma (92%) ekstraktiem. Savukārt viszemākie rezultāti ir biškrēsliņa ziedu 70% acetona visiem atšķaidījumiem.

5.tabula. Biškrēsliņa lapu ekstraktu olu inhibēšanas %.

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMI (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 30%	89	76	62	51	5	0
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 50%	93	90	28	48	58	37
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 70%	44	45	56	30	4	0
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 30%	0	0	82	40	61	53
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 50%	92	96	80	73	67	9
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 70%	91	82	88	39	52	64

6.tabula. Biškrēsliņa ziedu ekstraktu olu inhibēšanas %.

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 30%	17	0	27	51	0	0
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 50%	78	43	68	74	0	82
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 70%	57	38	43	0	16	46
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 30%	34	53	0	43	0	0
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 50%	92	70	84	75	52	7
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 70%	19	0	0	0	0	0

Vērmeles ekstraktu iedarbība

Izvērtējot vērmeles lakstu acetona un spirta ekstraktus, jāatzīmē, ka šajā gadījumā šķīdinātājs ir būtisks faktors – acetona ekstraktiem ir labāki rezultāti nekā spirta ekstraktiem (tabula.7.).

Vislabākie olu inhibēšanas rezultāti ir 30% spirta 500 mg/mL atšķaidījuma (100%), 30% acetona 10 mg/mL atšķaidījuma (98%) un 50% acetona 500 mg/mL atšķaidījuma (98%) ekstraktiem. Savukārt viszemākie rezultāti ir 70% vērmeles acetona visiem atšķaidījumiem.

7.tabula. Vērmeles ekstraktu olu inhibēšanas %

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
VĒRMELES SPIRTS 30%	100	80	58	53	46	76
VĒRMELES SPIRTS 50%	86	72	73	71	60	67
VĒRMELES SPIRTS 70%	83	88	76	67	68	74
VĒRMELES ACETONS 30%	94	47	95	87	92	98
VĒRMELES ACETONS 50%	98	97	95	87	71	95
VĒRMELES ACETONS 70%	4	0	11	0	0	0

Vībotnes ekstraktu iedarbība

Ja salīdzina vībotnes ekstraktu rezultātus ar biškrēsliņa un vērmeles rezultātiem, tad šajā gadījumā, ir novērojama krietni zemāka ovocīdā iedarbība pret Trichostrongylidae (8. tabula).

Visaugstākā olu inhibēšana ir tikai 50% acetona 500 mg/mL atšķaidījuma ekstraktam (93%). Pārējiem ekstrakta veidiem ir krietni zemāki rezultāti, kas liecina par to, ka vībotnes ekstraktiem ir vāja iedarbība uz parazitā olām.

8.tabula. Vībotnes ekstraktu olu inhibēšanas %

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
VĪBOTNES SPIRTS 30%	0	36	54	22	0	0
VĪBOTNES SPIRTS 50%	66	21	3	18	1	0
VĪBOTNES SPIRTS 70%	9	1	1	12	0	4
VĪBOTNES ACETONS 30%	81	72	54	35	33	39
VĪBOTNES ACETONS 50%	93	74	77	71	55	50
VĪBOTNES ACETONS 70%						

Ekstraktu larvicīdā iedarbība

Analizējot iegūtos rezultātus par ekstraktu iedarbību uz kāpuriem, tika secināts, ka arī šajā gadījumā ir nozīmīgs ekstrakta šķīdinātājs, jo acetona ekstrakti uzrādīja labākus rezultātus. Kopumā *in-vitro* pētījumi parādīja, ka visiem augu ekstraktiem piemīt larvicīdā iedarbība, un tā ir būtiski labāka nekā ovocīdā (skat. tab. Nr. 9.-12.). Tas sakrīt ar literatūru, jo ir atrodama vairāk informācija par augu sekundāro metabolītu ietekmi uz kāpuriem vai parazitāru pieaugušām stadijām un ir izskaidroti mehānismi kā tas notiek. Īpaši plaši ir aprakstīta tannīnu iedarbība uz kāpuriem – tie veido kompleksus ar parazitāru kutikulas un gremošanas trakta proteīniem, tādā veidā rada kustību un barošanās traucējumus parazitāriem (Zajickova et al., 2020; Rodriguez-Hernandez et al., 2023; Hoste et al., 2006). Mūsu iegūtie rezultāti parāda, ka tannīnu daudzums ekstraktā ir būtisks faktors pretparazitārajai efektivitātei, jo vērmes ekstraktiem novēroja zemāku kopējo tannīnu daudzumu un larvacīdo iedarbību.

Tabulās ar sarkanu iekrāsoti ekstraktu rezultāti, kuriem efektivitāte ir ļoti augsta (90-100%) un ar dzeltenu krāsu – ekstraktu rezultāti ar efektivitāti augsta (80-90%).

Biškrēsliņa lapu un ziedu iedarbība

Izvērtējot biškrēsliņa lapu un ziedu acetona un spirta ekstraktu larvacīdo ietekmi, jāatzīmē, ka līdzīgi kā ovocīdai darbībai arī šajā gadījumā spēcīgāka larvicīdā iedarbība ir lapu, nekā ziedu ekstraktiem (9.tabula). Ir novērojamas atšķirības atkarībā no ekstrakta šķīdinātājā koncentrācijas, proti, 30% ekstraktiem ir labāki rezultāti nekā 50% vai 70% ekstraktiem.

Lielākajai daļai ekstraktu ir līdzīgi rezultāti, un tie ir 100%. Savukārt zemākais inhibēšanas % ir 30% biškrēsliņa ziedu acetona ekstraktam, īpaši 50 mg/mL atšķaidījumam (33%).

9.tabula. Biškrēsliņa lapu ekstraktu kāpuru inhibēšanas %.

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 30%	100	100	100	100	96	86
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 50%	100	100	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 70%	100	100	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 30%	100	-	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 50%	100	100	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 70%	100	100	100	100	100	100

10.tabula. Bišķrēslīņa ziedu ekstraktu kāpuru inhibēšanas %

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 30%	-	-	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 50%	100	100	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA SPIRTS 70%	100	100	100	100	100	100
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 30%	-	100	89	33	82	78
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 50%	100	100	100	100	100	94
BIŠKRĒSLIŅA ACETONS 70%	100	100	100	100	100	97

Vērmeles ekstraktu iedarbība

Kas attiecās uz vērmeles ekstraktu ietekmi, spēcīgāka larvicīdā iedarbība ir vērmeles acetona ekstraktiem nekā spirta ekstraktiem. Pētījumā tika konstatēts, ka 13 acetona ekstraktiem no 18 bija vērojama 100% efektivitāte, savukārt spirta ekstraktiem 100% - tikai 6 ekstraktiem. Viszemākais inhibēšanas % ir 30% spirta 20 mg/mL atšķaidījuma (23%) un 50 mg/mL atšķaidījuma (30%) ekstraktiem.

11.tabula. Vērmeles ekstraktu kāpuru inhibēšanas %

EKSTRAKTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
VĒRMELES SPIRTS 30%	100	100	100	30	23	26
VĒRMELES SPIRTS 50%	100	99	97	94	68	57
VĒRMELES SPIRTS 70%	79	100	98	96	100	77
VĒRMELES ACETONS 30%	100	100	100	100	100	100
VĒRMELES ACETONS 50%	100	100	100	100	89	100
VĒRMELES ACETONS 70%	98	100	100	68	57	38

Vībotnes ekstraktu iedarbība

No 36 vībotnes ekstraktiem gandrīz visiem – 26 dažādiem ekstraktiem kāpuru inhibēšanas % ir 100%. Tas liecina par to, ka vībotnes ekstraktiem piemīt spēcīga larvicīda iedarbība pret *Trichostrongylidea* kāpuriem. Viszemākais inhibēšanas % ir 70% spirta 10 mg/mL atšķaidījuma (75%) un 30% spirta 10 mg/mL atšķaidījuma (92%) ekstraktam.

12.tabula. Vībotnes ekstraktu kāpuru inhibēšanas %

EKSTRAKSTS	EKSTRAKTA ATŠĶAIDĪJUMS (mg/ml)					
	500	200	100	50	20	10
VĪBOTNES SPIRTS 30%	100	100	100	98	92	92
VĪBOTNES SPIRTS 50%	100	100	100	96	94	99
VĪBOTNES SPIRTS 70%	100	100	100	100	98	75
VĪBOTNES ACETONS 30%	100	100	100	100	100	97
VĪBOTNES ACETONS 50%	100	100	97	100	100	100
VĪBOTNES ACETONS 70%	100	100	100	100	100	100

Apkopojot visus iegūtos rezultātus par pētījumā izvēlēto augu acetona un spirta ekstraktu pretparazitāro ietekmi, jāatzīmē, ka secinājām, ka 50% biškrēsliņa lapu ekstrakti uzrādīja vislabāko ovocīdo iedarbību un larvicīdo iedarbību. Tāpēc nākotnē plānots šo pētījumu turpināt, lai analizētu šo augu pretparazitāro ietekmi in-vivo – aitu organismā.

IV fāzes rezultāti

Projekta laikā sadarbojoties visiem projektā iesaistītiem partneriem: LBTU VMF, RSU FF, SIA "Mikaitas", LAAC un SIA "Veterinārmedicīnas Izglītības centrs", tika sagatavoti:

• trīs publiski publicitātes raksti, kas publicēti LLU (LBTU) mājas lapā (LBTU.lv) un Lauku tīkls (laukutikls.lv) (Pielikums Nr. 1-3):

- Ārstniecības augu ekstraktus saturoša pretparazitārā fitolīdzekļa izstrāde. <https://laukutikls.lv/arstniecibas-augu-ekstraktus-saturosa-pretparazitara-fitolidzekla-izstrade> (pielikums Nr.1.)
- 26.05.2020: Attīsta jaunu pretparazitāro fitolīdzekli lauksaimniecības dzīvniekiem (<https://www.llu.lv/lv/raksts/2020-05-26/attista-jaunu-pretparazitaro-fitolidzekli-lauksaimniecibas-dzivniekiem>) (Pielikums Nr.2.).
- 11.10.2021: Turpinās pretparazitārā fitolīdzekļa izstrāde (<https://www.llu.lv/lv/raksts/2021-10-11/turpinas-pretparazitara-fitolidzekla-izstrade>) (Pielikums Nr.3.)

• Projekta ietvaros izstrādāta infografika, kas paredzēta Latvijas aitu audzētājiem un nozarei (Pielikums Nr.4.).

• Projektā iegūtie zinātniskie dati apkopoti un publicēti vairākās Latvijas un Starptautiskās zinātniskās farmācijas un Veterinārmedicīnas nozares vadošajās konferencēs, kur iesniegti darba abstrakti, postera prezentācijas, kas tālāk publicētas konferences izdales materiālos.

- Renāte Šukele, Dace Bandere, Rudīte Koka, Pāvels Sudmalis “Factors effecting hydrolysable tannin solvent extraction” RSU starptautiskā konference 2019 (Pielikums Nr. 5).
- Renāte Šukele, Ingus Skadiņš, Inga Sīle, Rudīte Koka, Dace Bandere (2020). Tanīnu daudzuma salīdzinājums Latvijā izplatītos augos, “Farmācijas studentu sasniegumi pētniecībā un aktuāla valsts institūciju informācija farmācijas speciālistiem” Latvijas Farmaceitu biedrība. 2020. gada 24. Janvāris. Zinātņu māja, Latvijas Universitātes Akadēmiskais centrs (Pielikums Nr. 6).
- Renāte Šukele, Dace Bandere, Rudīte Koka (2021). Quantitative analysis of tannins in some herbs of Latvian flora. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences «Knowledge for Use in Practice» oral presentation 24 – 26 March, 2021, Riga, Latvia (Pielikums Nr. 7).
- Renāte Šukele, Ingus Skadiņš, Inga Sīle, Rudīte Koka, Dace Bandere (2022). Polyphenolic compounds, antibacterial and antioxidant properties of flower and leaf extracts of *Tanacetum vulgare*, 2nd Drug Discovery Conference, Riga, September 22–24, 2022. OSI conference: <https://drugdiscovery.osi.lv/abstract-book-???> [Atsaučenav eakstā](https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC-Abstract-Book.pdf) PO49 <https://drugdiscovery.osi.lv/content/files/DDC-Abstract-Book.pdf>. (Pielikums Nr. 8).
- Alīna Kļaviņa, Dace Keidāne, Kristīne Ganola, Līga Kovaļčuka - Ovicidal activity of ethanolic and acetone extracts of leaves and flowers of *Tanacetum vulgare* L. Against gastrointestinal nematodes of sheep - stenda referāts (15th International Congress of Parasitology ICOPA 2022, Copenhagen, Denmark, 21.-26.08.2022) (Pielikums Nr. 9).
- Alīna Kļaviņa - "Fitoterapija - instruments antiparazitārās rezistences mazināšanai aitām" - mutiska prezentācija (Konference -

- Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes 2022, Jelgava, Latvija, 02.12.2022) (Pielikums Nr. 10).
- Alīna Kļaviņa, Dace Keidāne, Kristīne Ganola, Līga Kovaļčuka – In - vitro anthelmintic activity of the *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia vulgaris* L. extracts against Trichostrongylidae nematodes in sheep – stenda referāts (10th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology 2023, Tartu, Igaunija, 05.06.-07.06.2023) (Pielikums Nr. 11).
 - Renāte Teterovska, Dace Bandere, Rudīte Koka, Ingus Skadiņš, Līga Lauberte, Līga Kovaļčuka. Antibacterial and antioxidant activities of extracts of plants growing in Latvia and their potential use in veterinary medicine. V Pasaules latviešu zinātnieku kongresam “Zinātne Latvijai” 27-29.06.2023 (Pielikums Nr. 12).
- Zinātniskie dati publicēti anonīmi recenzētos starptautiskos žurnālos, kas indeksēti Scopus/Web of Science datubāzēs un novērtēti, kā Q1 ranka žurnāli:
 - Kļaviņa, A., Keidāne, D., Šukele, R., Bandere, D., Kovaļčuka, L. (2021) Traditional Latvian herbal medicinal plants used to treat parasite infections of small ruminants: A review. *Vet World*. Jun; 14(6): 1548–1558. Published online 2021 Jun 17. doi: 10.14202/vetworld.2021.1548-1558 (Pielikums Nr. 13).
 - Šukele, R., Bārzdiņa, A., Koka, R., Skadins, I., Lauberte, L., Brangule, A., Kovalcuka, L., Bandere, D. (2023) Antibacterial Activity of *Tanacetum vulgare* L. Extracts against Clinical Isolates of Bovine Mastitis *Applied Sciences (Switzerland) Open Access* Volume 13, Issue 5, 3369. doi: 10.3390/app13053369 (Pielikums Nr. 14).
 - Kļaviņa, A., Keidāne D., Ganola K., Lūsis I., Šukele R., Bandere D., Kovalcuka L. (2023) Anthelmintic Activity of *Tanacetum vulgare* L. (Leaf and Flower) Extracts against Trichostrongylidae Nematodes in Sheep In Vitro. *Animals* 2023, 13, 2176. doi.org/10.3390/ani13132176 (Pielikums Nr. 15).
 - Projekta noslēgumā LAAS un VIC, sadarbībā ar visiem partneriem, organizēja Latvijas aitu audzētājiem un aitu veterinārārstiem semināru. Seminārs tika rīkots ZOOM platformā, pieejams interesentiem bez maksas. Semināram kopumā pieteicās 200 dalībnieku. Publiskai pieejai. Semināra programma pielikumā Nr.16

PĒTĪJUMĀ SASNIEGTIE MĒRĶI

Projekta norise bija atbilstoša plānam.

Projekta galvenais mērķis: izstrādāt jaunus, inovatīvus fitopreperātus, kas iegūti no Latvijas florai raksturīgo augu ekstraktiem lauksaimniecības praksē biežāk sastopamo atgremotājdzīvnieku gremošanas sistēmā parazitējošo Trichostrongylidae dzimtas parazītu kontrolei, tika paveikts.

Projekta laikā RSU FF izvērtēja vībotnes lakstu, ozola mizas, virša lakstu, biškrēsliņa ziedu un lapu un vērmeļu lakstu drogu ekstraktu ķīmisko sastāvu, nosakot procentuālo kopējo polifenolu un kopējo tanīnu (miecvielu) daudzumu pēc Eiropas Farmakopejas priekšrakstiem.

Tālākā projekta gaitā tika atlasīti vīgriezies un vībotnes lakstu un biškrēsliņa ziedu un lapu drogu ekstrakti, kuriem *in-vitro* noteikta antiparazitārā iedarbība.

Projekta laikā veiksmīgi noritēja sadarbība ar lauksaimniecības organizācijām, dzīvnieku audzētājiem un starpnozaru pētniekiem, un pētījuma rezultāti gan publicēti zinātniskās, praktiskās konferencēs, gan publicēti dati Q1 ranka starptautiskos citētos zinātniskos žurnālos, gan arī prezentēti plaši apmeklētā aitu audzētāju un aitu veterinārārstu seminārā.

SECINĀJUMI

1. Visvairāk tannīnu tika konstatēts vībotnes lakstu un ozlola mizas ekstraktos, bet vismazāk miecvielu bija biškrēsliņa ziedos un vērmes lakstos.
2. Acetona ekstraktiem novēro nedaudz vairāk polifenolu un flanoīdu un ir labāka antiradikālā aktivitāte.
3. Ekstraktiem, kur drogu ekstraktu sagatavošanā kā šķīdinātājs tika izmantots acetons, ir izteiktāka iedarbībai uz parazitā olām
4. Vislabākie olu inhibēšanas rezultāti ir 50% biškrēsliņa lapu acetona 200 mg/mL atšķaidījuma (96%), 50% lapu spirta 500 mg/mL atšķaidījuma (93%) un 50% lapu acetona 500 mg/mL atšķaidījuma (92%) ekstraktiem. Savukārt viszemākie rezultāti ir biškrēsliņa ziedu 70% acetona visiem atšķaidījumiem.
5. Kopumā *in-vitro* visiem augu ekstraktiem piemīt larvicīdā iedarbība, un tā ir būtiski labāka nekā ovocīdā.
6. Tannīnu daudzums ekstraktā ir būtisks faktors pretparazitārajai efektivitātei, jo vērmes ekstraktiem novēroja zemāku kopējo tannīnu daudzumu un larvacīdo iedarbību.
7. 50% biškrēsliņa lapu ekstrakti uzrādīja vislabāko ovocīdo iedarbību un larvacīdo iedarbību. Tāpēc nākotnē plānots šo pētījumu turpināt, lai analizētu šo augu pretparazitāro ietekmi in-vivo – aitu organismā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Behrend, A., Hohe, A. (2016) Inheritance of the 'Bud Bloomer' trait in *Calluna vulgaris*. *Acta Hort.* 1127, 251-258.
2. Beleck, A., Kupčinskas T., Stalalienė I., Höglund J., Thamsborg M.S., Stuen S., Petkevičius S. (2021) Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Vet. Scand.* 63, 1-7.
3. Bowman, D.D. (2008) *Georgis Parasitology for Veterinarians 10th edition*. Missouri: Elsevier. 1-499.
4. Coles, C.G., Bauer, C., Borgsteede, M.H.F., Geerts, S., Klei, R.T., Taylor, A.M., Waller, J.P. (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
5. Coles, C.G., Jackson, F., Pomroy, E.W., Prichard, K.R., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, A.M., Vercruysse, J. (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
6. Dehuri, M., Palai, S., Mohanty, B., Malangmei, L. (2021). Anti-helminthic Activity of Plant Extracts against Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants - A Review. *Manaswini Pharmacogn Rev.* 15(30):117-127
7. Delerue, F., Gonzalez, M., Achat, D.L., Puzos, L., Augusto, L. (2018) Competition along productivity gradients: News from heathlands. *Oecologia.* 187, 219–231.
8. Deryabin, D. G., Tolmacheva, A. A. (2015) Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from quercus cortex (Oak bark) extract. *Molecules.* 20(9), 17093–17108.
9. Devrnja, N., Anđelković, B., Arandelović, S., Radulović, S., Soković, M., Krstić-Milošević, D., Ristić, M., Čalić, D. (2017) Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South African J. Bot.*, 111, 212–221.
10. EDQM (2013) *European Pharmacopoeia 8th ed.* Strasbourg: Council of Europe.
11. Eniņa, V. (2017) *Veselība pie mājas sliedzņa 100 populārākie ārstniecības augi Latvijā*. Rīga: Zvaigzne ABC. 1-264.
12. European Medicines Agency (2010) *Community herbal monograph on Quercus robur L., Quercus petraea.(Matt.) Liebl., Quercus pubescens Willd., cortex*. United Kingdom: London.
13. European Medicines Agency (2016) *Assessment report on Artemisia absinthium L., herba*. United Kingdom: London.
14. Ghedira, K., Goetz, P. (2013) Bruyère commune: *Calluna vulgaris* (L.) Hull ou *Calluna vulgáris* Salisb. (Ericaceae). *Phytotherapie.* 11, 52–55.
15. Hany, M., Elsheikha, N.A.K. (2011) *Essentials of Veterinary Parasitology*. Caizer Academic Press., 1- 232.
16. Hubert, J., Kerboeuf, D. A. (1984) New Method for Culture of Larvae Used in Diagnosis of Ruminant Gastrointestinal Strongylosis: Comparison with Fecal Culture. *Can. J. Comp. Med.* 48, 63–71.
17. Hoste, H., Jackson, F., Anthanasiadou, S., Thamsborg, M.S., Hoskin, O.S. (2006) The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261
18. Jalal ,F.A.M., Read, D.J., Haslam, E (1982) Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry.* 21, 1397-1401.

19. Kähkönen, P.M., Hopia, I.A., Vuorela, J.H., Jussi-Pekka, R., Pihlaja, K., Kujala, S.T., Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J.Agric.Food Chem.* 47, 3954-3962.
20. Kaplan, R.M. 2013. Recommendations for control of gastrointestinal nematode parasites in small ruminants: These ain't your father's parasites. *The Bovine Practitioner*. Vol. 47, No. 2. p. 97–109.
21. Kardel, M., Taube, F., Schulz, H., Schutze, W., Gierus, M. (2013) Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts review and new aspects. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 86(1), 154–166.
22. Keidāne, D., Kļaviņa, A., Bergmane, M.B., Kovalcuka, L. (2022) Parasitofauna and current status of anthelmintic resistance in Latvian sheep farms. *Vet. World.* 15(2), 414-418.
23. Kļaviņš, A. Parastais biškrēsliņš. [<https://www.latvijasdaba.lv>]
24. Kovalcuka, L., Keidane, D., Klavina, A., Grasberga, M.B. and Veksins, A. (2022) Most common inappropriate drug usage factors in anthelmintic treatment on sheep farms in Latvia. *Vet. World.*, 15(2): 244-251.
25. Krastiņa, A. (2021) Biškrēsliņš. Varen labs, bet – jāuzmanās! Kāpēc tas ir īpaši bīstams diabēta slimniekiem? [<https://www.la.lv/biskreslins-varen-labs-bet-jauzmanas>]
26. Latvijas Republikas Pārtikas un Veterinārais dienests. Veterināro zāļu reģistrs. 2021. [Retrieved on 05-04-2021]. Available from: <https://registri.pvd.gov.lv/vz> .
27. Leathwick, D.M. and Luo, D. (2017) Managing anthelmintic resistance variability in the dose of drug reaching the target worms influences selection for resistance? *Vet.Parasitol.*, 243: 29-35.
28. Madalāne, V. (2015) Kādas drogas vākt pavasarī? Pumpuri, lapas, mizas un saknes jūsu veselībai! [<https://www.la.lv/kadas-drogas-vakt-pavasari>]
29. Mavrot, F., Hertzberg, H., Torgerson, P. (2015) Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: A systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors.* 8, 2-11.
30. Prichard, R.K., Geary, T.G. (2019) Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *Int. J.Parasitol. Drugs Drug Resist.*, 10: 69-83.
31. Puertollano, M.A., Puertollano, E., Álvarez de Cienfuegos, G., A de Pablo M. (2011). Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr Top Med Chem.* 11(14):1752-66.
32. Rezaei, A., Rezaeinodehi, A., Khangholi, S. (2008) Chemical Composition of the Essential Oil of Artemisia absinthium Growing Wild in Iran Chemical Composition of the Essential Oil of Artemisia absinthium Growing Wild in Iran. *Artic Pakistan J Biol Sci.* 11, 946–949.
33. Rodríguez-Hernández, P., Reyes-Palomo, C., Sanz-Fernández, S., Rufino-Moya, J.P., Zafra, R., Martínez-Moreno, J.F., Rodríguez-Estévez, V., Díaz-Gaona, C. (2023) Antiparasitic Tannin-Rich Plants from the South of Europe for Grazing Livestock: A Review. *Animal* 13, 201
34. Rubine, H., Ozola, S., Eniņa, V. (1974) *Ārstniecības augu sagatavošana un lietošana*. Rīga: Zvaigzne. 1-380.
35. Saaby, L., Rasmussen, H. B., Jäger, A. K. (2009). MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) hull. *Journal of Ethnopharmacology.* 121(1), 178–181.
36. Salveomix (2023) Sastāvdaļas. [<https://www.salveomix.lv/salveo/sastavdalas/>]
37. Sargison, N. (2009) *Sheep Flock Health*. Blackwell: Oxford. 1-465.

38. Sile, I., Romane, E., Reinsone, S., Maurina, B., Tirzite, D., Dambrova, M. (2020) Data on medicinal plants in the records of Latvian folk medicine from the 19th century. *Data Brief.* 28, 1-3.
39. Sile, I., Romane, E., Reinsone, S., Maurina, B., Tirzite, D., Dambrova, M. (2020) Medical plants and their uses recorded in the archives of Latvian folklore from the 19th century. *J. Ethnopharmacol.* 249, 1-15.
40. Spindelböck, J.P., Cook, Z., Daws, M.I., Heegaard, E., Måren, I.E., Vandvik, V. (2013) Conditional cold avoidance drives between-population variation in germination behaviour in *Calluna vulgaris*. *Ann. Bot.* 112, 801–810.
41. Szopa, A., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Elansary, O.H., Al-Mana, A.F., Mattar, A.M., Ekiert, H. (2020) *Artemisia absinthium* L.—Importance in the History of Medicine, the Latest Advances in Phytochemistry and Therapeutical, Cosmetological and Culinary Uses. *Plants.* 9, 1-33.
42. Šoltés, R., Gregušková, E., Šoltésová, A. (2014) Bioindication of chemical elements deposition in the high Tatramts (Slovakia) based on *Calluna vulgaris* (L.) Hull; comparative levels after the improvement of emissions. *Carpathian J. Earth Environ. Sci.* 9, 5–14.
43. Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2007) *Veterinary Parasitology. 3rd ed.* Blackwell: Oxford. 1- 874.
44. Vargas-Magana, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, J.A., Sandoval-Castro, A.C., Hoste, H., Chan-Pérez, I.J. (2014) Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.* 206, 322–327
45. Zajicková, M., Nguyen, T.L., Skálová, L., Stuchlíková, R.L., Matoušková, P. (2020) Anthelmintics in the future: Current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discov. Today* 25, 430–437.
46. Zabokritskii, N.A., Cherepanova, O.E., Dudukina, N.N. (2017) Seasonal dynamics of the accumulation of biologically active substances in the shoots of *Calluna vulgaris* L. *Agrar. Bull. Ural.* 3, 31–34.

PIELIKUMI