

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**ANTIPROLIFERATIVNÍ A ANTHELMINTICKÉ ÚČINKY
EXTRAKTŮ Z KAPRADIN**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Turoňová Petra

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Petra Turoňová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, získané zkušenosti a čas, který mi věnovala při vypracování práce a řešení dané problematiky.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Petra Turoňová

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, PhD.

Název diplomové práce: Antiproliferativní a anthelmintické účinky extraktů z kapradin

Kapradiny patří mezi vyšší výtrusné cévnaté rostliny. V této práci byly zkoumány antiproliferativní a anthelmintické účinky extraktů vybraných druhů kapradin. Antiproliferativní účinky extraktů byly testovány na buněčné linii SW480. Jedná se o buněčnou linii původně získanou z primárního adenokarcinomu tlustého střeva. Anthelmintické účinky extraktů byly studovány na larvách L3 *Haemonchus contortus*, což je nejrozšířenější vnitřní parazit ovcí a koz. Pro zjištění antiproliferativní aktivity extraktů byl nejprve proveden úvodní screening více druhů kapradin o dvou koncentracích. Cytotoxicita byla vyhodnocena změřením absorbance na spektrofotometru Tecan. Čtyři druhy kapradin, které vykazovaly nejslibnější antiproliferativní aktivitu byly podrobeny testování ve třech časových intervalech a čtyřech koncentracích. Larvy L3 *H. contortus* byly vystaveny extraktům kapradin po dobu 7 dnů a pomocí mikroskopie bylo stanoveno procento vyvinutých larev L4 z celkového množství použitých larev stádia L3. Nejvyšší antiproliferativní a anthelmintickou aktivitu vykazovaly druhy *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris aemula*, *Davallia canariensis* a *Polystichum aculeatum*. Významnou anthelmintickou aktivitu prokázal navíc druh *Dryopteris dilatata*.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Petra Turoňová

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, PhD.

Title of diploma thesis: Antiproliferative and anthelmintic effects of fern extracts

Ferns belong to spore vascular plants. In this study, an antiproliferative and anthelmintic effects of selected fern extracts were investigated. The antiproliferative effect of the extracts was tested on the SW480 cell line. This cell line was originally obtained from primary adenocarcinoma of the colon. The anthelmintic effect was tested on L3 larvae *Haemonchus contortus*, the most common internal parasite of sheep and goats. Firstly, to determine the antiproliferative effect of the extracts, an initial screening was performed. Cytotoxicity was evaluated by measuring absorbance on a Tecan spectrophotometer. The four fern species that showed most promising antiproliferative activity were tested at three time intervals and four concentrations. *H. contortus* larvae L3 were exposed to fern extracts for seven days and the percentage of developed L4 larvae was detected by microscope. *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris aemula*, *Davallia canariensis* and *Polystichum aeculatum* showed the highest antiproliferative and anthelmintic activity. In addition, *Dryopteris dilatata* showed significant anthelmintic activity.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. <i>Haemonchus contortus</i>	9
2.1.1. Taxonomie.....	9
2.1.2. Morfologie.....	9
2.1.3. Životní cyklus.....	11
2.2. Infekce způsobené <i>H. contortus</i>	13
2.2.1. Výskyt infekce	13
2.2.2. Příznaky infekce.....	13
2.2.3. Diagnóza	14
2.3. Léčba helmintóz.....	17
2.3.1. Obecné pokyny pro podání léčiv.....	17
2.3.2. Strategie léčby	18
2.3.3. Odčervovací programy	19
2.4. Anthelmintika	20
2.4.1. Benzimidazoly.....	20
2.4.2. Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny.....	21
2.4.3. Makrocyclické laktony.....	22
2.4.4. Aminoacetonitrilové deriváty - monepantel.....	22
2.4.5. Spiroindolové deriváty - derquantel.....	23
2.5. Rezistence na anthelmintika	23
2.5.1. Test účinnosti anthelmintik	24
2.5.2. Mechanismy rezistence	24
2.6. Přírodní látky s anthelmintickou aktivitou.....	26
2.6.1. Rostliny s anthelmintickou aktivitou	27
2.6.2. Kapradiny s anthelmintickou aktivitou	30
2.7. Alternativní metody řešení infekce.....	34
3. CÍL PRÁCE.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1. Cytotoxické účinky kapradin.....	38
4.1.1. Materiál a chemikálie	38
4.1.2. Pomůcky a přístroje.....	38
4.1.2.1. Pomůcky	38

4.1.2.2.	Přístroje.....	38
4.1.3.	Metodika	39
4.1.3.1.	Buněčné linie	39
4.1.3.2.	Kultivační médium	39
4.1.3.3.	Pasážování buněk	40
4.1.3.4.	Počítání buněk	41
4.1.3.5.	Nasazování buněk.....	41
4.1.3.6.	Ovlivňování buněk	42
4.1.3.7.	Test WST.....	42
4.2.	Anthelmintické účinky kapradin.....	43
4.2.1.	Materiál a chemikálie	43
4.2.2.	Pomůcky a přístroje.....	44
4.2.2.1.	Pomůcky	44
4.2.2.2.	Přístroje.....	44
4.2.3.	Metodika	44
4.2.3.1.	Získávání L3	44
4.2.3.2.	Odpouzďení L3	44
4.2.3.3.	Počítání xL3.....	45
4.2.3.4.	Nasazování a ovlivňování xL3	45
4.2.3.5.	Počítání xL3 a L4	46
4.3.	Statistická analýza dat.....	46
5.	VÝSLEDKY.....	47
5.1.	Cytotoxické účinky kapradin	47
5.1.1.	Úvodní screening	47
5.1.2.	Screening vybraných extraktů kapradin při různých časových intervalech.....	48
5.1.3.	Screening vybraných extraktů kapradin v různých koncentracích	49
5.2.	Anthelmintické účinky kapradin.....	53
6.	DISKUZE.....	55
7.	ZÁVĚR.....	59
8.	TABULKA ROZKLÍČOVÁNÍ KAPRADIN	60
9.	SEZNAM ZKRATEK	61
10.	POUŽITÁ LITERATURA	62

1. ÚVOD

Helmintózy jsou infekční onemocnění vyvolaná parazitickými červy ze skupiny helmintů. Jejich výskyt na farmách způsobuje velké hospodářské ztráty, neboť vedou ke snížení produkce zvířat a mnohé život ohrožující stavy končí i smrtí. Jedním z nejrozšířenějších helmintů je vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), která parazituje ve slezu přežvýkavců.

Léčba a kontrola infekce spočívá v podávání anthelmintik. V současné době je na trhu k dispozici pět skupin anthelmintik: benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony, aminoacetonitrilové deriváty a spiroindolové deriváty. Nadměrné užívání anthelmintik a jejich nepřesné dávkování vede velice často k rozvoji rezistence, která byla zaznamenána u všech dostupných skupin anthelmintik. Rezistence je stav, kdy hlístice ztrácí citlivost vůči léčivu, ke kterému byla dříve odolná. *H. contortus* má vysokou genetickou rozmanitost, proto je u něj rezistence zcela běžným jevem.

Nové metody řešení infekce se zaměřují na epidemiologické aspekty parazita a jsou vhodným doplněním ke stávající léčbě. Pozornost se také směřuje k přírodním látkám, které by mohly být vhodnou alternativou syntetických anthelmintik. Jejich výhodou je, že nezpůsobují rezistenci a mají minimální výskyt nežádoucích účinků. Pro anthelmintické účinky se zkoumají samotné rostliny a jejich metabolity.

Jedna ze skupin s potenciálním anthelmintickým účinkem jsou kapradiny. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda extrakty různých druhů kapradin vykazují anthelminické a antiproliferativní účinky. Pokud by se podařilo nalézt takto účinné přírodní léčivo, mělo by to zajisté významný přínos v terapii parazitárních infekcí a nádorových onemocnění.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. *Haemonchus contortus*

2.1.1. Taxonomie

Haemonchus contortus neboli vlasovka slezová známá jako „červený-žaludkový červ“ se řadí do kmenu hlístice (Nematoda), třídy Secrentea, řádu Strongylida, čeledi Trichostrongylidae a rodu *Haemonchus* (Animal Diversity Web [online]).

2.1.2. Morfologie

Tělo *H. contortus* je nitkovitého tvaru dlouhé přibližně 10 až 30 mm. Parazit je odděleného pohlaví, samečci jsou zpravidla kratší než samičky (Kaufmann, 1996). Samečci dosahují délky v průměru 10-20 mm, samičky jsou obvykle dlouhé 18-30 mm (Naeem et al., 2021). Barva těla je načervenalá, jelikož se vlasovky živí krví hostitele. Pohlaví lze od sebe rozeznat, jelikož u samiček je viditelná děloha, která se jeví jako bíle zabarvené místo na načervenalém těle (Kaufmann, 1996).

Tělo hlístic můžeme rozdělit do tří částí. V přední části těla se nachází ústa, pysky a jícen, tedy orgány, díky kterým může hlístice přijímat potravu. Také jsou zde smyslové orgány, které umožňují hlístici pohyb a orientaci v prostředí. V prostřední části nalezneme střeva, pohlavní orgány a jejich vývody a aparát podílející se na regulaci osmotického tlaku. V koncové části těla samečků vyúsťují pohlavní orgány a střevo (Ryšavý, 1989).

Tělo hlístic pokrývá kutikula (*tegument*), která je tvořena zářezy připomínající článkování (*pseudosegmentace*). Kutikula je různě strukturovaná, v přední a zadní části bývá rozšířena a vytváří tzv. křídla šíjová (cervikální), boční (laterální) a ocasní (kaudální). U samečků tyto rozšířené struktury mají funkci kopulačních orgánů (Ryšavý, 1989). Kutikula se podílí nejen na opoře těla hlístice, ale zároveň je důležitá pro pohyb hlístic, pro interakci s hostitelem a probíhá přes ní látková výměna (Volf a Horák, 2007).

Hlístice mají nepravou tělní dutinu (*pseudocoel*), která je vyplněna tekutinou a je důležitá pro vnitřní a látkovou sekreci, zároveň pomáhá regulovat osmotický tlak. Vysoký vnitřní tlak mechanicky chrání orgány před tlakem z vnějšího prostředí (Ryšavý, 1989).

Exkreční orgány hlístic jsou tvořeny dvěma kanálky podél těla, které vedou od zadní části směrem dopředu. V přední části se spojují a vytváří exkreční kanálek vedoucí na povrch těla k exkrečnímu otvoru (Ryšavý, 1989).

Centrální nervový systém hlístic se nachází v oblasti jícnu, tvoří zde tzv. cirkumesofageální prstenec, který spojuje nervová ganglia. Z prstence vystupuje šest nervových drah, které se dále větví a inervují různé části těla. Důležitá je inervace zejména pro senzorické orgány, tzv. amfidy, které se nachází v přední části těla (Ryšavý, 1989).

V přední části těla hlístic nalezneme hlavový oddíl, který je tvořen začátkem těla a ústní dutinou (*kapsula*), a také hltanový oddíl. Ústní otvor bývá na hřbetní nebo břišní straně, kolem něj jsou různé útvary, tzv. pysky (*labia*). Kolem úst se také nachází hlavové papily, což jsou vyvýšeniny nesoucí funkci chemorecepčních orgánů. Na spodní část úst navazuje jícn (*esofagus*), který může tvořit dvě části – žláznatou a svalnatou. Na konec jícnu nasedá střevo, které směřuje až k zadní části těla a končí řitním otvorem (*kloaka*). U samečků do střeva v zadní části ústí vývody pohlavních žláz. Řitní otvor se většinou nachází na břišní straně (Ryšavý, 1989).

Samečci mají většinou nepárové pohlavní orgány, jsou tvořené trubicovitým varletem, které přechází v chámovod. Chámovod tvoří semenný váček (*vesicula seminalis*) a vývodný kanálek (*ductus ejaculatorius*), který ústí společně se střevem do řitního otvoru. Kolem těchto vývodů jsou uloženy kopulační orgány – spikuly a gubernákulum, které tvoří již zmíněná boční křídla kutikuly (Ryšavý, 1989).

Naopak samičky mají pohlavní orgány většinou párové. Jsou tvořené vaječníky (*ovaria*), které mají vzhled trubic a přechází ve vejcovody

(ovidukty) a dělohu (*uterus*). Většinou je jeden vaječník tvořen v přední části těla, druhý v zadní části a v prostřední se poté spojují v kanálek vyústějící na povrch těla. Tento kanálek je zpravidla na břišní straně těla a tvoří vulvu, tedy samičí pohlavní orgán. Vaječné buňky jsou tvořeny ve vaječnicích, sestupují do dělohy, kde po oplodnění samčím spermatem vznikají vajíčka. Vajíčka jsou obvykle kulovitého tvaru s různými výstupky (Ryšavý, 1989).

2.1.3. Životní cyklus

Haemonchus contortus patří mezi geohelmintry, tzn. že má přímý životní cyklus a jeho vývoj probíhá v hostiteli a v životním prostředí hostitele (Ryšavý, 1989).

Do životního prostředí hostitele se vajíčko helminta dostane z fekálií nakažených zvířat. Pokud jsou vhodné podmínky, dostatečná teplota a vlhkost, vajíčko se vyvíjí a vzniká první stádium larvy (L1). Tyto larvy se živí na bakteriích a organických látkách z fekálií a vyvíjí se do druhého stádia larvy (L2), přičemž L1 tvoří kutikulu. Tento vývoj probíhá až do třetího stádia larvy (L3), kde má larva celkem tři kutikuly (Ryšavý, 1989). Vývoj z vajíčka do L3 trvá přibližně 5-10 dní (Craig, 2009).

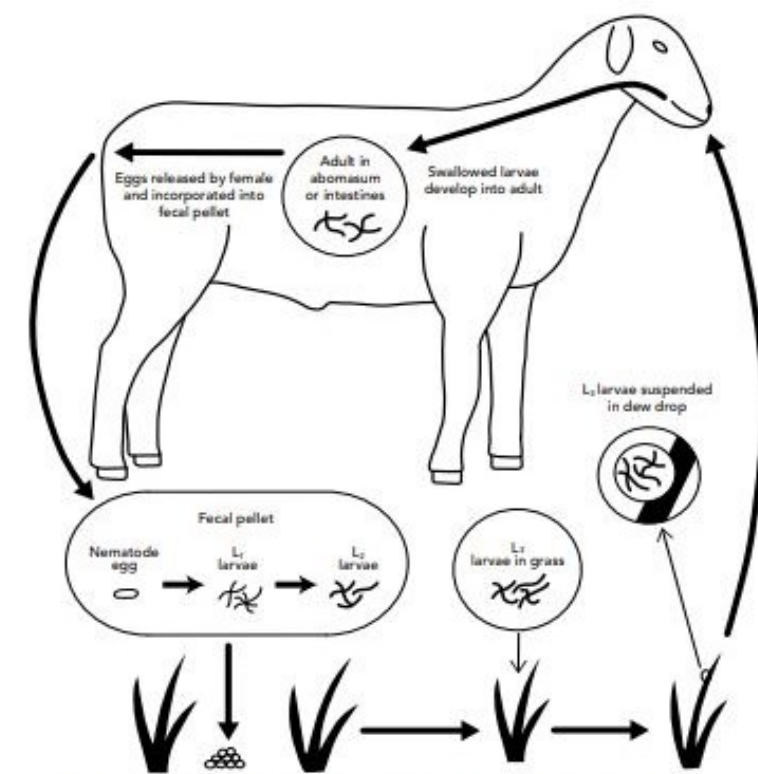
Larva L3 je infekční stádium a může tedy opustit fekálie a vystoupat na povrch vegetace (Ryšavý, 1989). L3 je uzavřena v pouzdru vody, která ji chrání před vysušením a také před krmením, aby nevyčerpala energii, kterou nabrala během růstu. Vývoj z vajíčka do stádia L3 závisí na okolní teplotě, je rychlejší, pokud je větší teplo (Craig, 2009). Nejúspěšnější vývoj *H. contortus* je při teplotě 25°C až 38°C (Zajac a Garza, 2020). Pokud je ale teplota nižší, má naopak larva větší šanci na přežití. Larva se může dostat na vegetaci pouze pokud je dostatečná okolní vlhkost, jelikož sucho znesnadňuje migraci, ale pasivně ji může přenášet hmyz, žížaly nebo jiné vlivy prostředí (Craig, 2009).

Z vegetace larva L3 může být pozřena dobyt看em a tím se dostává do hostitelského organismu. V batoru se larva svléká z kutikuly pod vlivem nízkého množství kyslíku, vyššího množství oxidu uhličitého a vyšší teploty. L3 se poté přesouvá do vlastního žaludku, slezu. Během krátké doby se

vyvíjí do čtvrtého stádia larvy (L4), která se už krmí krví hostitele. Po třech týdnech od pozření hostitelem je samička schopna produkovat vajíčka, konkrétně jich může být 5000 až 6000 denně (Craig, 2009).

Pokud je období zimních měsíců, tedy sucha a chladna, hlístice je schopna se takovým podmínkám přizpůsobit. Přezimuje v posledním žaludku přežvýkavců slezu (*abomasum*). Zde podstupuje hypobiózu, stav, ve kterém se larva nekrmí, ani neklade vajíčka a nezpůsobuje hostiteli žádné škody (Machen, 1998 [online]). Hypobiotické larvy nerozpozná imunitní systém hostitele a nemůže se jich tedy zbavit sám od sebe (Craig, 2009). Pokud nastává období rozmnožování, porodu nebo laktace, larva to přijme jako signál přicházejícího jara a pokračuje ve vývoji. Nejvyšší náchylnost organismu k infekci je 30 dní před porodem a 30 dní po porodu (Machen, 1998 [online]).

Vajíčka se dostanou do pastvin z fekálií a celý proces se opakuje. Když se oteplí, larvy čekají na mláďata, aby je pozřela a dochází k nakažení dalších jedinců. Většina hlístic díky hypobióze má vyšší šanci na přežití. Larvy, které se nachází na vegetaci většinou zahynou v období zimy a sucha. Nicméně velká část larev se nachází uvnitř hostitele a ztráty v populaci hlístic nejsou tedy nijak významné (Machen, 1998 [online]).



Obr. 1 Životní cyklus *Haemonchus contortus* (Machen, 1998 [online])

2.2. Infekce způsobené *H. contortus*

2.2.1. Výskyt infekce

Infekce vyskytující se u hospodářských zvířat způsobené *H. contortus* jsou rozšířené po celém světě a jsou příčinou významných hospodářských ztrát. Nejvíce náchylná k infekci jsou mláďata, nicméně parazité jsou přítomni u všech pasoucích se zvířat, jelikož pastviny jsou obecně vysoce kontaminované. Obecně se uvádí, že 75-80 % zvířat ve stádě v sobě ukrývá nematody o nízké zátěži. A u 15-20 % zvířat ve stádě je vysoká zátěž červy, což je v přepočtu více než 10 000 červů uvnitř hostitele. Ve většině případů se jedná o hypobiotické larvy a není tedy viditelné poškození hostitele (Charlier et al., 2016).

2.2.2. Příznaky infekce

Anémie, bledé sliznice a hypoproteinémie (oteklá čelist) jsou nejčastějšími akutními příznaky nakažení. Příznaky jsou viditelné u více jednotlivců ve stádě a mohou se objevit velmi náhle. Hostitel může trpět průjmem, ale to je

často nespecifický a méně patrný příznak, který se vykytuje spíše až u těžkých infekcí. Zvířata mají sníženou chuť k jídlu, spíše polehávají a často může infekce končit i smrtí (Craig, 2009; Machen, 1998 [online]).

U chronických infekcí bylo zjištěno, že parazitismus může ovlivnit přibývání na váze, růst kostí, produkci mléka, vlny a také možnost reprodukce (Coop a Holmes, 1996).

2.2.3. Diagnóza

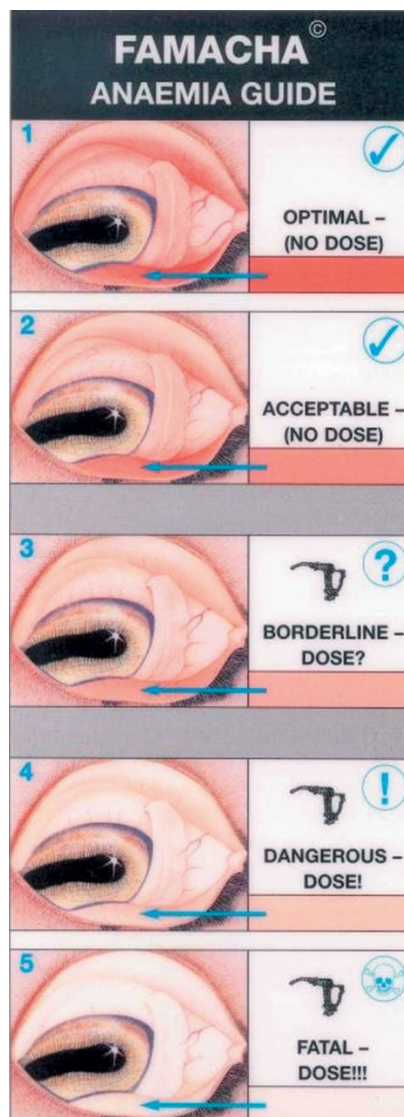
Diagnóza v pastevních podmínkách je často obtížná. Nejčastějším jevem je přítomnost vajíček hlístic ve stolici. Ale k anemii a smrti může dojít i v případě, kdy hlístice nejsou ještě dospělé a schopny produkce. V tomto případě nejsou pozorovatelná vajíčka ve stolici a jediným průkazem přítomnosti hlístic je vyšetření slezu (Miller a Kaplan, 2012).

Nejlepším odhadem zatížení parazitem je kvantifikace vajec ve stolici (FEC – faecal egg count). Používá se kvantitativní McMaster metoda, která udává počet vajec na gram stolice. Principem McMaster metody je diferenciální hustota. Vejce parazita ve vodě klesají ke dnu, ale v jiných chemikáliích, které mají vyšší hustotu než voda, budou plavat a dají se tedy spočítat. Nejčastěji se pro metodu používá roztok chloridu sodného, kde 1 litr flotačního roztoku vystačí až na 30 McMaster vyšetření. Test je nejlepší provádět z čerstvě odebrané stolice, která se musí během příprav uchovávat v lednici, aby nedošlo k vylíhnutí vajec při pokojové teplotě (Miller a Kaplan, 2012). Obecně platí, pokud se hodnota FEC u *H. contortus* pohybuje nad 4000 vajec na gram stolice, jedná závažnou infekci a je potřeba jí řešit (Craig, 2009). Problémem je, že všechna vejce hlístic čeledi Trichostrongylidae vypadají velmi podobně a nelze je jednoznačně identifikovat. Nicméně pro správný výběr strategie léčby, musíme znát jaký parazit konkrétně se na pastvě vyskytuje. Následuje tedy kultivace stolice, izolace larev a mikroskopická identifikace. Nicméně tato metoda vyžaduje 10 až 14denní inkubační dobu a dostatečné parazitologické znalosti, proto se už dnes v praxi nepoužívá (Miller a Kaplan, 2012).

Pro účely důkazu přítomnosti vajec *H. contortus* ve stolici se dnes používá jednodušší metoda. Bylo prokázáno, že arašídový lektin se specificky váže na vajíčka *Haemonchus*, ale ne na ostatní druhy Trichostrongylidae. K vajíčkům izolovaným ze stolice, se přidá arašídový lektin, který je konjugován s fluorescein isothiokyanátem. Následně je možné identifikovat vajíčka *Haemonchus* pomocí fluorescenční mikroskopie. Jedná se o rychlou metodu, kde výsledky jsou známy ve stejný den použití testu. Problémem může být nákladnost testu, jelikož je k provedení potřeba fluorescenční mikroskop (Miller a Kaplan, 2009).

Pokud se jedná o rozsáhlejší infekce hlísticemi, které způsobují anémii, dobrým ukazatelem ztrát krve je objem červených krvinek (PCV – packed cell volume) a skóre FAMACHA (název metody FAMACHA je odvozen od autora, profesora Francois 'Fafa' Malan – Chart). Tabulka FAMACHA zahrnuje pět úrovní infekce. Úroveň se zjišťuje podle zabarvení dolního očního víčka u zvířete. Barva je od červené, která značí zdravé zvíře, po bílou, což znamená velmi chudokrevné zvíře. FAMACHA skóre dobře koreluje s PCV a dá se snadno použít (Miller a Kaplan, 2009).

PCV je přesnější ukazatel, podle kterého můžeme zjistit potřebu léčby. Hodnoty PCV se lehce liší u koz a ovcí, nicméně normální hodnoty se pohybují mezi 25 % až 30 %. Jelikož se hlístice krmí krví hostitele, při infekci hodnoty PCV klesají. První příznaky anémie (letargie, anorexie) se mohou projevit už při poklesu PCV pod 20 %, závažnější projevy se objeví při poklesu pod 15 %. Smrt může nastat při poklesu pod 10 %, žijící zvířata s těmito hodnotami lze zachránit jedině transfuzí krve. Pokud se jedná o vysokou zátěž *H. contortus* smrt může nastat akutně. Samozřejmě pokles PCV může nastat i při jiných stavech, než je infekce, proto je potřeba pro jasnou identifikaci provést ještě jiné testy (Miller a Kaplan, 2009).



Obr. 2 Tabulka FAMACHA, podle které můžeme zjistit závažnost parazitické infekce: 1: v pořádku, zvíře není třeba léčit; 2: přijatelné; 3: hranice, lze zvážit léčbu; 4: nebezpečí, není třeba váhat s léčbou; 5: smrtelné, je třeba nasadit léčbu okamžitě (farmer's weekly [online])

H. contortus je jediný parazit u kterého lze stanovit zátěž hostitele vizuální kontrolou. Červí zátěž se lze stanovit získáním, počítáním a identifikací červů při pitvě. Červi žijící ve slezu bývají nejvíce patogenní, proto by měl být tento orgán preferován z hlediska zkoumání (Craig, 2009).

2.3. Léčba helmintóz

2.3.1. Obecné pokyny pro podání léčiv

Většina anthelmintik používaných u dobytka se podává orálně, jelikož jsou parazité přítomni v trávicím traktu, je tato forma neúčinnější. Léčiva se dávají injekční stříkačkou do zadní části krku (Williamson, 2019 [online]).

Prvním důležitým bodem v terapii je dostatečná dávka anthelmintika. Ovce a kozy metabolizují anthelmintika různou rychlostí, proto musí být u kozy použita vyšší dávka než u ovce. Většinou se jedná o dvojnásobné dávky u koz, s výjimkou levamizolu, který se podává jen v 1,5násobné vyšší dávce. Anthelmintika se dávají v miligramech na kilogram (Miller a Kaplan, 2012).

Tab. 1 Běžně užívaná anthelmintika u ovcí a koz (Kaplan, 2014 [online])

LÉČIVO	DÁVKA - OVCE	DÁVKA - KOZA
Albendazol	7,5 mg/kg	20 mg/kg
Fenbendazol	5 mg/kg	10 mg/kg
Ivermektin	0,2 mg/kg	0,4 mg/kg
Levamizol	8 mg/kg	12 mg/kg
Moxidektin	0,2 mg/kg	0,4 mg/kg

Pokud selže jedno léčivo, lze použít jiné, nicméně i časté střídání anthelmintik vede k rozvoji rezistence. Pokud je zjištěna rezistence vůči všem třídám anthelmintik v dané oblasti, např. na farmě, lze použít kombinaci dvou anthelmintik z odlišných tříd. Například kombinace fenbendazol-levamisol nebo albendazol-ivermektin zvyšuje účinnost. Při použití kombinace by měla být vždy podána maximální dávka obou anthelmintik (Miller a Kaplan, 2012). Léčiva by se neměla míchat do jedné stříkačky, je nutné podávat každé zvlášť (Williamson, 2019 [online]).

2.3.2. Strategie léčby

Odčervovací strategie se zaměřují na specifické aspekty epidemiologie parazita. Přenos hlístice závisí na množství pozřených infekčních larev během pastvy. Nejdůležitější doba pro odčervení je tedy období bohaté na růst pícnin. Vyšší teplota a vlhkost (přírodní nebo umělá) zajistí dostatečné podmínky pro růst výživného krmiva pro vývoj dobytka. Nejvhodnější je tedy provést rutinní hodnocení parazitů (např. FAMACHA) v určitých intervalech, obvykle 2 až 4 týdny podle očekávané závažnosti infekce, nejvíce náchylné je období před, během porodu a po porodu. Odčervení není vhodné provádět u mladých jehňat, která jsou chovaná na porážku, jelikož tato zvířata budou od ostatních brzy oddělena a jejich odčervení by zvýšilo riziko infekce odolnými hlísticemi (Miller a Kaplan, 2012).

V mírném podnebí je častá hypobióza, kde se většina parazitů nachází uvnitř zvířat, a ne na pastvině. Proto je důležité odčervování před jarním obdobím, kde dochází ke zbavení se hypobiotických larev a snížení následné kontaminace pastvin. Většinou se jedná o období od 15. prosince do 15. února, tedy období po větších porážkách a mrazech. Pro tento účel odčervení je potřeba anthelmintikum, které je účinné proti hypobiotickým larvám. Nejlepší volbou jsou makrocyclické laktony, některé benzimidazoly, mohou být méně účinné. Jelikož hypobiotické larvy hostiteli nezpůsobují žádné škody, není možné použít k posouzení selektivní test a je tedy na místě odčervení všech zvířat ve stádě (Miller a Kaplan, 2012).

Základní strategií je cílená selektivní léčba (TST – targeting selective treatment). Jejím cílem je zachování části hlístic reagujících na anthelmintika na pastvině, z důvodu prodloužení životnosti léčiv. Vajíčka hlístic se dostanou na pastvinu z výkalů infikovaných zvířat, kterých je ve stádě přibližně 30 %. U hlístic jsou přítomny geny, které kódují anthelmintickou rezistenci, proto je důležité zachovat v jejich genetické informaci i geny citlivé na léčiva. Pomocí FAMACHA systému lze odhalit anemická zvířata potřebující odčervení, zbytek zvířat ve stádě se nechá neošetřený. Tato neošetřená zvířata poskytují tzv. refugium, což jsou

vnímavé hlístice, které ředí geny hlístic odolných vůči terapii (Miller a Kaplan, 2012).

Další strategií používanou u mladých přibírajících zvířat k identifikaci rostoucí parazitární infekce je hodnocení pro snížený přírůstek hmotnosti. Tato strategie vyžaduje pravidelné vážení všech zvířat ve stádě. Jednotlivci, kteří nesplňují požadovanou prahovou hodnotu pro zvýšení hmotnosti jsou ze stáda oddělena a odčervena (Miller a Kaplan, 2012).

Další vhodnou strategií je odčervení zvířat a jejich následné přesunutí na „bezpečné“ pastviny, tedy oblasti, kde je úroveň kontaminace parazity velmi nízká a k reinfekci by tedy docházelo po delších časových intervalech. Příkladem takových pastvin jsou oblasti, kde se ovce nebo kozy nepásly zhruba 3 až 6 měsíců, v závislosti na klimatu. Dále to mohou být pastviny používané k výrobě sena nebo pastviny spásané koňmi. Tato strategie je přínosná tehdy, pokud podle TST bude zajištěno, že refugium vnímavých červů se bude nacházet na nové pastvině. Během sezóny se střídání pastvin používá v přibližně 30denních intervalech, jelikož tato doba je také optimální pro vývoj nových hlístic při vhodných teplotních a vlhkostních podmínkách, proto např. 3měsíční intervaly by byly neúčinné. Během období sucha a zimy je rotace zbytečná, neboť většina larev při těchto podmínkách na pastvině zahyne (Miller a Kaplan, 2012).

2.3.3. Odčervovací programy

Taktické odčervovací programy se používají k odstranění červů z hostitelů předtím, než dojde k rozmnožovací fázi parazita, která by kontaminovala pastvinu. Příkladem taktického odčervování je léčit zvířata po 10 až 14 dnech od bohatých dešťů, které následovaly po suchém období (Miller a Kaplan, 2012).

Záchranné odčervovací programy jsou většinou používány u zvířat těžce infikovaných, u kterých se projeví typické příznaky těžké anémie nebo otok čelisti (Miller a Kaplan, 2012).

Oportunistické odčervovací programy se používají při přípravě zvířete pro určité účely, např. kastrace, stříhání nebo očkování (Miller a Kaplan, 2012).

Potlačující odčervovací programy zahrnují použití anthelmintika v pravidelných intervalech obvykle každé 2 až 4 týdny. Tyto programy bohužel vedou k rozvoji rezistence, protože obecně platí, čím častěji se zvíře odčervuje, tím rychleji se vyvine rezistence na anthelmintika. Zároveň jsou hodně časově i finančně náročné (Miller a Kaplan, 2012).

2.4. Anthelmintika

I když biologická kontrola a očkování mají jistý potenciál v kontrole parazitóz, chovatelé se stále spoléhají na účinnou anthelmintickou léčbu (Jiao et al., 2020).

Existuje velká řada chemických látek, které mají toxické účinky na nematody. Prvními sloučeninami s anthelmintickým účinkem, které byly objeveny v minulém století, jsou arsenit sodný, tetrachloroethylen, tetrachlorid uhličitý, bisulfid uhličitý, síran měďnatý a nikotinsulfát. Tyto látky prokázaly bohužel i velký toxický účinek na hostitele a tento fakt vedl k vývoji sloučenin s přijatelnějším bezpečnostním profilem (Sarginson, 2012).

Ve veterinární medicíně se v současné době používá pět tříd anthelmintik: benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony, aminoacetonitrilové deriváty a spiroindolové deriváty (Jiao et al., 2020).

2.4.1. Benzimidazoly

K objevu prvního benzimidazolu – thiabendazolu došlo v 60. letech 20. století (Sarginson, 2012). Toto širokospektré léčivo se prokázalo jako bezpečné a vysoce účinné proti různým druhům vnitřních parazitů. Následoval objev parabendazolu, cambendazolu a oxibendazolu, které se v praxi již běžně nepoužívají. V 70. letech 20. století byl prokázán účinek albendazolu, fenbendazolu, oxfendazolu a mebendazolu, jež jsou komerčně dostupné po celém světě (Besier et al., 2016).

Mechanismus účinku benzimidazolů spočívá v inhibici syntézy tubulinu, což je protein tvořící mikrotubuly (Ducháček a Lamka, 2014). Mikrotubuly jsou nedílnou strukturální součástí důležitých aktivit, zejména motility, sekrece, koordinace a transportu glukózy (Sarginson, 2012). Benzimidazoly způsobují tedy zástavu syntézy mikrotubulů a hromadění tubulinu uvnitř buňky. Vzhledem k důležitosti mikrotubulů v mnoha buněčných procesech dochází nakonec ke smrti organismu (Köhler, 2001).

Většina benzimidazolů působí na všechna vývojová stádia nematod, některá jsou i ovicidní, tzn. že ničí vajíčka parazita a brání jeho vývinu v larvu (Sarginson, 2012).

U ovcí a koz se z řady benzimidazolů používají zejména albendazol, fenbendazol a mebendazol (Dobšíková et al., 2012).

2.4.2. Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Účinek levamisolu, prvního imidazothiazolu byl popsán za počátku 70. let 20. století (Sarginson, 2012). Jedná se o druhou skupinu širokospektrých anthelmintik, která byla zavedena na trh (Besier et al., 2016). Tetrahydropyrimidiny jsou deriváty imidazothiazolů a shodují se s nimi v mechanismu účinku a použití (Dobšíková et al., 2012).

Tyto látky působí jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů, které se nachází na povrchu somatických svalů hlístic (Köhler, 2001). Vazbou léčiva na tento receptor u parazita dochází ke svalové kontrakci a spastické paralýze, která je ireverzibilní (Sarginson, 2012).

Obě skupiny léčiv působí anthelminticky proti dospělcům a některým larválním stádiím, nicméně nepůsobí ovicidně (Ducháček a Lamka, 2014).

Pro použití u ovcí a koz je ze skupiny imidazothiazolů určen levamisol. Jako zástupce tetrahydropyrimidinů lze k léčbě použít pyrantel (Dobšíková et al., 2012).

2.4.3. Makrocyclické laktomy

Ivermektin byl první léčivem ze skupiny makrocyclických laktonů, objeven v 80. letech 20. století (Sarginson, 2012). Jeho hlavním přínosem byl účinek na všechna stádia hlístic, a i některé ektoparazity (Besier et al., 2016). Jedná se o fermentační produkty *Streptomyces avermitilis*, půdní aktinomycety, a jsou tedy léčivy biosyntetického původu (Ducháček a Lamka, 2014).

Mechanismus účinku makrocyclických laktonů spočívá v ovlivnění chloridových iontových kanálů řízených ligandem, převážně se jedná o chloridové glutamátové receptory. Zároveň působí jako agonisté na chloridových kanálech řízených γ -aminomáselnou kyselinou (GABA) a podporují uvolňování GABA z presynaptického neuronu do synapse (Dobšíková et al., 2012). Tyto kanály se aktivují alosterickou vazbou léčiva na jejich podjednotku a dochází ke zvýšené permeabilitě membrány pro chloridové ionty s následnou hyperpolarizací buněčné membrány, což vede k ochrnutí svalů parazita (Sarginson, 2012; Whittaker et al., 2017).

Makrocyclické laktomy se dělí na avermektiny a milbeciny, přičemž obě skupiny působí proti dospělým i vývojovým stádiím parazitů (Ducháček a Lamka, 2014).

Ze skupiny avermektinů se u ovcí a koz používá ivermektin, doramektin a moxidektin. Milbeciny se u potravinových zvířat moc nepoužívají (Dobšíková et al., 2012).

2.4.4. Aminoacetonitrilové deriváty - monepantel

Účinek monepantelu byl poprvé popsán v roce 2009 (Jiao et al., 2020).

Místem působení aminoacetonitrilových derivátů je nikotinový acetylcholinový receptor (Sarginson, 2012). Podobně jako imidazothiazoly způsobuje spastickou paralýzu hlístic (Jiao et al., 2020).

Monepantel účinkuje anthelminticky na larvy a dospělé různých parazitů včetně *H. contortus*. Používá se tam, kde se projevila rezistence na předchozí zmíněné skupiny (Pubchem [online]).

2.4.5. Spiroindolové deriváty - derquantel

K objevu derquantelu došlo v roce 2011, (Jiao et al., 2020) jedná se o fermentační produkt půdní houby *Penicillium simplissimum* (National Center for Advancing Translational Sciences [online]). Toto léčivo se používá pouze v kombinaci s abamektinem, jelikož samostatně nemá významné účinky (Besier et al., 2016).

Mechanismem účinku derquantelu je také vazba na nikotinové acetylcholinové receptory a tím dochází ke svalové paralýze a následné smrti parazita (Sarginson, 2012).

2.5. Rezistence na anthelmintika

Anthelmintická rezistence znamená genetickou ztrátu citlivosti vůči léčivu ve skupině hlístic, které byly dříve citlivé na tento lék (Ihler, 2010). *H. contortus* má obrovskou genetickou rozmanitost, proto je u něj rezistence velice častá (Prichard, 2001). Mechanismy rezistence se liší u různých tříd anthelmintik a hlístice si tedy může zachovat citlivost alespoň k jiné skupině léčiv (Kotze a Prichard, 2016).

V současné době byla popsána anthelmintická rezistence *H. contortus* u všech dostupných tříd anthelmintik. Rezistence se zpravidla objevila v rozmezí 3-10 let od zavedení každého léčiva na trh. Kolem roku 2000 se stala tato situace ještě komplikovanější, neboť byla zjištěna mnohočetná léková rezistence, tj. rezistence vůči třem a více skupinám anthelmintik. Tato skutečnost vedla k vývoji nových léčiv, konkrétně monepantelu, který měl být účinný vůči vysoce rezistentním červům. Bohužel jeho rezistence byla popsána již v roce 2014, tedy pět let poté co byl zaveden na trh (Kotze a Prichard, 2016).

U všech tříd léčiv se vyskytuje i tzv. boční rezistence, tzn. jedno anthelmintikum propůjčuje rezistenci ostatním patřícím do stejné třídy (Miller a Kaplan, 2012).

K rozvoji rezistence může dojít z několika důvodů. Účinnost anthelmintika může být snížena kvůli rychlému průchodu střevy nebo kvůli špatnému načasování terapie vzhledem ke klimatickým podmínkám (Sarginson, 2012). Avšak nejčastějšími důvody vzniku rezistence je špatná dávka léčiva a nadměrné používání anthelmintik (Besier et al., 2016).

2.5.1. Test účinnosti anthelmintik

Anthelmintickou účinnost lze určit z fekálií provedením FECRT (fecal egg count reduction test) testu, který by měl být proveden, pokud je podezření na rezistenci ve stádě. Tento test spočívá v počítání vajec parazita ve stolici, přičemž po léčbě by mělo dojít ke značnému snížení. Je doporučeno provádět srovnání přibližně 7 až 14 dní od odčervení, pro srovnání se používají hodnoty z testu kvantifikace počtu vajec (FEC) McMaster před odčervením. Testování by vždy mělo být prováděno alespoň u 10 % zvířat na farmě. Je důležité testovat jednotlivá zvířata, protože pokud se smísí vzorky stolice od různých zvířat, sníží se přesnost testu. Pokud se provádí test podle pokynů WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) a FECRT klesne pod 95 %, značí to přítomnost rezistence a je třeba změnit anthelmintikum. Toto testování by mělo být prováděno každé 2 až 3 roky nebo kdykoliv při podezření na rezistenci (Miller a Kaplan, 2012).

2.5.2. Mechanismy rezistence

Genetické změny způsobující rezistenci se týkají jak jaderné DNA, tak mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA podléhá vysoké rychlosti mutace, která je desetkrát vyšší než u obratlovců. Jaderná DNA má naopak vysokou genetickou rozmanitost, jelikož kóduje obrovské množství receptorů, je tedy spousta možností, kde mutace může vzniknout (Prichard, 2001).

Benzimidazoly

Rezistence u benzimidazolů je spojena se ztrátou afinity k receptoru na izotypu-1 β -tubulinu. Dochází zde k mutaci 200. aminokyseliny

fenylalaninu, která je substituována tyrozinem. Jedná se o jednonukleotidový polymorfismus F200Y (SNP – single-nucleotid polymorfism), jež je nejčastějším důvodem vzniku rezistence u benzimidazolů (Kotze a Prichard, 2016).

U *H. contortus* byly popsány i další mutace, které způsobují anthelmintickou rezistenci. Týkají se také izotypu-1 β -tubulinu, konkrétně aminokyselinového zbytku 167 (F167Y) a 198 (E198A). Tyto dvě mutace jsou spíše vzácné, nicméně také mají v rezistenci význam. (Kotze a Prichard, 2016).

Imidazothiazoly

Jelikož místem účinku imidazothiazolů je acetylcholinový nikotinový receptor (nAChR), příčinou vzniku rezistence je změna afinity léčiva k tomuto receptoru (Kotze a Prichard, 2016). Receptor je propojen s kationtovým kanálem, který má strukturu pentameru. Každá část řetězce obsahuje vazebné místo pro acetylcholin (Köhler, 2001). Byly popsány tři genetické změny, které se dějí s nAChR, pokud je přítomna rezistence:

- 1) Zkrácené geny podjednotky nAChR: Hco-unc-63 a Hco-acr-8.
- 2) Pokles transkripce genů podjednotky nAChR: Hco-unc-29.3 a Hco-unc-63.
- 3) Snížená transkripce vedlejších (pomocných) proteinů spojených s nAChR: Hco-unc-74, Hco-unc-50, Hco-ric-3.1 a Hco-ric-3.2.

Všechny tyto genetické změny vedou ke snížení počtu funkčních receptorů pro imidazothiazoly, čímž dochází ke snížení účinnosti léčiva. Nicméně *H. contortus* využívá velkou řadu genetických změn, které vedou ke snížené citlivosti agonisty na nAChR, jelikož tento receptor má spoustu možností genetické variability (Kotze a Prichard, 2016).

Makrocyclické laktony

Mechanismus rezistence makrocyclických laktonů je spojen s místem jejich působení, tedy chloridovým kanálem řízeným glutamátem (GluCl)

(Kotze a Prichard, 2016). Při přítomnosti rezistence dochází ke strukturální změně GluCl receptoru (Whittaker et al., 2017).

Strukturálních změn může být celá řada. Například byla pozorována snížená transkripce genů Hco-glc-3 a Hco-glc-5. Záměna aminokyseliny alaninu za valin (A169V) na GluCl je také spojena se sníženou citlivostí na makrocyclické laktony u *H. contortus*. Mezi další záměny patří také K169R a Q176L (Whittaker et al., 2017).

Na podjednotce GABACl byly identifikovány čtyři substituce aminokyselin kódované genem Hco-Igc-37, které vedly k rezistenci (Whittaker et al., 2017).

Dalším místem zkoumání rezistence vůči makrocyclickým laktonům je p-glykoprotein (P-gp), který funguje jako efluxní pumpa. Byly detekovány mutace v genech P-gp, které vedou k jeho upregulaci, a tedy k vyššímu exfluxu léčiva ven z buňky. Konkrétně se jedná o mutace v genech Hcon-pgp-1, Hcon-pgp-2 a Hcon-pgp-9 (Kotze a Prichard, 2016; Whittaker et al., 2017).

Zároveň dalším důvodem rezistence mohou být i anatomické změny u *H. contortus* a/nebo změny funkce sensorických amfidů (Kotze a Prichard, 2016).

Monepantel

Rezistentní hlístice vykazovaly mutace ve dvou genech podjednotky nAChR: Hco-des-2H a Hco-acr-23H (přejmenována na Hco-mptl-1). Tyto mutace vedly k deleci genů, špatnému sestříhu nebo předčasnému ukončení transkripce genu (Kotze a Prichard, 2016).

2.6. Přírodní látky s anthelmintickou aktivitou

Rostliny a jejich extrakty se po staletí používají k léčbě a prevenci různých onemocnění a není tedy překvapením, že některé z nich vykazují také anthelmintickou aktivitu vůči *Haemonchus contortus* (Quadir et al., 2010).

Výhodou přírodních látek oproti syntetickým anthelmintikům je, že nedochází k rozvoji rezistence. Zároveň se mohou mezi sebou libovolně kombinovat, což zvyšuje účinnost terapie. Spousta z nich jsou navíc zdrojem živin a mohou pozitivně ovlivnit odolnost a imunitu hostitele (Zajíčková et al., 2020).

Nevýhodou přírodních látek je jejich získání. Často se jedná o ekonomicky náročné metody, které zahrnují mimo jiné i čištění extraktů, protože v jejich obsahu se mohou vyskytovat toxické látky pro organismus. Obsah látek v rostlině se mění v závislosti na živinách a přírodních podmínkách, takže při každé sklizni můžeme očekávat úplně jiné složení (Garcia-Bustos et al., 2019).

Předmětem zkoumání se stávají celé rostliny, jejich extrakty a sekundární metabolity. Ze sekundárních metabolitů určitý anthelmintický potenciál projevily například taniny, patřící mezi sloučeniny fenolu. Ty tvoří komplexy s bílkovinami, které mohou deaktivovat některé enzymy klíčové pro přežití parazita. Terpeny ovlivňují krmení hlístic reakcí s tyraminovým receptorem. Piperidinové alkaloidy, patřící mezi dusíkaté sloučeniny, dokážou způsobit spastickou paralýzu, neboť se váží na acetylcholinové receptory. Saponiny, ze skupiny terpenů, mohou zvýšit propustnost buněčné membrány tvorbou pórů (Zajíčková et al., 2020).

Mimo metabolitů byly zkoumány i extrakty z léčivých rostlin, kde některé z nich také prokázaly slibné anthelmintické účinky. Ty nejvýznamnější jsou uvedeny v podkapitole níže, kam jsem mimo jiné zařadila i kapradiny, jejichž účinkům jsem se věnovala v experimentální části této diplomové práce.

2.6.1. Rostliny s anthelmintickou aktivitou

Azadirachta indica (zederach indický)

Zederach indický, známý také pod názvem Neem nebo Nimba, je listnatý strom původem z Indie (Herbal Store [online]). Nyní se pěstuje převážně v tropických a subtropických oblastech pro produkci sloučenin, které mají významné insekticidní účinky. Neem má i řadu léčivých vlastností, pro které je hojně využíván, zejména protizánětlivé, protinádorové a imunostimulační (Singh B. a Sharma, 2020).

Hlavním sekundárním metabolitem, který *A. indica* obsahuje je azadirachtin, konkrétněji několik typů azadirachtinů – A, B, D, H a I. Nematocidní vlastnosti prokázaly nejvíce azadirachtiny A, B a H (Singh B. a Sharma, 2020).

Studie ukázaly, že už samotné krmení čerstvými listy vedlo ke snížení produkce vajec parazita a jeho počtu uvnitř těla hostitele (Qadir et al., 2010).

Orálně podaný ethanolový extrakt kůry *A. indica* způsobil snížení počtu vajec parazita ve stolici čili hodnoty FEC. Byly zkoumány také *in vitro* účinky ethanolového extraktu na parazitických a preparazitických stádiích *H. contortus*, bohužel anthelmintický efekt nebyl žádný. Nicméně v jiné studii *in vitro* se ethanolový extrakt z *A. indica* ukázal účinný v inhibici líhnutí vajec a vývoji larev (Qadir et al., 2010).

Butea monosperma

Butea monosperma, známý také jako Palas, je listnatý strom rostoucí napříč Indií (Qadir et al., 2010). Patří do čeledi *Fabaceae* (bobovité) a obsahuje slizy, prokyanidy, kyselinu gallovou a vitaminy skupiny B. Byla prokázána jeho antioxidační aktivita a působí jako afrodiziakum (Jahodář, 2011).

Anthelmintický účinek této rostliny byl prokázán ze semen, které obsahují alkaloid palasonin. Palasonin způsobil zástavu energetického metabolismu červa, mechanismem inhibice příjmu glukózy dovnitř buňky. Také byly zaznamenány embryocidní, ovidní a larvicidní účinky extraktu ze semen *B. frondosa* (Qadir et al., 2010).

Allium sativum (česnek kuchyňský), Zingiber officinale (zázvor lékařský) a Ficus religiosa (fíkovník posvátný)

Allium sativum je dvouletá rostlina pocházející z Asie, patřící do čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité) (BioLib [online]). Je využíván pro své antiseptické a hypoglykemické účinky, zároveň působí antibakteriálně (Singh B. a Sharma, 2020). Hlavními sekundárními metabolity jsou steroidní sloučeniny a sírné sloučeniny – allin a diallyldisulfid (Jahodář, 2011).

Zingiber officinale, z čeledi *Zingiberaceae* (zázvorovité), je vytrvalá bylina původem z Indie (Jahodář, 2011). Pro léčebné účely je využíván jeho oddenek, který obsahuje řadu sekundárních metabolitů, zejména zingiberin, gingerol, oleoresin a sloučeniny fenolu. Používá se při léčbě nachlazení, bolestech svalů a hlavy, křečích a poruchách trávení (Singh B. a Sharma, 2020).

Ficus religiosa, patřící do čeledi *Moraceae* (morušovníkovité), je listnatý strom pocházející z Asie. Jeho plody se využívají pro projímavé účinky, při zánětech močových cest a při bolestech (botany.cz [online]). Obsahuje velké množství fenolických sloučenin, zejména taniny a flavonoidy, které jsou přítomné ve všech částech rostliny (Singh D. et al., 2011).

Slibné anthelmintické účinky vůči *H. contortus* ukázaly methanoloové extrakty těchto rostlin. Extrakt *Z. officinale* zabil 100 % červů, jež mu byli vystaveni, během dvou hodin. Extrakt *A. sativum* byl stejně úspěšný, jen musel působit delší dobu, tedy 6 hodin. *F. religiosa* byl 100% úspěšný po čtyřech hodinách vystavení organismu (Qadir et al., 2010).

Úspěšnou anthelmintickou aktivitu ukázal také olej získaný z *A. sativum*. Zároveň byl testován prášek ze sušeného *Z. officinale* a jeho vodný roztok, které se podávaly orálně ovcím. Obě formy vedly ke snížení počtu vajec ve stolici po 10 dnech od podání (Qadir et al., 2010).

Coriandrum sativum (koriandr setý)

Koriandr setý je jednoletá bylina, původem z Asie, vyskytující se po celém světě. Patří do čeledi *Apiaceae* (miříkovité) a tradičně se používá při zažívacích potížích (botany.cz [online]). Účinnými látkami jsou zejména silice (Jahodář, 2011).

Byly zkoumány *in vitro* účinky vodních a hydro-alkoholových extraktů ze semen *C. sativum* na vejcích a dospělých *H. contortus*. Vodní extrakt byl také podáván orálně infikovaným ovcím. V obou případech měl vodní extrakt ze semen inhibiční účinek na líhnutí vajec, v koncentraci 0,5 mg/ml. Hydro-alkoholový extrakt také vykazoval anthelmintické účinky *in vitro* (Qadir et al., 2010).

Sorghum bicolor (čirok obecný)

Čirok obecný je jednoletá tráva původem z Afriky, dnes pěstovaná v tropických a subtropických oblastech, patří do čeledi *Poaceae* (lipnicovité) (botany.cz [online]). Jedná se obilninu pěstovanou pro obilky, které jsou zdrojem škrobu. Rostlina také obsahuje glykosid dhurin, který je kyanogenní (Jahodář, 2011).

Extrakty *S. bicolor* o nižší koncentraci zpomalily líhnutí vajec *H. contortus*, avšak o vyšší koncentraci (>5-10 %) působily letálně. Mechanismus účinku je dán pravděpodobně snížením pH, což umožňují kyseliny obsažené v čiroku (kys. benzoová, kys. vanilová, kys. P-hydroxy benzoová). Vyšší pH je totiž potřebné k metabolickým procesům pro líhnutí. Zároveň ale *S. bicolor* obsahuje kondenzované taniny (katechin, prokyanidy), které mohou působit inhibičně nebo reagovat na povrchu parazita (Qadir et al., 2010).

2.6.2. Kapradiny s anthelmintickou aktivitou

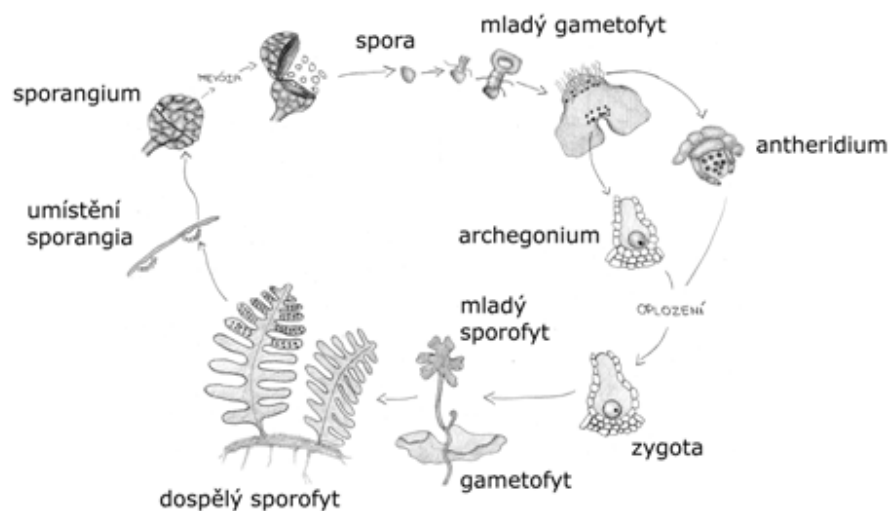
Kapradiny patří mezi jedny z nejstarších rostlin na Zemi, jejich fosilní záznamy sahají do doby prvohor, konkrétně středního devonu, doby před 383-393 miliony let (American fern society [online]). Společně s přesličkami a plavuněmi je řadíme mezi kaprad'orosty a jedná se o vyšší výtrusné cévnaté rostliny (Smatana, 2010 [online]).

Podzemní část kapradiny tvoří oddenek, který je většinou bohatě rozvětvený. Upevňuje rostlinu v zemi a poskytuje jí potřebné živiny a vodu. Zároveň vytváří zpeřené listy, jež jsou v mládí stočené do spirály. Na rozdíl od listů, které často opadávají, oddenek přežívá v zemi několik let. Jedná se tedy o vytrvalé rostliny (American fern society [online]).

Rozmnožování kapradin

U kapradin se v cyklu rozmnožování střídají dvě fáze lišící se počtem chromozomů. Haploidní fáze – označovaná „n“ má jednu sadu chromozomů a diploidní fáze – označovaná „2n“ má dvě sady chromozomů (Horných [online]).

Na počátku celého rozmnožování se nachází spora, která pochází z výtrusnice na rubové straně listu. Spora na zemi klíčí do gametofytu - jedná se o haploidní fázi rozmnožování. Gametofyt tvoří gamety - pohlavní buňky - vajíčka v archegoniích a spermatozoidy v antheridiích. Spermatozoidy pronikají do vajíček a dochází k oplození a vzniku zygoty. Tímto krokem začíná diploidní fáze neboli sporofytická, neboť došlo ke spojení dvou gamet. Zygota vyrůstá do sporofytu, která je charakteristická velkými listy, na jejíž spodní straně se nacházejí rozmnožovací útvary – sporangie. Ve sporangiích probíhá meióza neboli redukční dělení, vznikají dceřiné buňky s jednou sadou chromozomů. Tyto buňky jako spory vylétají do prostředí a celý proces rozmnožování se opakuje (Hornych [online]).



© Biomach

Obr. 3 Rozmnožování kapradin (Hornych [online]).

Jelikož jsou výtrusy velice lehké, tak se dostanou snadno pomocí větru na vzdálená místa, a tudíž kapradiny nalezneme po celém světě. Jejich výskyt ovlivňuje zejména teplota a vlhkost. Kapradiny mírné podnebního pásu dobře snáší i kruté mrazy. Nicméně tropické druhy by při takových podmínkách zahynuly. Výskyt kapradin je tedy velice rozmanitý v závislosti na teplotě. Vlhkost je naopak důležitá podmínka pro růst všech druhů kapradin (Smatana, 2010 [online]).

V následující části se zaměřím na pět vybraných druhů kapradin, které vykazovaly potenciální antiproliferativní a anthelmintické účinky v rámci experimentální části této diplomové práce.

Athyrium distentifolium (papratka horská) – vzorek 5

Athyrium distentifolium, patřící do čeledi *Athyriaceae* (papratkovité) je mohutná opadavá kapraď dorůstající výšky až 1,5 m (botany.cz [online]).

Roste ve velkých trsech nejčastěji v horských oblastech. V Evropě se vykytuje na severu a dále např. v Alpách a Karpatech, tedy v pohoří (botany.cz [online]).

Kapradiny z rodu *Athyrium*, kterých je přibližně 250 druhů, se tradičně používají v medicíně na léčbu kašle, jako antiparazitika, anthelmintika a diuretika. Většina z nich obsahuje flavonoidy, fenoly, alkaloidy, steroidy, triterpeny a polysacharidy. U některých druhů byla také pozorována antioxidační aktivita a ovlivnění buněčné proliferace (Charlier et al., 2016).

Dryopteris aemula – vzorek 18

Dryopteris aemula patří do čeledi *Dryopteridaceae* (kapraďovitě). Jedná se o přibližně 75 cm vysokou rostlinu, která se vzhledově podobá známějšímu druhu kapraď samec (*Dryopteris filix-mas*) ze stejné čeledě (Hardy Fern Library [online]).

Vyskytuje se spíše v nížinách, daří se jí ve vlhkých kyselých půdách v oblasti řek a lesů. Bohatě roste v severní Evropě, zejména ve Velké Británii a Irsku (Hardy Fern Library [online]).

U rodu *Dryopteris* byly prokázány anthelmintické, antivirové, antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky. Obsahují velké množství sloučenin, z nichž byly identifikovány floriglucinoly, flavonoidy, terpenoidy, steroidy, fenoly a fenolické glykosidy (Han et al., 2015).

Davallia canariensis – vzorek 27

Davallia canariensis spadající do čeledi *Davalliaceae* je kapradina s charakteristickým plazivým, částečně nadzemním oddenkem (botany.cz [online]).

Její výskyt je typický pro Makaronéské ostrovy, Maroko a Pyrenejský poloostrov, kde roste na vlhkých stinných místech, ale i skalách, do nadmořské výšky přibližně 600 m (botany.cz [online]).

Kapradiny rodu *Davallia* mají antioxidační a protizánětlivé účinky. Většina z nich obsahovala zejména xantony, flavonoidy a triterpeny (Chen et al., 2008).

Polystichum aculeatum (kapradina laločnatá) – vzorek 43

Polystichum aculeatum z čeledi *Dryopteridaceae* (kaprad'ovitě) je vzácně se vyskytující se druh kapradiny, který je řazen mezi ohrožené druhy (botany.cz [online]).

Roste spíše v lesních a horských oblastech v Evropě a Asii (botany.cz [online]).

Dryopteris dilatata (kaprad' rozložená) – vzorek 12

Dryopteris dilatata je druh kapradiny patřící do čeledi *Dryopteridaceae* (kaprad'ovitě) (botany.cz [online]).

Vyskytuje se téměř po celé Evropě, nejvíce roste ve smrkových a bukových lesích. V Maďarsku a Srbsku je chráněna zákonem (botany.cz [online]).

Kořen tohoto druhu obsahuje filicin, látku, která způsobuje paralýzu tasemnic a dalších parazitických červů. Jedná se o vysoce toxickou substanci, proto by měla být používána s opatrností. Výluh z listů se používá k oplachu vlasů a pro ošetření lupů (Plants For A Future [online]).

Rostlina obsahuje thiaminázu, což je enzym, který zvyšuje vylučování vitamínu B. Častá konzumace většího množství čerstvé rostliny může vést

k vážným zdravotním problémům. Nicméně vhodnou tepelnou úpravou a sušením se enzym inaktivuje. Tento enzym obsahuje i výše uvedený druh *Polystichum euculatum* (Plants For A Future [online]).

2.7. Alternativní metody řešení infekce

Výživa

Dobře živěná zvířata mají větší šanci odolat infekci než špatně živěná zvířata. Výživa hraje nespornou roli ve schopnosti organismu odolávat parazitům. Zároveň dobře živěné zvíře se dokáže lépe vyrovnat s fyziologickými účinky, které parazit vyvolává. Pro dobrou imunitní odpověď jsou důležité bílkoviny, pokud jich je nedostatek vede to k nedostatečné imunitní odpovědi a vyšší náchylnosti k infekci (Miller a Kaplan, 2012). Je vhodné používat doplňky stravy bohaté na bílkoviny, zejména methionin a leucin (Naeem et al., 2021). Kromě proteinů lze doplnit ve stravě i stopové prvky jako je železo, zinek, měď a molybden, jelikož tyto prvky zvyšují odolnost vůči infekci (Stear et al., 2007).

Živiny se vstřebávají ve střevech a odtud putují tam, kde je to nejvíce potřeba (růst, březost, laktace apod.). Někteří střevní parazité ovlivňují střevní tkáň tím, že narušují sliznici střeva a dochází tedy k horší absorpci živin, tím pádem parazit využívá více tělesných zásob hostitele (Miller a Kaplan, 2012).

Míchání druhů hospodářských zvířat

Většina hlístic má specifického hostitele, proto je vhodné míchat různé druhy hospodářských zvířat na pastvině. Pokud se pasou například ovce s koňmi, konzumují navzájem své hlístice, ale hlístice koní neinfikují ovce a naopak. Výjimku v této strategii tvoří ovce a kozy, jelikož mají spoustu parazitů společných a jejich mísení tedy vede k zhoršení problému rezistence (Miller a Kaplan, 2012).

Rotace pastvin

Rotace pastvin se používá zejména u zvířat, která potřebují potravu bohatou na živiny pro růst a vývoj. Většinou probíhá střídání pastvin po 30 dnech, což je ideální doba pro regeneraci pozemku. 30denní interval je také doba potřebná pro vytvoření nejvyšší kontaminace pastviny, takže tato rotace může také vést

k vyšší náchylnosti k infekci. V tropických a subtropických oblastech se rotace provádí po 3 měsících, protože larvy mají relativně kratší životnost za horkých podmínek. Bohužel tento interval není vhodný pro efektivní využití krmiva (Miller a Kaplan, 2012).

Částice oxidu měďnatého

Částice oxidu měďnatého se používají v USA k léčbě nedostatku mědi u skotu (Miller a Kaplan, 2012). Zároveň podávání těchto částic vede ke snížení počtu vajíček parazita ve stolici. Toto snížení je možné pozorovat už po 7 dnech podávání mědi (Burke a Miller, 2020). Částice se nejlépe podávají orálně v želatinových kapslích, ale mohou být také přimíchány do krmiva. Dávkování se pohybuje od 0,5 g do 2 g pro dospělé ovce a kozy. Jelikož ovce jsou hodně citlivé na měď, je potřeba dbát zvýšené opatrnosti při této léčbě, naopak kozy jsou méně citlivé a toxicita zde tedy nehrozí (Miller a Kaplan, 2012). Indikátorem toxicity mědi je jaterní enzym aspartátaminotransferáza, jehož hodnoty se doporučuje sledovat při terapii (Burke a Miller, 2020).

Genetická selekce

Odolnost zvířat vůči infekci má genetický základ. I když je dědičná, chovatelé ji mohou zvýšit tím, že nechají utratit nejcitlivější jedince. Vyřazení silně infikovaných zvířat pomocí systému FAMACHA eliminuje geny citlivosti, které tato zvířata přenáší (Miller a Kaplan, 2012).

Tento genetický proces vyžaduje čas, nicméně z dlouhodobého hlediska se jeví jako velice efektivní. Vede k méně častému používání anthelmintik a k zachování jejich účinnosti v případě potřeby (Miller a Kaplan, 2012).

Zároveň existují i plemena, u kterých byla prokázána relativní odolnost vůči nematodám. Jsou jimi některá plemena ovcí, například Red Masai, St. Croix nebo Katahdin. U koz jsou to například East African Dwarf nebo Saanen. U těchto plemen je potřeba zvážit i hospodářský přínos, jelikož mohou být méně produktivní (Miller a Kaplan, 2012).

Houby chytající hlístice

Houby chytající hlístice se vykytují běžně v půdách po celém světě. Tyto houby se živí hlísticemi žijícími v půdách. Produkují lepkavé hyfové pasti, do kterých se hlístice zachytí a následně dochází k jejímu usmrcení. Aby docházelo i k hubení larev, musí být houby přítomny ve velké míře ve výkalech. Toto se dá dosáhnout krmením zvířat spory plísní. Spory prochází trávicím traktem bez změny a vyklíčí ve výkalech, kde mohou vylahčovat a zabíjet larvy (Miller a Kaplan, 2012).

Duddingtonia flagrans je jedna z hub chytajících hlístice, která je dostupná na trhu. Její použití je účinné a ekologicky bezpečné, nicméně produkty s jejím obsahem jsou cenově stále těžce dostupné (Burke a Miller, 2020).

Vakcíny

Díky moderním technologiím byl získán antigen ze střevní sliznice *H. contortus* a tento objev umožnil vývoj vakcín (Miller a Kaplan, 2012).

Protilátky z očkování jsou přijímány hlísticemi během krmení v těle hostitele a napadají antigeny na střevní sliznici parazita. Tímto dochází k buněčnému poškození, které zhoršuje schopnost parazita přijímat živiny pro růst a přežití (Miller a Kaplan, 2012).

Antigeny bohužel imunitní systém hostitele nerozpozná, jelikož jsou dobře ukryty uvnitř těla parazita (Miller a Kaplan 2012). Je tedy nutné provádět opakované očkování pro zachování vysoké hladiny specifických protilátek cirkulujících v krvi (Ehsan et al., 2020).

Jistou komplikací ve vývoji vakcín je také fakt rozsáhlé genetické variace parazitů a jejich imunoregulačních schopností, proto se nové technologie zaměřují spíše na vývoj molekulárních vakcín (Ehsan et al., 2020).

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) Stanovit cytotoxický účinek vybraných vzorků kapradin na buněčné linii SW480 v různých časových intervalech
- 2) Stanovit anthelmintický účinek vybraných vzorků kapradin na larvách parazita *Haemonchus contortus*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Cytotoxické účinky kapradin

4.1.1. Materiál a chemikálie

Buněčné linie SW480 – (ATCC, UK)

Extrakty kapradin – izolovány Dr. Langhasovou z Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd, ČR v Praze

DMEM High glucose – (Sigma-Aldrich, ČR)

FBS – (Lonza, ČR)

HEPES – (Sigma-Aldrich, ČR)

Penicilin-streptomycin – (Lonza, ČR)

PBS – (Sigma-Aldrich, ČR)

Trypsin – EDTA (Lonza, ČR)

DMSO – (Sigma-Aldrich, ČR)

Trypanová modř – (Biotech, ČR)

WST – (Sigma-Aldrich, ČR)

4.1.2. Pomůcky a přístroje

4.1.2.1. Pomůcky

sterilní kultivační lahve, sterilní mikrotitrační destičky – 96 jamek, pipety manuální a automatické (jednokanálové i multikanálové), špičky na pipety (sterilní i nesterilní), pipetor, kádinky, mikrozkušavky, Bürkerova komůrka, vaničky pro multikanálovou pipetu, stojan na zkumavky, kahan, jednorázové rukavice

4.1.2.2. Přístroje

Laminární box (BioAir AURA 2000 M.A.C.)

Vodní lázeň (Mettler)

Inkubátor (Heraeus Heraeus Heracell 150)

Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100)

Odsávačka (Safevac 2.0)

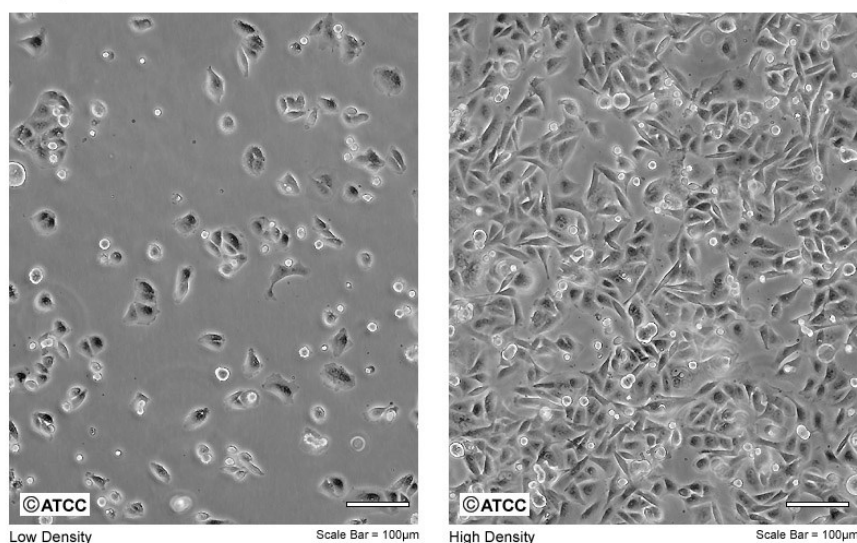
Spektrometrický analyzátor Tecan infinite 200 PRO

4.1.3. Metodika

4.1.3.1. Buněčné linie

SW480 je buněčná linie, která byla původně získána z primárního adenokarcinomu tlustého střeva. Buňky byly izolovány z tkáně padesátiletého muže (American type cell culture collection [online]).

ATCC Number: **CCL-228**
Designation: **SW 480**



Obr. 4 Nádorová linie SW480 (American type cell culture collection [online])

4.1.3.2. Kultivační médium

Buněčná linie potřebuje pro růst specifické podmínky, proto je důležitý výběr kultivačního média. Pro buňky se používalo kultivační

médium DMEM high glucose s vysokým obsahem glukózy (4,5 g/l) a L-glutaminu. Nezbytnou součástí média je fetální bovinní sérum (FBS), které je důležité pro dělení a růst buněk. Další součástí je antibiotikum, v tomto případě penicilin/streptomycin, které zabraňuje infekci, a tedy zániku celé kultury.

K 450 ml DMEM high glucose média se přidalo 50 ml FBS, 5 ml antibiotika penicilin/streptomycin a 5 ml pufru HEPES. Médium bylo promíchané a skladované v lednici při teplotě 2-8°C.

4.1.3.3. Pasážování buněk

Pasážování buněk bylo prováděno dvakrát týdně.

Přibližně 20 minut před samotnou prací bylo potřeba vysvítit laminární box UV zářením, aby došlo k likvidaci germicidních zárodků a zabránilo se kontaminaci. Mezitím se se dalo zahřát do vodní lázně médium, PBS a Trypsin těsně před prací.

Po 20 minutách se do vysvíceného laminárního boxu přenesly buňky, zahřáté médium, PBS a Trypsin. Dále byly připraveny pipety, odpadní kádinka, případně nová kultivační lahev. Víko lahve s buňkami bylo opáleno a obsah se přelil do odpadní kádinky. Dvakrát se vnitřek propláchl 7 ml PBS, obsah se vždy vylil do odpadní kádinky a víko bylo opáleno. Nakonec se přidalo 7 ml Trypsinu, lahev se uzavřela a byla vložena přibližně na 5 minut do inkubátoru.

Průběžně se buňky pod mikroskopem zkontrolovaly, zda se pouští ze dna kultivační láhve. Po sklepnutí buněk se dovnitř lahve přidalo 5 ml média a provedla se homogenizace celého obsahu. Po dostatečné homogenizaci se celý obsah lahve nabral do pipety a uvnitř lahve se nechal 1 ml. Zbytek obsahu se použil na pokusy, případně přenesl do odpadní lahve. K 1 ml buněk v lahvi se přidalo 12 ml nového média, lahev byla uzavřena a vložena do inkubátoru.

4.1.3.4. Počítání buněk

Z kádinky odložených buněk na pokusy bylo odebráno 10 μ l do mikrozkuhavky a v poměru 1:1 smícháno s Trypanovou modří. Směs byla zhomogenizována a napipetovala se do Bürkerovy komůrky.

Bürkerova komůrka je speciální podložní sklíčko tvořeno soustavou čtverců. Tvoří ji 9 velkých čtverců ohraničených třemi čarami a v každém tomto čtverci je 16 malých čtverců ohraničených dvěma čarami.

Bürkerova komůrka s buňkami se přenesla pod mikroskop a počítaly se buňky ve všech velkých čtvercích. Počítají se buňky uvnitř malých čtverců a na horním a levém mezihraní, buňky na dolním a pravém mezihraní se nepočítají.

Podle vzorce byla vypočítána koncentrace buněk na ml:

$$c = \bar{x} \cdot 2 \cdot 10^4$$

c ... počet buněk v 1 ml

\bar{x} ... průměrný počet buněk v 1 velkém čtverci

2 ... zředění

10^4 ... přepočítání na 1 ml

4.1.3.5. Nasazování buněk

Po výpočtu koncentrace byla připravena suspenze buněk pro experiment. Na 1 destičku bylo potřeba přibližně 10 ml suspenze. Používala se 96 jamková destička, 100 μ l suspenze se pipetovalo do 60 jamek, vynechaly se krajní jamky. Množství buněčné suspenze bylo dopočítáno dle vzorce:

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

c_1 ... koncentrace buněk námi spočítaná

V_1 ... potřebný objem buněčné suspenze

c_2 ... koncentrace buněk, která je potřebná pro experiment (20 000 buněk/jamka)

V_2 ... objem potřebný na jednu destičku (10 ml)

Objem potřebného média byl zjištěn rozdílem $V_2 - V_1$. Následně se připravila buněčná suspenze, která byla pipetována na destičku. Destička se poté vložila do inkubátoru na 24 hod. a druhý den došlo k ovlivňování buněk příslušnými látkami.

4.1.3.6. Ovlivňování buněk

Po 24 hod. kultivaci se ze všech jamek destičky opatrně odsál tekutý obsah. Poté se do každé jamky napipetovalo 100 μ l roztoku kapradiny v médiu zředěného na příslušnou koncentraci.

Roztoky kapradin byly připravovány do osmimístné vaničky pro multikanálovou pipetu. Na jednu destičku bylo potřeba 1 μ l kapradiny o příslušné koncentraci rozpuštěné v 1 ml média. Kapradiny se používaly v koncentraci 10, 50, 100 a 200 μ g/ml.

Jako negativní kontrola byl používán 20% roztok DMSO v médiu. Jako pozitivní kontrola bylo používáno čisté médium.

Následně se buňky nechaly kultivovat v požadované době 24, 48 a 72 hod.

4.1.3.7. Test WST

Po 24, 48 a 72 hod. se veškerý obsah z jamek odsál pomocí odsávačky. Poté se do jamek pipetovalo 100 μ l 20x zředěného WST v médiu.

WST je tetrazolová sůl, která se štěpí na rozpustný formazan pomocí buněčného mechanismu, který se nachází především na buněčném povrchu. Tato přeměna závisí především na glykolytické produkci NAD(P)H v živých buňkách. Množství formazanu tedy přímo

koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kolonii (Interchim [online]).

Destička s napipetovaným WST se nechala 1 hodinu inkubovat a následně se kvantifikovalo vytvořené formazanové barvivo pomocí spektrofotometru Tecan Infinite 200 PRO. Spektrofotometr měří absorbanci ve dvou vlnových délkách, 440 nm a 600 nm, výslednou absorbancí je rozdíl mezi nimi, kterou přístroj rovnou odečítá. Naměřená absorbance přímo koreluje s množstvím životaschopných buněk.

4.2. Anthelmintické účinky kapradin

4.2.1. Materiál a chemikálie

Larvy *Haemonchus contortus* stádium L3 – (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy)

12,5% (v/v) NaClO – (Sigma-Aldrich, ČR)

sterilní PBS – (Sigma-Aldrich, ČR)

sterilní médium Luria-Bertani (LB) – (VWR Chemicals, ČR)

Extrakty kapradin – izolovány Dr. Langhasovou z Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd, ČR v Praze

monepantel – (Toronto Research Chemicals, Kanada)

DMSO – (Sigma-Aldrich, ČR)

Sterilní voda – (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy)

Lugolův roztok – (Sigma-Aldrich, ČR)

4.2.2. Pomůcky a přístroje

4.2.2.1. Pomůcky

sterilní mikrotitrační destičky – 96 jamek, pipety manuální a automatické (jednokanálové i multikanálové), špičky na pipety (sterilní i nesterilní), pipetor, kádinky, mikrozkušavky, na zkumavky, jednorázové rukavice, podložní sklička

4.2.2.2. Přístroje

Centrifuga (Heraeus Biofuge Stratos)

Inkubátor s CO_2 (Heraeus Heracell 150)

Laminární box (BioAir AURA 2000 M.A.C.)

Mikroskop (Nicon Eclipse TS 100)

4.2.3. Metodika

4.2.3.1. Získávání L3

Trus nakažených ovcí obsahující vajíčka *H. contortus* se rozprostřel do plastových boxů, přikryl fólií a nechal v inkubátoru při 27°C po dobu 7 dní. Trus se poté dvakrát promyl vodou, která byla přelita do 1 l kónických odměrek, ve kterých larvy klesaly ke dnu. Po odstranění nečistot, popř. mrtvých jedinců byly larvy filtrovány přes 20 μm síto. Čisté larvy o koncentraci přibližně 2000 L3/ml jsou uchovávány v kultivačních lahvích ve vodě při 7°C po dobu několika měsíců.

4.2.3.2. Odpouzdření L3

Odebralo se 3 ml L3 do mikrozkušavky a přidalo se 12,5% (v/v) NaClO, v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,15% (v/v) NaClO. Tzn. ke 3 ml suspenze L3 bylo přidáno 36 μl 12,5% (v/v) NaClO. Suspenze se silně protřepala a nechala inkubovat 20 minut při 38 °C.

Poté se centrifuga nastavila na 1700 rpm, 5 minut, akcelerace 9 a brzdění 1. Svlečené larvy xL3 se nechaly poprvé zcentrifugovat. Zkontrolovalo se odpláštění pod mikroskopem.

Následně se v laminárním boxu opatrně odlil supernatant a larvy se resuspendovaly v 3 ml PBS. Opět se provedla centrifugace larev a následné přidání 3 ml PBS, celkem 4x.

Po 5. stočení se larvy resuspendovaly v malém množství LB, předehřátém na 37 °C. LB je sterilní médium Luria-Bertani, které navíc obsahuje antibiotika penicilin, streptomycin a amfotericin. Jedná se o nutričně bohaté médium, které se bez antibiotik používá pro růst bakterií.

4.2.3.3. Počítání xL3

Ze suspenze se odebralo 5 μ l a toto množství se rozdělilo do několika kapiček na podložní sklíčko. Spočítalo se množství larev v 5 μ l a přepočítalo se to na celkovou koncentraci. Tzn. u tohoto experimentu bylo 3200 larev v 1 ml, žádoucí je množství 1200 xL3 v 1 ml. Přidalo se tedy 1,6 ml, aby celkové množství suspenze bylo 2,6 ml.

4.2.3.4. Nasazování a ovlivňování xL3

Připravilo se celkem 11 mikrozkušavek. 9 mikrozkušavek pro roztoky kapradin, kde se do každé z nich napipetovalo 200 μ l LB a 0,4 μ l kapradiny. Jedna zkumavka pro negativní kontrolu DMSO 100 μ g/ml a poslední zkumavka pro pozitivní kontrolu 20 μ M monepantel.

Na 96 jamkovou destičku se napipetovalo 50 μ l z každé zkumavky do tří jamek. Ke každé látce se přidalo 50 μ l suspenze xL3 z předchozího experimentu. Během pipetování se larvy vždy protřepaly, aby bylo rovnoměrné množství larev (60 larev/jamka) ve všech jamkách. Do okolních jamek se napipetovala sterilní voda a destička se nechala inkubovat po dobu 7 dní, při 38 °C.

4.2.3.5. Počítání xL3 a L4

Po 7 dnech inkubace se do každé jamky s larvami přidalo 10 μ l 1% Lugolova roztoku, aby došlo k usmrcení a znehybnění larev pro počítání.

Na podložní sklíčko se do několika kapek rozdělil obsah každé jamky. Pro každou látku bylo zjištěno množství larev xL3 a vyvinutých L4.

4.3. Statistická analýza dat

Cytotoxicita extraktů z kapradin byla stanovena na buněčných liniích změřením absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite 200 PRO, pro každý extrakt byla provedena tři nezávislá měření. Výsledky byly zpracovány v programu Excel. Grafy a statistické zhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9. Pro zhodnocení signifikantních rozdílů byla použita metoda Ordinary one-way ANOVA s *post hoc* testem dle Holm-Sidaka. Za statisticky významné byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti $P \leq 0,05$. Pro stanovení teoretických hodnot IC_{50} byla data proložena nelineární křivkou (Nonlin fit) pomocí programu Graph Pad. Anthelmintické účinky kapradin byly vyhodnoceny pozorováním v mikroskopu a jsou vyjádřeny jako % vyvinutých larev L4 z celkového množství použitých larev xL3.

5. VÝSLEDKY

Účinky extraktů z kapradin byly testovány na buněčné linii SW480 a na larvách L3 *Haemonchus contortus*.

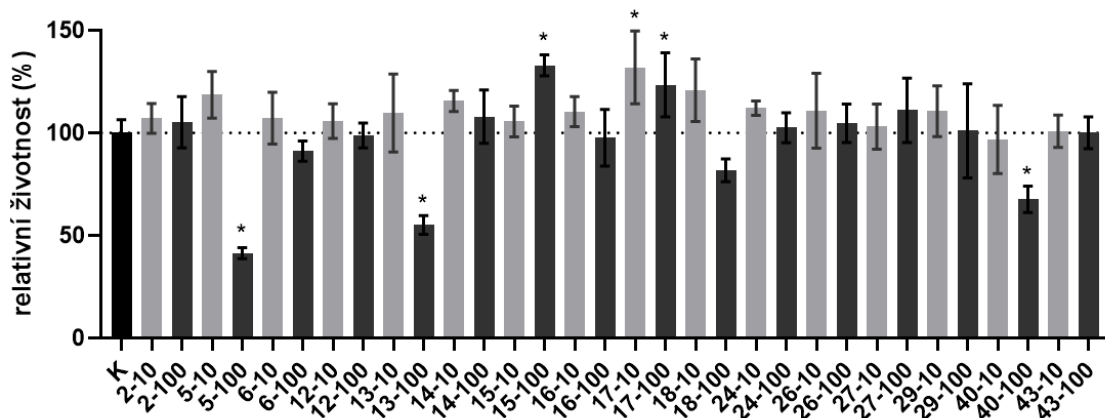
Buněčná linie SW480 byla použita pro stanovení cytotoxicity použitých kapradin. Bylo vypočítáno % živých buněk. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafech jako závislost životnosti buněk na koncentraci látek ($\mu\text{g/ml}$).

Anthelmintické účinky extraktů z kapradin byly testovány na larvách *H. contortus* L3, konkrétně působení na vývoj odpláštěných larev xL3 do dalšího stádia larvy L4. Larvy byly spočítány pro každou látku pomocí mikroskopu a bylo zjištěno množství larev xL3 a L4. Bylo vypočítáno % vyvinutých larev L4. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafu jako závislost vyvinutých L4 na koncentraci látek ($100 \mu\text{g/ml}$).

5.1. Cytotoxické účinky kapradin

5.1.1. Úvodní screening

V prvotním testu byla buněčná linie SW480 vystavena látkám ve dvou koncentracích po dobu 72 hod. Jako pozitivní kontrola bylo používáno médium obsahující 0,1% DMSO, odpovídající koncentraci DMSO v ovlivňovaných vzorcích. Jako negativní kontrola byl použit 20% roztok DMSO v médiu. Obecně lze říct, že většina kapradin neměla na buněčnou linii žádný účinek. Pouze tři extrakty vykazovaly signifikantní cytotoxický účinek při vyšší koncentraci. Několik extraktů naopak dokonce růst buněk podpořilo (Graf č.1).

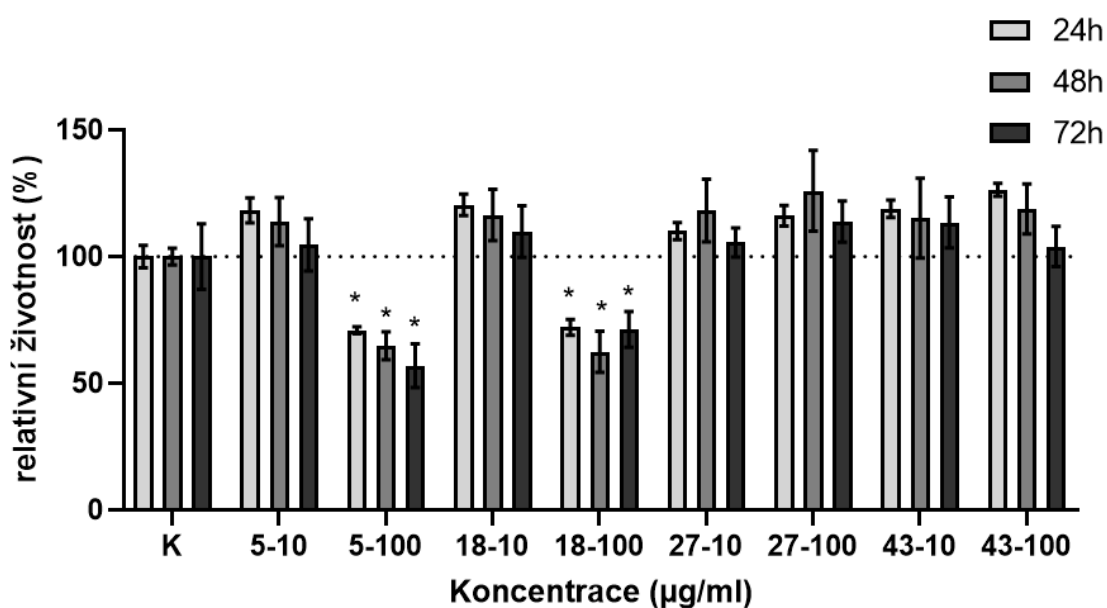


Graf č. 1 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] jednotlivých extraktů kapradin

Kapradiny (označené číslem) byly použity v koncentraci 10 µg/ml a 100 µg/ml. Signifikantní rozdíl oproti kontrole (100% životnost) je označen *, $P \leq 0,05$. (Měření provedla školitelka diplomové práce doc. Petra Matoušková)

5.1.2. Screening vybraných extraktů kapradin při různých časových intervalech

Z úvodního screeningu byly vybrány čtyři extrakty kapradin, které vykazovaly nejvyšší cytotoxický účinek. Tyto extrakty byly podrobeny testování ve třech časových intervalech 24, 48 a 72 hod (Graf č.2).

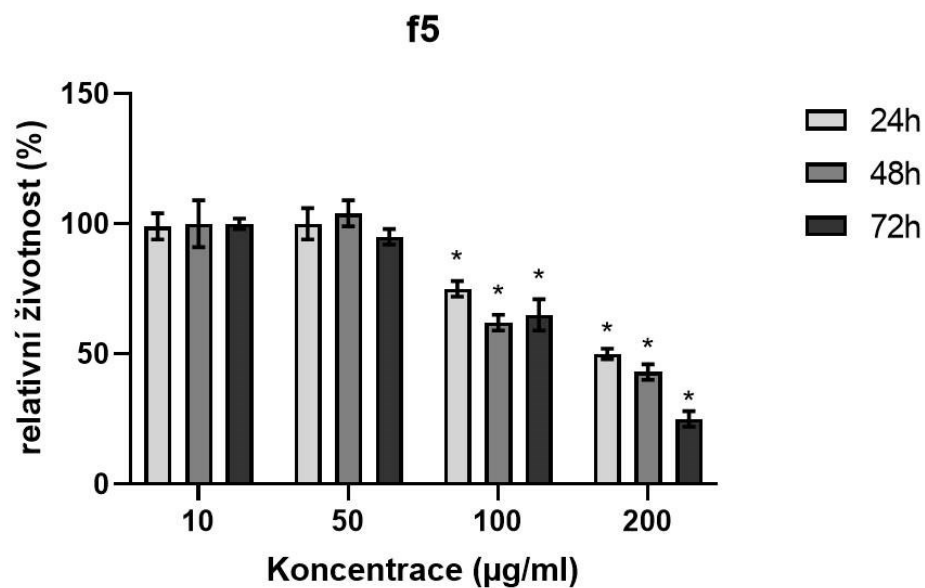


Graf č.2 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] u čtyř vybraných vzorků kapradin (5, 18, 27 a 43)

Kapradiny (označené číslem) použité v koncentracích 10 µg/ml a 100 µg/ml byly podrobeny screeningu po dobu 24, 48 a 72 hod. Signifikantní rozdíl oproti kontrole (100% životnost) je označen *, $P \leq 0,05$.

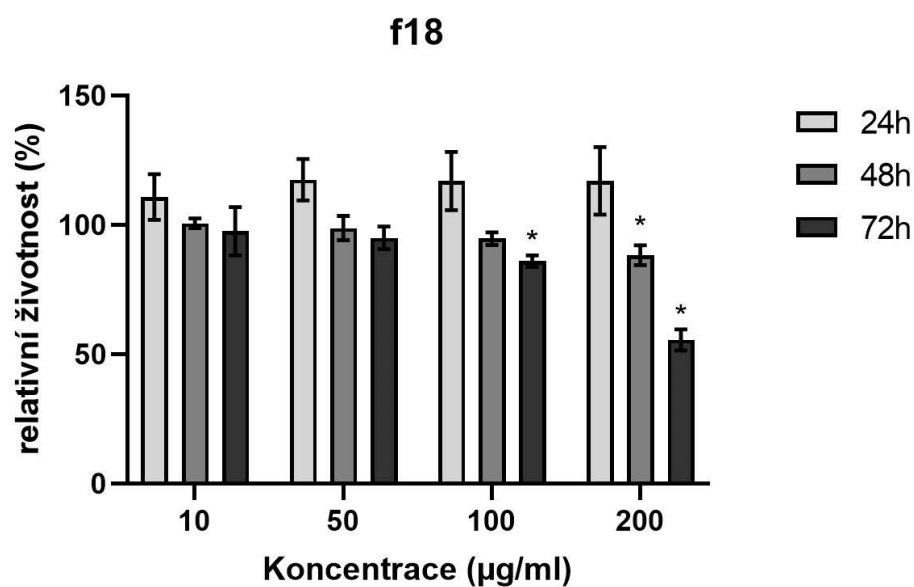
5.1.3. Screening vybraných extraktů kapradin v různých koncentracích

Kapradiny s významným cytotoxickým účinkem byly podrobeny důkladnějšímu screeningu ve čtyřech koncentracích a třech časových intervalech. Toto testování nám umožnilo určit přesnou koncentraci, ve které má extrakt nejvyšší cytotoxický efekt (Graf č. 3,4,5,6).



Graf č. 3 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] u vzorku kapradiny *f5* (*Athyrium distentifolium*)

Vzorek kapradiny *Arthyrium distentifolium* byl použit v koncentracích 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml a podroben screeningu po dobu 24, 48 a 72hod. * signifikantní rozdíl oproti kontrole (100 %), $P \leq 0,05$.



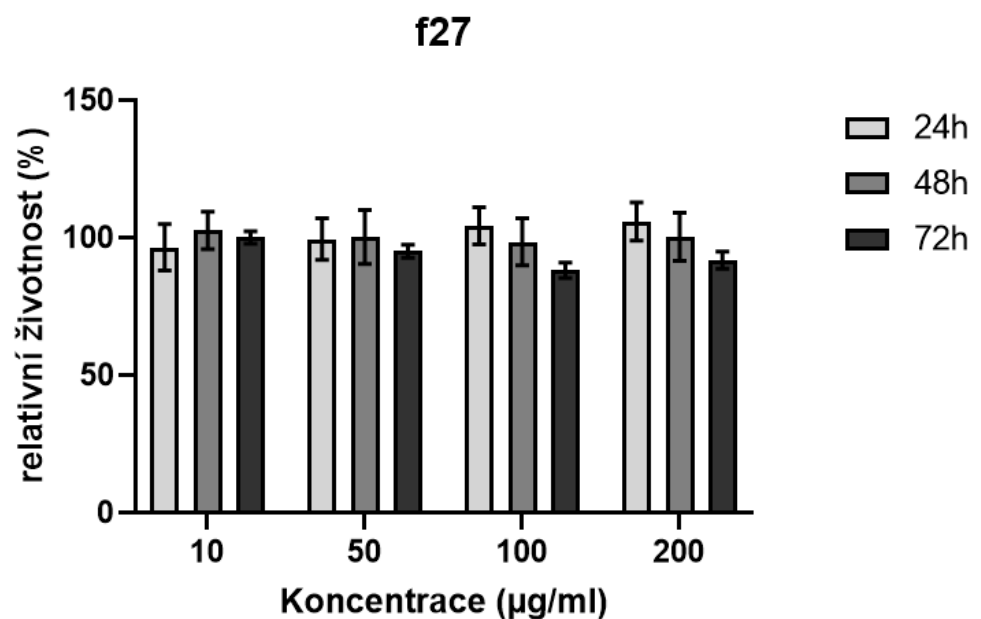
Graf č. 4 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] u vzorku kapradiny *f18* (*Dryopteris aemula*)

Vzorek kapradiny byl použit v koncentracích 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml a podroben screeningu po dobu 24, 48 a 72hod. * signifikantní rozdíl oproti kontrole (100 %), $P \leq 0,05$.

Z grafů vybraných vzorků kapradin f5 a f18 vyplývá, že s vyšší koncentrací kapradiny a rostoucím časovým intervalem cytotoxický účinek roste. Ze získaných dat lze přibližně vypočítat hodnoty IC_{50} (koncentrace, při které dochází k usmrcení 50 % buněk v porovnání s kontrolou, kde je 100% životnost). Nicméně nelze stanovit přesně jelikož nemáme koncentraci, která by zabíjela 100 % buněk (potřebné pro výpočet ideální sigmoidní křivky). U f18 po 24 h. nelze tuto hodnotu stanovit podobně jako u následujících vzorků f27 a f43.

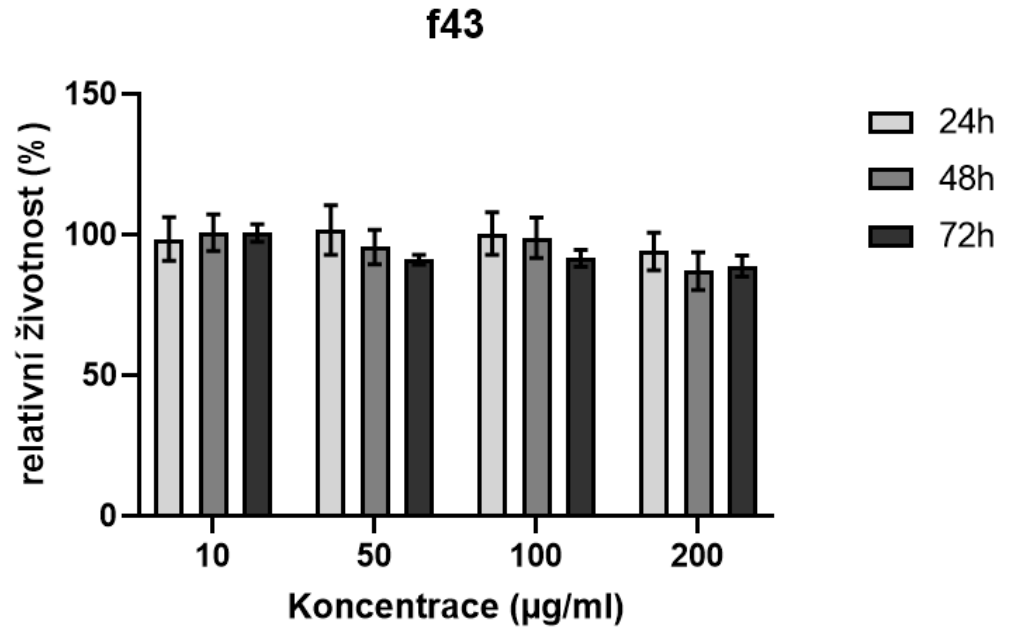
Tab. č. 2 Hodnoty IC_{50} pro kapradiny f5 a f18

IC_{50}	24 h. (µg/ml)	48 h. (µg/ml)	72 h. (µg/ml)
f5	285,9	216,9	157,9
f18	-	1659	364,9



Graf č. 5 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] u vzorku kapradiny f27 (*Davallia canariensis*)

Vzorek kapradiny byl použit v koncentracích 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml a podroben screeningu po dobu 24, 48 a 72hod.

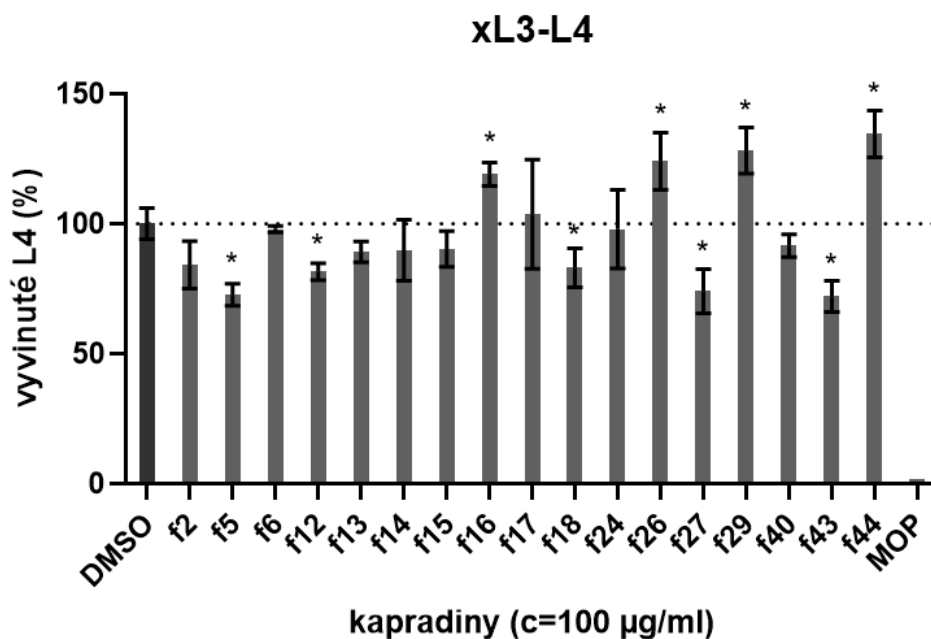


Graf č. 6 Závislost relativní životnosti buněk [%] na koncentraci [µg/ml] u vzorku kapradiny f43 (*Polystichum aculeatum*)

Vzorek kapradiny byl použit v koncentracích 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml a 200 µg/ml a podroben screeningu po dobu 24, 48 a 72hod.

5.2. Anthelmintické účinky kapradin

Larvy *Haemonchus contortus* byly vystaveny extraktům kapradin po dobu 7 dnů. Jako pozitivní kontrola byl použit 20 μ M monepantel. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO ve stejné výsledné koncentraci jako u použitých látek. Hodnocení vývinu xL3 a L4 se provádělo mikroskopicky, pozorováním vývoje úst a jícnu (Obr. 5 a 6). V tomto testu byly opět použity všechny extrakty kapradin, avšak pouze v koncentraci 100 μ g/ml. Slabý anthelmintický účinek byl viditelný u vzorku kapradiny f5 (*Athyrium distentifolium*), f12 (*Dryopteris dilatata*), f18 (*Dryopteris aemula*), f27 (*Davallia canariensis*) a f43 (*Polystichum aculeatum*). Naopak některé kapradiny podpořily vývin larev xL3 do stádia larvy L4, konkrétně vzorek kapradiny f15 (*Dryopteris cambrensis*), f26 (*Polystichum setiferum*), f29 (*Matteuccia struthiopteris*) a f44 (*Polypodium vulgare*).



Graf č. 7 Závislost vyvinutých larev *H. contortus* L4 na vzorku kapradiny

Kapradiny byly použity v koncentraci 100 μ g/ml. Signifikantní rozdíl oproti kontrole je označen *, $P \leq 0,05$.



Obr. 5 Larva L3 *Haemonchus contortus* (měřítko: 0,33 $\mu\text{m}/\text{px}$)

Přední část je zašpičatělá, není vyvinutý jícn. Kontrolní pozorování larev, které jsou před svlékáním v pořádku.



Obr. 6 Larva L4 *Haemonchus contortus* (měřítko: 0,33 $\mu\text{m}/\text{px}$)

Je viditelný vývoj úst a jícnu, larva se nachází v okolí svlečených kutikul.

6. DISKUZE

Haemonchus contortus patří k nejrozšířenějším vnitřním parazitům ovcí a koz. Do organismu se dostává přímou konzumací larev L3, které pochází z trusu nakažených zvířat a nachází se na povrchu vegetace. Larvy parazitují v posledním žaludku přežvýkavců – slezu, kde sají krev a způsobují tak hostiteli anémie. Tyto infekce způsobují obrovské hospodářské ztráty na farmách po celém světě, neboť mohou vést ke snížení produkce a reprodukce zvířat, v mnohých případech končí i smrtí (Craig, 2009; Coop a Holmes, 1996).

Léčba a kontrola infekce spočívá v podávání anthelmintik. Nicméně jejich nadužívání a chybné dávkování vede k rozvoji rezistence. Bohužel ani objev nových léčiv nevedl ke zlepšení této situace. Proto se nabízí i jiné alternativní metody léčby a kontroly nad infekcí, kam mimo jiné patří i léčivé rostliny. Jejich výhodou je minimální výskyt nežádoucích účinků, nedochází k rozvoji rezistence, látky se mezi sebou dají libovolně kombinovat a mohou být i dobrým zdrojem živin.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit anthelmintické účinky extraktů z kapradin. Anthelmintické účinky byly zkoumány *in vitro* na larvách L3 *H. contortus*, které byly vystaveny látkám po dobu 7 dnů při 38 °C. Následně byla spočítána stádia larev L3 a L4 pomocí mikroskopu pro každou z testovaných kapradin. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Excel a vyjádřeny jako % vyvinutých larev L4 z celkového množství larev L3. Pět druhů kapradin významně ovlivnilo vývoj larvy L3 do stádia L4 a lze jim tedy přisoudit anthelmintickou účinnost. Jedná se o druhy *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris dilatata*, *Dryopteris aemula*, *Davallia canariensis* a *Polystichum aculeatum*.

Ve studii Z. Varádyové (2018) byla testována *in vitro* anthelmintická aktivita u 13 léčivých rostlin. Pro stanovení byly použity vejce *H. contortus*, které byly vystaveny methanolovým a vodním extraktům léčivých rostlin pro dobu 7 dnů při 27 °C. Poté byly spočítány podíly nevylihnutých vajec a larev stádia L1-L3 pod mikroskopem. Pro každý rostlinný extrakt byla stanovena LD₅₀, tedy dávka, při které dochází k úhynu poloviny (50 %) testovaných živočichů. Výsledkem studie bylo zjištění ovicidní a larvicidní aktivity u vybraných léčivých rostlin.

Jelikož se jedná o jiný rostlinný materiál nelze přímo porovnat výsledky anthelmintické aktivity, nicméně metodologie experimentu této práce a studie Z. Varádyové (2018) jsou podobné. Vejce/larvy *H. contortus* byly vystaveny látkám po dobu 7 dní, experimenty se navzájem liší inkubační teplotou o 10 °C. Vývin *H. contortus* z vajec do larvy L3 je ideální v teplotním rozmezí 25-38 °C. Teplota studie Varádyové (2018) probíhala při 27 °C, což ideálně kopíruje venkovní podmínky pro vývin. Studie této práce probíhala při 38 °C a jelikož se jedná od vývin larvy L3 do L4, který probíhá v hostiteli, tak tato teplota odpovídá teplotě těla hostitele. Vývin z vajec do larvy trvá přibližně 5-10 dní, 7denní inkubační doba se tedy jeví jako ideální v obou experimentech. Studie Z. Varádyové (2018) zkoumaly anthelmintickou aktivitu látek na jednotlivých stádiích *H. contortus*, což umožnilo zjistit také ovicidní účinky rostlin. Samice *H. contortus* vyprodukuje denně 5000-6000 vajec, která se dostanou do prostředí hostitele z trusu nakažených zvířat. Při vhodných podmínkách prostředí dochází k rychlému vývoji do infekčního stádia, kterým se nakazí další zvířata. Pokud látky mají inhibiční účinky na vejce, lze tím omezit množství budoucích infekčních stádií, což vede ke snížení rizika nákazy. Inhibice vývoje larvy L3 do stádia L4 umožňuje naopak snížit produkci těchto vajec. Obě experimentální studie tedy přinesly významné výsledky anthelmintické aktivity léčivých rostlin. Účinnost rostlin na jednotlivá stádia (od vajec do L4) umožňuje zjistit přesnější spektrum anthelmintického účinku. V dalších experimentech bude podobně jako v této studii sledována také účinnost extraktů kapradin na další stádia, například vývin vajíček v první/druhé larvální stádium.

Ve studii Z. Varádyové (2018) byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) pro kvantifikaci šesti rostlinných sekundárních metabolitů. Díky této metodě bylo možné tedy zjistit navíc možnou souvislost mezi metabolitem a anthelmintickou aktivitou.

Rostlinné extrakty byly ve studii Varádyové (2018) použity v šesti různých koncentracích. Tento fakt umožnil stanovení LD₅₀, tedy hodnoty, která nám přibližně charakterizuje toxicitu dané látky. V této diplomové práci byly použity kapradiny o jedné koncentraci 100 µg/ml. Nicméně díky tomuto experimentu se nám podařilo odhalit potenciálně anthelmintické látky, které by se daly použít v dalších experimentech, a tedy i ke stanovení LD₅₀.

Ve studii Ahmed, Laing a Nsahlai (2012) byla testována *in vitro* anthelmintická účinnost ethanolových extraktů 25 rostlin proti *H. contortus*. Nejprve proběhl prvotní screening ve třech koncentracích každé rostliny a následně bylo vybráno pět rostlin s nejvyšší anthelmintickou účinností, které byly podrobeny dalšímu testování o čtyřech různých koncentracích. U každé látky byla stanovena % účinnost pro každou koncentraci. Extrakty byly přidány k vejším *H. contortus* po 10denní inkubaci, která probíhala při 27°C. Podle těchto informací lze tedy soudit, že extrakty působily na již infekční stádium larvy L3 a jednalo se tedy o podobné podmínky jako v této diplomové práci.

Kromě *in vitro* studií je také vhodné provést *in vivo* studie. Za laboratorních podmínek se totiž zkoumané látky chovají jinak než v živém organismu. Například ve studii Hossen Molla (2016) byla zkoumána anthelmintická aktivita rostliny *Murraya koenigii in vitro* a také *in vivo*. Studie byla provedena na 24 ovcích obou pohlaví, které byly přirozeně infikované *H. contortus*. Ovce byly rozděleny do šesti skupin. Dvěma skupinám byl podáván methanolový extrakt *M. koenigii* o rozdílných dávkách (1,0 a 2,0 g/kg tělesné hmotnosti). Dalším dvěma skupinám byl podáván vodný extrakt rostliny, také v odlišných dávkách. Pátá skupina byla použita jako pozitivní kontrola a byl jí podáván levamisol o dávce 7,5 mg/kg. Šestá skupina nebyla léčena a sloužila tedy jako negativní kontrola. Skupiny byly od sebe izolovány a na studie byly připravovány po dobu 18 dní. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí FECRT testu. Od patnáctého dne došlo k významnému snížení počtu vajec ve stolici a byly tedy potvrzeny také *in vivo* účinky rostliny.

Druhá polovina experimentální části této diplomové práce je zaměřena na antiproliferativní účinky extraktů z kapradin. Pro experiment byla použita buněčná linie SW480, která byla původně získána z primárního adenokarcinomu tlustého střeva (American type cell culture collection [online]). Nádory tlustého střeva jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí na nádory. Standardní terapie je zaměřena na podávání cytotoxických léčiv, chemoterapii, radioterapii a chirurgii. Velkou nevýhodou chemoterapeutické léčby jsou její nežádoucí účinky, neboť působí i na zdravé proliferativní buňky, např. na vlasové folikuly, krevní buňky a střevní epitel. Léčba rostlinnými produkty by i v tomto případě mohla představovat vhodnou alternativu terapie s nižším výskytem nežádoucích účinků (Aiello, 2019).

Nejprve byl proveden úvodní screening, ve kterém byla buněčná linie vystavena 16 extraktům kapradin o dvou koncentracích 10 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 72 hod. Z tohoto screeningu byly vybrány čtyři extrakty, které byly použity do podrobnějšího testování ve třech časových intervalech (24, 48 a 72 hod.) a čtyřech různých koncentracích (10, 50, 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$). U dvou extraktů bylo možné stanovit hodnotu IC_{50} , tedy koncentraci, při které dochází k usmrcení 50 % buněk v porovnání s kontrolou, kde je 100% životnost. Nejvýznamnější cytotoxické účinky projevila kapradina *Athyrium distentifolium* ve všech časových intervalech. Druh *Dryopteris aemula* vykazoval významné cytotoxické účinky při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ v po 72 hod. působení. V dalších experimentech by mělo také proběhnout hodnocení toxicity kapradin na nenádorových liniích například střevních fibroblastů, hepatocytů pro vyloučení toxicity.

7. ZÁVĚR

U druhů *Athyrium distentifolium* a *Dryopteris aemula* byl prokázán cytotoxický účinek na buněčné linii SW480 a anthelmintický účinek na larvách L3 *H. contortus*.

U druhů *Davallia canariensis*, *Polystichum aculeatum* a *Dryopteris dilatata* byl prokázán anthelmintický účinek larvách L3 *H. contortus*.

8. TABULKA ROZKLÍČOVÁNÍ KAPRADIN

ČÍSLO VZORKU	DRUH KAPRADINY
f2	<i>Athyrium filix-femina</i>
f5	<i>Athyrium distentifolium</i>
f6	<i>Blechnum spicant</i>
f12	<i>Dryopteris dilatata</i>
f13	<i>Dryopteris borreri</i>
f14	<i>Dryopteris remota</i>
f15	<i>Dryopteris cambrensis</i>
f16	<i>Dryopteris expansa</i>
f17	<i>Dryopteris caucasica</i>
f18	<i>Dryopteris aemula</i>
f24	<i>Polystichum acrostichoides</i>
f26	<i>Polystichum setiferum</i>
f27	<i>Davallia canariensis</i>
f29	<i>Matteuccia struthiopteris</i>
f40	<i>Blechnum spicant</i>
f43	<i>Polystichum aculeatum</i>

9. SEZNAM ZKRATEK

DMSO – dimethylsulfoxid

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

FAMACHA – Francois „Fafa“ Malan Chart

FBS – fetální bovinní sérum

FEC – fecal egg count

FECRT – fecal egg count reduction test

GABA – γ -aminomáselná kyselina

GABA_{Cl} – chloridový kanál řízený γ -aminomáselnou kyselinou

Glu_{Cl} – chloridový kanál řízený glutamátem

HEPES pufr – 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethanesulfonic acid

HPLC – high performance liquid chromatography

LB - sterilní médium Luria-Bertani

LD₅₀ - dávka, při které dochází k úhynu 50 % testovaných živočichů

NAD(P)H - nikotinamidnukleotidfosfát

nAChR – nikotinový receptor pro acetylcholin

P-gp – P-glykoprotein

PBS – fosfátový pufr

PCV – packed cell volume

SNP – single-nucleotid polymorfism

TST – targeting selective treatment

WAAVP – World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

WST – water-soluble tetrazolium salt

10. POUŽITÁ LITERATURA

- AHMED M., LAING M.D., NS AHLAI I.V.: In vitro anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. *Journal of Helminthology*, 2013, Jun, 87(2), 174-179. doi: 10.1017/S0022149X1200020X
- AIELLO P., SHARGHI M., MASOURKHANI S.M., ARDEKAN A.P., JOUYBARI L., DARAEI N., PEIRO K., MOHAMADIAN S., REZAEI M., HEIDARI M., PELUSO I., GHORAT F., BISHAYEE A., KOOTI W.: Medicinal Plants in the Prevention and Treatment Colon Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Dec 4, 1-51. doi: 10.1155/2019/2075614
- BESIER R.B., KAHN L.P., SARGISON N.D., VAN WYK J.A.: Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, 2016, 93, 181-238. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.024
- BURKE J.M., MILLER J.E.: Sustainable Approaches to Parasite Control in Ruminant Livestock. *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 2020, 36(1), 89-107. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.11.007
- CHARLIER J., CLAEREBOU T E. & VERCRUYSS E J.: Gastrointestinal Nematode Infections in Adult Dairy Cattle, 2016. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00740-X
- CHEN Y.H., CHANG F.R., LIN Y.J., HSIEH P.W., WU M.J., WU Y.C.: Identification of antioxidants from rhizome of *Davallia solida*. *Food Chemistry*, 2008, 107(2), 684-691. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.066
- COOP R. L., HOLMES P.H.: Nutrition and parasite interaction. *International Journal for Parasitology*, 1996, 26 (8-9), 951-962. ISSN: 0020-7519. doi: 10.1016/s0020-7519(96)80070-1
- CRAIG T.M.: CHAPTER 22 - Helminth Parasites of the Ruminant Gastrointestinal Tract. *Food Animal Practice (Fifth Edition)*, Elsevier, 2009, 78-91. ISBN: 9781416035916. doi: 10.1016/B978-141603591-6.10022-3
- DOBŠÍKOVÁ R., ŠIROKÁ Z. & BLAHOVÁ J.: Farmakologie v produkci potravin pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie. *Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno*, 2012. ISBN: 978-80-7305-616-2

- DUCHÁČEK L., LAMKA J.: *Veterinární Vademecum pro farmaceuty*. Karolinum, 2014. ISBN: 978-80-246-2792-2
- EHSAN M., HU R.S., LIANG Q.L., HOU J.L., SONG X., YAN R., ZHU Q.X., LI X.: Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines*, 2020, 8(3), 555. doi: 10.3390/vaccines8030555
- GARCIA-BUSTOS J.F., SLEEBES B.E. & GASSER R.B.: An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1), 306. doi: 10.1186/s13071-019-3537-1
- HAN X., LI Z., LI C.Y., JIA W.N., WANG H.T., WANG C.H.: Phytochemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Dryopteris*. *Chemistry & Biodiversity*, 2015 Aug; 12(8), 1131-1162. doi: 10.1002/cbdv.201400157
- IHLER C.F.: Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2010, 52(1), S24. doi: 10.1186/1751-0147-52-S1-S24
- JAHODÁŘ L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*. Karolinum, 2011. ISBN: 978-80-246-2015-2
- JIAO Y., PRESTON S., HOFMANN A., TAKI A., BAELL J., CHANG B.C.H., JABBAR A., GASSER R.B.: A perspective on the discovery of selected compounds with anthelmintic activity against the barber's pole worm – Where to from here? *Advances in Parasitology*, 2020. 108, 1-45. doi: 10.1016/bs.apar.2019.12.003
- KAUFMANN J.: *Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual*. Springer Basel AG, 1996. ISBN: 9783764351151
- KÖHLER P.: The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31(4), 336-345. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00131-X
- KOTZE A.C., PRICHARD R.K.: Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Advances in Parasitology*, 2016, 93, 397-428. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.012

- MILLER J. E., KAPLAN R. M.: CHAPTER 6 – Internal Parasites. Sheep and Goat Medicine (Second Edition), Elsevier, 2012, 106-125. ISBN: 9781437723533. doi: 10.1016/B978-1-4377-2353-3.10006-X
- MOLLA S.H., BANDYOPADHYAY P.K.: In vitro and in vivo anthelmintic activity of *Murraya koenigii* againsts gastro-intestinal nematodes of sheep. Journal of Parasitic Diseases, 2016 Jun, 40(2), 362-368. doi: 10.1007/s12639-014-0510-y
- NAEEM M., IGBAL Z. & ROOHI N.: Ovine Haemonchosis: a review. Tropical Animal Health Production, 2021, 53(1). doi: 10.1007/s11250-020-02439-8
- PRICHARD R.K.: Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. Trends in Parasitology, 2001, 17(9), 445-453. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01983-3
- QADIR S., DIXIT A.K. & DIXIT P.: Use of medicinal plants to control *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. Veterinary World, 2010, 3(11), 515-518. doi: 10.5455/vetworld.2010.515-518
- RYŠAVÝ B.: Základy parazitologie. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. ISBN: 80-04-20864-9
- SALEHI B., EZZAT S.M., TSOUH FOKOU P.V., ALBAYRAK S., VLAISAVLJEVIC S., SHARIFI-RAD M., BHATT I.D., SHARIFI-RAD M., BELWAL T., AYATOLLAHI S.A., KOBARFARD F., ATA A., BAGHALPOUR N., MARTORELL M., SETZER W.N., SHARIFI-RAD J.: *Athyrium* plants - Review on phytopharmacy properties. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2019, 9(3), 201-205. doi: doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.09.001
- SARGINSON N.D.: Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep – Future of anthelmintic drugs. Veterinary Parasitology, 2012, 189(1), 79-84. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.035
- SINGH B., SHARMA R.A.: Secondary Metabolites of Medicinal Plants: Ethnopharmacological Properties, Biological Activity and Production Strategies, Volume 3. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2020. ISBN: 9783527825578

- SINGH D., SINGH B., GOEL R.K.: Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus religiosa*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 134(3), 565-583. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.046
- STEAR M.J., DOLIGALSKA M. & DONSKOW-SCHMELTER: Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 2007, 134(2), 139-151. doi: 10.1017/S0031182006001557
- VÁRADYOVÁ Z., PISARČÍKOVÁ J., BABJÁK M., HODGES A., MRAVČÁKOVÁ D., KIŠIDAYOVÁ S., KÖNIGOVÁ A., VADLEJCH J., VÁRADY M.: Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 2018, Dec, 195, 71-77. doi: 10.1016/j.exppara.2018.10.009
- VOLF P., HORÁK P. A KOL.: *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN: 978-80-738-7008-9
- WHITTAKER J.H., CARLSON S.A., JONES D.E., BREWER M.T.: Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2017, 40(2), 105-115. doi: 10.1111/jvp.12330
- ZAJAC A.M., GARZA J.: *Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants*. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2020, 36 (1), 73-87. ISSN: 07490720. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.005
- ZAJÍČKOVÁ M., NGUYEN L.T., SKÁLOVÁ L., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ L., MATOUŠKOVÁ P.: Anthelmintics in the future: current trends in the Discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discovery Today*, 2020, 25 (2), 430-437. doi: 10.1016/j.drudis.2019.12.007

Online zdroje:

- American fern society – About Ferns [online]. [cit. 2021-04-06]. Dostupné z: <https://www.amerfernsoc.org/about-ferns>
- American type cell culture collection (ATCC) – SW480 [online]. [cit. 2020-12-09]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Global/Products/A/C/6/1/CCL-228.aspx>

- Animal Diversity Web – *Haemonchus contortus* [online]. [cit. 2021-01-17]. Dostupné z: https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus_contortus/classification/
- BioLib - *Allium sativum* L. [online]. [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id41996/>
- BOTANY.CZ – *Coriandrum sativum*; *Sorghum bicolor*; *Ficus religiosa*; *Athyrium distentifolium*; *Davallia canariensis*; *Polystichum aculeatum*; *Dryopteris dilatata* [online]. [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://botany.cz/>
- farmer’s weekly - Use the FAMACHA system to control parasites [online]. [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://www.farmersweekly.co.za/agri-news/south-africa/use-the-famacha-system-to-control-parasites/>
- Hardy Fern Library - *Dryopteris aemula* [online]. [cit. 2021-04-11]. Dostupné z: https://hardyfernlibrary.com/ferns/listSpecies_Auto_20.html
- Herbal Store - *Azadirachta indica* (Neem) [online]. [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.herbal-store.cz/clanek/47/azadirachta-indica-neem/>
- HORNYCH O. - Životní cyklus kapradin [online]. Přírodovědecká fakulta JČU. [cit. 2021-04-06]. Dostupné: <https://botanika.prf.jcu.cz/systematics/pteridoweb/zivcyk.html>
- Interchim – Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs) [online]. [cit. 2020-12-09]. Dostupné z: <https://www.interchim.fr/ft/F/F98881.pdf>
- KAPLAN R.: Dewormer Chart for goats. University of Georgia, 2014. [online]. [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://www.wormx.info/dewormers>
- KAPLAN R.: Dewormer chart for sheep. University of Georgia, 2014. [online]. [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://www.wormx.info/dewormers>
- MACHEN R., CRADDOCK F., CRAIG T. & FUCHS T.: *A Haemonchus contortus* Management Plan for Sheep and Goats in Texas, 1998. [online]. [cit. 2021-01-16]. Dostupné z: <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/87719>
- National Center for Advancing Translation Sciences (NCATS) – Inxight: Drugs - Derquantel [online]. [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: <https://drugs.ncats.io/drug/0L0UGK6OOX>

- Plants For A Future - Dryopteris dilatata – (Hoffm.)A.Gray. [online]. [cit. 2021-05-15]. Dostupné z: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Dryopteris+dilatata>
- Pubchem – Monepantel. National Library of Medicine [online]. [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Monepantel>
- SMATANA, M. (2010): Paprade, prasličky, plavúne [online]. [cit. 2021-04-06]. Dostupné z: <https://www.szkt.sk/dokumenty/oznamy/2010/paprade.pdf>
- WILLIAMSON L.: Best Management Practices for Controlling Internal Parasites in Small Ruminants: Proper Dewormer Use. University of Georgia, 2019. [online]. [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://www.wormx.info/dewormers>