

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Využití nových *ex vivo* testů pro nalezení kapradin
s anthelmintickým účinkem**

Bc. Klára Bednářová

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Markéta Zajíčková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé školitelce paní prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Markétě Zajíčkové za odborné vedení, čas a cenné rady, které mi pomohly při zpracování diplomové práce.

Chtěla bych také poděkovat mé rodině a příteli za jejich podporu, trpělivost a věčný optimismus, který mi během psaní práce velmi pomohl.

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

V Hradci Králové 10.5.2022

Klára Bednářová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Klára Bednářová

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název: Využití nových *ex vivo* testů pro nalezení kapradin s anthelmintickým účinkem

Haemonchus contortus patří mezi celosvětově rozšířené hlístice parazitující v gastrointestinálním traktu malých přežvýkavců. Hlístice způsobují onemocnění zvané hemonchóza. Typickým příznakem onemocnění je anémie vznikající v důsledku sání krve hlísticemi. S onemocněním se také snižuje produktivita a může docházet k úmrtí hostitele. Pro léčbu hemonchózy se využívá pouze několik léčiv, počet nově zavedených léčiv je nízký. V dnešní době je stále větším problémem vznikající rezistence na anthelmintika právě díky vysoké adaptibilitě *H. contortus* a také nesprávnému užívání syntetických léčiv. Syntetická léčiva znečišťují životní prostředí, i proto je snaha nalézt rostlinné produkty s anthelmintickým účinkem.

U některých asijských a afrických kapradin byl prokázán anthelmintický účinek, proto jsme se rozhodli provést testy na průkaz anthelmintické aktivity u evropských druhů kapradin. U vybraných druhů se testoval anthelmintický účinek proti hlísticím, konkrétně *H. contortus* s využitím testu líhnutí vajíček a bioluminiscenční analýzy ATP u dospělců. Kapradiny, které snižovaly množství ATP u dospělců *H. contortus* jsou *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreri*, *Dryopteris cambrensis* a *Dryopteris aemula*.

Extrakty z těchto kapradin budou podrobeny dalšímu výzkumu.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Klára Bednářová

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The use of new *ex vivo* tests to find ferns with anthelmintic effect

Haemonchus contortus is one of the worldwide spread nematode parasitizing in the gastrointestinal tract of small ruminants. The nematodes cause a disease called haemonchosis. A typical symptom of the disease is anemia resulting from the sucking of blood by nematodes. The disease also reduces productivity and may result in the death of the host. Only a few drugs are used for the treatment of haemonchosis, the number of newly introduced drugs is low. Nowadays, the emerging resistance to anthelmintics is a growing problem due to the high *H. contortus* adaptivity as well as the incorrect use of synthetic drugs. In addition, the synthetic drugs pollute the environment, which is why there is an effort to find herbal products with an anthelmintic effect.

Anthelmintic activity has been demonstrated in some Asian and African ferns, so we decided to test the European fern species and evaluate their anthelmintic activity. Anthelmintic activity against nematodes, specifically *H. contortus*, was tested using egg hatch test and ATP bioluminescence assay in adults. Ferns that reduced the amount of ATP in adult *H. contortus* are *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreri*, *Dryopteris cambrensis* and *Dryopteris aemula*.

These fern extracts will be used in further experiments.

OBSAH

1.	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	<i>Haemonchus contortus</i>	9
2.1.1	Výskyt a význam	9
2.1.2	Morfologie	9
2.1.3	Životní cyklus	10
2.1.4	Onemocnění vyvolané <i>H. contortus</i>	11
2.1.5	Diagnostika onemocnění	14
2.1.6	Léčba a prevence infekce	15
2.2	<i>Vývoj nových anthelmintik</i>	18
2.2.1	Možnosti získání nových anthelmintik	18
2.2.2	Screening anthelmintické účinnosti	18
2.2.3	Další metody stanovení anthelmintické účinnosti	20
2.3	<i>Přírodní produkty s anthelmintickou účinností</i>	23
2.3.1	Rostlinné terpeny	24
2.3.2	Rostlinné fenoly	26
2.3.3	Přírodní látky z bakterií a hub	30
2.3.4	Výhody použití přírodních látek	31
2.3.5	Nevýhody použití přírodních látek	32
2.4	<i>Kapradiny s anthelmintickou účinností</i>	34
2.4.1	Asijské kapradiny	34
2.4.2	Africké kapradiny	35
2.4.3	Evropské kapradiny	36
3.	CÍL PRÁCE	40
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1	<i>Materiál</i>	41
4.1.1	Chemikálie	41
4.1.2	Biologický materiál	42
4.1.3	Spotřební materiál	43
4.2	<i>Pomůcky a přístroje</i>	43

4.3	<i>Metody</i>	44
4.3.1	Příprava pufrů a médií	44
4.3.2	Extrakce kapradin	46
4.3.3	Experimenty s <i>H. contortus</i>	47
5.	VÝSLEDKY	53
5.1	<i>Vliv extraktů z kapradin na líhnutí vajíček</i>	53
5.2	<i>Vliv extraktů z kapradin na viabilitu dospělců</i>	54
5.2.1	Screening anthelmintické účinnosti kapradin	54
5.2.2	Vliv vybraných kapradin na viabilitu dospělců	55
6.	DISKUSE	57
7.	ZÁVĚR	60
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	61
9.	SEZNAM TABULEK	64
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
11.	POUŽITÁ LETERATURA	66

1. ÚVOD

Haemonchus contortus patří mezi celosvětově rozšířené hlístice způsobující onemocnění malých přežvýkavců – převážně koz a ovcí. Typickým příznakem onemocnění, zvané hemonchóza, je anémie způsobená sáním velkého množství krve hostitele. Dochází ke snížení přírůstku dobytka, produkce mléka a vlny. Onemocnění může vést až ke smrti dobytka.

Léčba hemonchózy je založena na použití anthelmintik. Vlivem zvyšující se rezistence *H. contortus* na anthelmintika je léčba omezená pouze na některé druhy léčiv. Rezistence je způsobená vysokou adaptibilitou hlístic a také vysokým užíváním syntetických léčiv. Syntetická léčiva znečišťují životní prostředí, proto je snaha najít alternativní možnosti léčby.

Po staletí jsou rostliny využívány v lidovém léčitelství při léčbě různých onemocnění. Rostliny a přírodní látky jsou v současné době zkoumány jako potenciální anthelmintika, které mají možnost nahradit používaná léčiva. Obsahové látky rostlin s anthelmintickými účinky jsou terpeny, flavonoidy a taniny.

Jedna ze zkoumaných skupin s potenciálními anthelmintickými účinky jsou kapradiny. U některých z asijských a afrických druhů jsou tyto účinky již prokázány. Cílem této diplomové práce bylo prokázat, zda extrakty vybraných druhů evropských kapradin mají anthelmintický účinek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Haemonchus contortus*

Rod *Haemonchus spp.* byl popsán v roce 1803 Karlem Rudolphim. Z taxonomického hlediska patří tento rod do čeledi *Trichostrongylidae*. Spolu s *Teladorsagia spp.* patří mezi nejvíce patogenní hlístice malých přežvýkavců (Arsenopoulos et al, 2021).

2.1.1 Výskyt a význam

Haemonchus contortus je jedním z nevýznamnějších parazitů přežvýkavců s celosvětovou distribucí, který chovnému průmyslu skotu, ovcí a koz způsobuje velké ekonomické ztráty (Wang et al, 2017). Jedná se o krev sajícího parazita, což následně vede ke vzniku anémie a může vést až ke smrti hostitele. *H. contortus* patří mezi hlístice a způsobuje onemocnění zvané hemonchóza (Emery et al, 2016).

H. contortus se vyskytuje především v tropických, subtropických a mírných oblastech. Vlhké a teplé podmínky jsou důležité pro prospívání volně žijících stádií (Besier et al, 2016a). Sucho a zima nejsou pro vývoj larev příznivé. U larev třetího stádia v nedostatečném vlhku nastává hypobióza. Jedná se o vlastnost larvy, kdy dochází k pozastavení jejího vývoje do doby, než budou vhodné podmínky (Besier et al, 2016b).

Genetický polymorfismus a vysoký biotický potenciál umožňují rozšíření *H. contortus* i do oblastí, kde se přirozeně nevyskytuje. Je to způsobeno změnou klimatu a mohlo by to vést až k celosvětovému nárůstu výskytu hlístice, což by zvýšilo náklady na živočišnou výrobu a problémy spojené s rezistencí hlístic na anthelmintika (Besier et al, 2016b).

2.1.2 Morfologie

Samice červů jsou dlouhé 18-30 mm. Pro samice je typické pruhování, které je způsobené ovinutím bílých vaječníků a dělohy okolo červeně zbarveného střeva. Samci jsou menší, mají okolo 10-20 mm a jsou stejnoměrně červenohnědí. V kaudální

části těla samců se nachází kopulační burza s velkými laterálními laloky a spikulami, které mají háčky pro zachycení samice při kopulaci. (Gareh et al, 2021; Dědková, 2015).

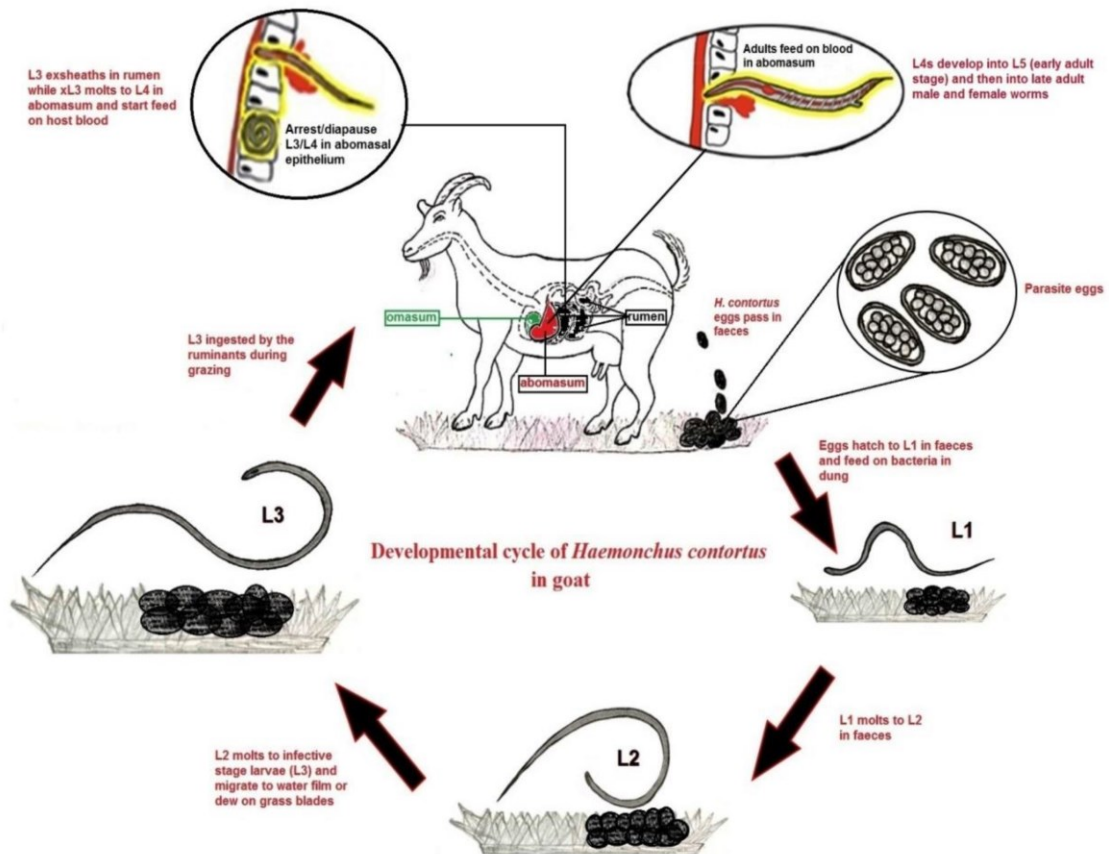
Červi mají ve své ústní dutině zub nebo lancet, který pomáhá perforovat žaludeční sliznici a umožňuje sát krev hostitele (Gareh et al, 2021).

2.1.3 Životní cyklus

H. contortus má přímý a složitý životní cyklus od vajíčka až do dospělosti (viz Obrázek 1). Vývoj probíhá za proměnlivých podmínek prostředí a hostitele (Ma et al, 2019; Arsenopoulos et al, 2021).

Cyklus začíná naklazením vajíček dospělými samicemi, které se nachází v těle hostitele. Samice kladou přibližně 5000-15000 vajec za den. Vajíčka jsou většinou oválná o velikosti 70x46 μm . Pro vývoj larev je důležitý kyslík, proto jsou vajíčka vylučována společně s trusem do venkovního prostředí. Do několika hodin se embryo zvětší, stočí se do skořápky a vzniká larva prvního stádia (L1). Vývoj pokračuje přes L2 až k L3. Třetí stádium larev L3 je infekční. Larvy třetího stádia ulpí na trávě, kterou pozře hostitel. L3 se dostávají do abomasu (čtvrtý žaludek přežvýkavců; slez), zbaví se kutikuly a zavrtají se do vnitřní vrstvy abomasu. Poté se mění na larvy čtvrtého stádia L4. A ty se následně vyvinou do dospělců. Po kopulaci dospělců začíná samice snášet vajíčka. Je to přibližně 18 dní po orální infekci hostitele (Nikolaou et al, 2006; Schwarz et al, 2013; Ehsan et al, 2020).

Larvy L3 nebo L4 se nemusí vyvinout do dalšího stádia, ale mohou zůstat v žaludečních žlázách abomasu. Tento jev se nazývá vývojová zástava (= diapauza). Dochází k zastavení vývoje parazita, nezpůsobuje onemocnění a je metabolicky neaktivní. Pokud jsou podmínky pro vývoj nepříznivé, podíl hypobiotických červů je většinou větší.



Obrázek 1 Životní cyklus *H. contortus*. Po naklazení vajec oplozenou samicí dochází k vyloučení vajec spolu se stolicí z těla hostitele. Vejce se vyvinou do larev prvního stádia L1, které se živí bakteriemi v trusu. Poté se L1 larvy vyvinou v trusu na larvy druhého stádia L2. L2 stádia se vyvinou do infekčních stádií larev L3, které migrují do vody nebo ulpí na stéble trávy. Hostitel pozře larvy L3 během pastvy, které se dostávají do abomasu, kde se vyvinou do larev čtvrtého stádia L4. Larvy L4 se začínají krmit hostitelskou krví. L4 larvy se mění nejprve na časně dospělé stádium a následně na pozdní dospělé samce a samice. Poté dochází ke kopulaci a uvolnění vajíček (převzato z Ehsan et al, 2020).

2.1.4 Onemocnění vyvolané *H. contortus*

Hemonchóza je vysoce patogenní a ekonomicky významné onemocnění hlavně u ovčí a koz (Qamar et al, 2009).

Infekce *H. contortus* vede k anémii, která je primárně způsobena sáním dospělců krve hostitele. V důsledku této anémie může dojít k úhynu nakažených zvířat. Byl popsán i alternativní mechanismus postižení zvířat (Arsenopoulos et al, 2021).

Mechanismus představil Fetterer a Rhoads, kteří popsali, že helminti produkují hemolytický faktor, který způsobuje morfologické změny erytrocytů (Fettere, Rhoads, 1998).

Krev začínají sát larvy čtvrtého stádia L4 a dospělci v abomasu, což vede ke klinickému výskytu anémie přibližně 10. až 12. den po infekci. Každý dospělý parazit je schopen denně vysát asi 30 až 50 μ l krve. Pokud ovce bude infikována 1000 dospělými parazity, bude ztrácet denně až 50 ml krve. Klinické projevy hemonchózy závisí na stupni infekce, reakci imunitního systému a také aktivaci hematopoézy hostitele (Arsenopoulos et al, 2021).

Podle stupně infekce a reakce imunitního systému hostitele proti parazitům se rozděluje hemonchóza do tří forem: hyperakutní, akutní a dlouhodobá.

Hyperakutní forma hemonchózy je vzácná, ale je charakterizována velmi vysokou zátěží hostitele. Hostitel je infikován více jak 30000 dospělými parazity. Vzniká velmi těžká anémie a hemoragická abomasitida. Postižená zvířata mohou umírat náhle bez počátečních příznaků, nebo přežijí, ale trpí závažnou anémií. Hlavní příznakem infekce je bledost sliznic, zejména spojivek. Infikovaná zvířata slábnou v důsledky velkých krevních ztrát a postupem času nejsou schopna se hýbat (viz Obrázek 2). Pokud se nepodají zvířeti antiparazitika, objevují se příznaky hypoproteinemie a generalizovaný podkožní edém (Arsenopoulos et al, 2021).

Akutní forma hemonchózy je spojená také s anémií infikovaných zvířat. V těle hostitele se může nacházet 2000-20000 dospělců. U zvířat dochází k úhynu obvykle 4-6 týdnů po prvotní infekci (Arsenopoulos et al, 2021; Besier et al, 2016a). Dargie a Allonby rozdělili akutní formu hemonchózy do tří stádií anémie (I., II. a III.) (Dargie, Allonby, 1975). I. stádium nastává šest týdnů po počáteční infekci. Je pozorována mírná anémie. Zvířata, která přežijí, se dočasně zotaví kvůli aktivaci hematopoetického procesu hostitele (II. stádium). Ve III. stádiu dochází k těžké a trvalé anémii v důsledku snížení zásob železa. Nedostatek železa vede k potlačení procesu krvetvorby, čímž se prohlubuje anémie (Arsenopoulos et al, 2021).

Dlouhodobá hemonchóza je spojována s menším počtem parazitů (okolo 100–1000 larev) v těle hostitele po dlouhou dobu. Často nemusí být ani klinicky rozpoznána.

Nástup příznaků bývá spojen s náhlým zvýšením parazitů v těle nebo sníženou imunitní odpovědí v důsledku špatného stavu těla hostitele. Tato forma se vyskytuje v oblastech s méně příznivými podmínkami pro vývoj larválních stádií. V těchto oblastech obvykle hemonchóza probíhá i s další parazitární infekcí hostitele. Dlouhotrvající hemonchóza je často spojována s výsledkem neúspěšné léčby anthelmintiky, které pouze brání rozvoji akutní formy infekce vlivem rezistence *H. contortus*. Klinické příznaky jsou podobné příznakům podvýživy, kdy dochází ke snížení produkce masa i mléka. U některých zvířat se vyskytuje anémie (Arsenopoulos et al, 2021).

V rané fázi infekce není hemonchóza přímo spojena se sníženou produktivitou. U dlouhodobé infekce už dochází ke snížení produkce mléka, snížení průměrného přírůstku zvířat a snížení produkce vlny. To vše vede k značným ekonomickým ztrátám pro zemědělce (Arsenopoulos et al, 2021).



Obrázek 1 Klinické příznaky hemonchózy: 1.- oslabené zvíře, 2.- viditelný generalizovaný podkožní edém čelisti, 3.,4.– bledá spojivka, 5.– oslabené a mrtvé zvíře (převzato z Gareh et al, 2021).

2.1.5 Diagnostika onemocnění

Diagnóza hemonchózy je založena na klinických příznacích, posmrtných nálezech, výsledcích laboratorních testů a výsledcích molekulárních metod (Arsenopoulos et al, 2021).

Viditelné příznaky anémie se používají jako rychlý a jednoduchý diagnostický indikátor onemocnění. Systém FAMACHA byl vyvinut v Jihoafrické republice a posuzuje barvu spojivkových membrán u zvířat (viz Obrázek 3). Systém poskytuje hodnocení relativní anémie z jakékoliv příčiny. Závažnost anémie koreluje se stupněm konjunktivální bledosti. Používá se pět barev od červenorůžové (zdravý jedinec) až po bílou, která značí terminální anémii. Výhodou testu je, že dochází k identifikaci postižených zvířat, které vyžadují individuální léčbu. Tím se snižuje selekční tlak na anthelmintickou rezistenci způsobenou léčbou všech zvířat ve stádu. Pro včasné zjištění a léčbu subklinické hemonchózy u zvířat je důležité testy opakovat každých 7-10 dní, což může být náročné, pokud se musí otestovat velká stáda (Besier et al, 2016a; Arsenopoulos et al, 2021).



Obrázek 3 Provedení FAMACHA testu u kozy (převzato z *The University of Rhode Island* [online])

Pro stanovení diagnózy hemonchózy mohou pomoci hematologická vyšetření. Stanovuje se hematokrit a koncentrace hemoglobinu v krvi hostitele. V důsledku anémie dochází ke snížení obou těchto parametrů (Arsenopoulos et al, 2021).

Využívá se i parazitologické laboratorní testy pro potvrzení diagnózy. Nejčastěji se používají fekální vzorky pro detekci a počítání parazitárních vajíček nebo vzorky pro určení přítomnosti larev v životním prostředí (Zarlenga et al, 2016; Arsenopoulos et al, 2021). Další možnou diagnostikou je detekce červů *post mortem*. Identifikace *H. contortus* v abomasu slouží pro rychlé potvrzení onemocnění (Besier et al, 2016a).

Revolucí v diagnostice může být zavedení molekulárních metod pomocí automatizovaných systémů využívající polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Výhodou této metody je rychlejší zpracování vzorků a větší přesnost identifikace (Besier et al, 2016a).

2.1.6 Léčba a prevence infekce

Jedním z běžných postupů léčby je pravidelné odčervování celého chovu dobytka anthelmintickými léčivy. Přístup je velmi nákladný a zvyšuje riziko vzniku rezistence helmintů. Další možností léčby je cílené ošetření pouze určitého stáda z celkového chovu. Léčba se sníženými náklady je cílené selektivní ošetření pouze zvířat, u kterých byla prokázána nákaza. U zbylých zvířat se předpokládá, že jsou zdravá (Naeem et al, 2020).

Anthelmintická léčiva se používají buď k profylaxi, kdy je potřeba znát epidemiologii, nebo k terapii již vzniklé infekce. Relativní úspěšnost léčby závisí na snadnosti podání léků, rozšíření účinku po podání, období a četnosti aplikace podle epidemiologie onemocnění. Ve většině případů se podávají anthelmintika *per os* ve formě roztoku, pasty nebo bolusu (Gatachew et al, 2007). Pro léčbu se používá nejčastěji albendazol, fenbendazol, oxfendazol, levamisol, ivermektin, moxidectin a klosantel (viz Tabulka 1) (Bowman et al, 1999). Kromě jednoaktivních anthelmintik se vyrábí také kombinované preparáty. Použití kombinace anthelmintik je důležité pro zajištění účinnosti léků u helmintů, kteří jsou odolní vůči jedné nebo více složek léků. Výhodou použití je snížení rychlosti selekce vznikající rezistence. Právě kombinovaná anthelmintika jsou doporučována pro běžné použití (Besier et al, 2016a).

Tabulka 1 Seznam doporučených léků proti infekci vyvolanou *H. contortus* (přeloženo z Bowman, 1999).

Třídy	Anthelmintika	Předepisované dávkování
Imidazothiazoly	levomizol	7,5 mg/kg
Benzimidazoly	albendazol	5 mg/kg
	fenbendazol	5 mg/kg
	oxfendazol	5 mg/kg
Makrocyclické laktony (avermektiny)	ivermektin	0,2 mg/kg
	moxidektin	0,2 mg/kg
Salicylanilidy	klosantel	10 mg/kg

Vlivem rostoucí rezistence na anthelmintika odborníci doporučili integrovaný kontrolní mechanismus, který zahrnuje různé přístupy, jak dosáhnout dostatečné kontroly (viz. níže) (Naeem et al, 2020).

Metoda biologické kontroly je založena na použití biologických prostředků ke snížení populace parazitů na pastvině nebo v hostiteli, čímž dochází ke snížení frekvence používání anthelmintik. Příkladem biologické ochrany mohou být některé druhy hlísticových hub. Houby dokážou snižovat populaci larev helmintů na pastvině díky tomu, že jsou larvy pro houby hlavním zdrojem živin nebo umožňují jejich saprofytické chování. Byly identifikovány dvě skupiny těchto hub. Jedna skupina hub způsobuje poškození struktury helmintů a další skupina infikuje helminty a jejich vajíčka (= endoparazitické houby). Mezi endoparazitické houby napadající *H. contortus* patří *Drechumeria coniospora* a *Harposporium anguillulae*. Významným druhem hub je *Duddingtonia flagrans*. Jedná se o dravou houbu, která vytváří trojrozměrné lepkavé sítě. Do těchto sítí se pevně chytanou volně žijící larvy helmintů a umírají. Metoda biologické kontroly není široce použitelná. Pro úspěšnou kontrolu parazitů je potřeba kontinuální dávkování houbových spor (Gatachew et al, 2007).

Využívá se také výběr odolných plemen ovcí, střídání pastvin, vhodná výživa a také očkovací program (Naeem et al, 2020).

Selektivní šlechtění také patří mezi preventivní opatření snižující nákazu *H. contortus*. Je známo, že mezi jednotlivými plemeny existují rozdíly v odolnosti vůči infekci, např. plemeno Red Maasai je rezistentní vůči infekci. Jedním z proveditelných a fenotypových způsobů prevence je utracení vnímavých a selekce rezistentních zvířat ve

stádu. Další možností je zavedení dostatečného počtu transgenních zvířat, která jsou schopna odolat infekci (Naeem et al, 2020).

Plán pastvy je důležitý pro minimalizaci kontaktu zvířat s infekčním stádiem larev (L3) a nadměrné kontaminaci pastvin vajíčky, čímž se snižuje riziko hemonchózy v bezprostředním i dlouhodobé horizontu. Jedním z postupů je střídavá pastva, kdy se zvířata vracejí na pastviny, kde se přirozeně zmenšil počet larev. Nevýhodou je, že tento postup nelze použít v zemích mírného pásma, protože larvy přežijí dlouhou dobu. Dále se využívá pasení zvířat na omezeném plácku s vysokou hustotou osazení pícninami, což umožňuje snižovat počet larev a fekálních vajíček pasených zvířat. Může se využít i smíšená pasta více než jednoho hostitele současně (např. ovce a skot) nebo střídání ovcí nebo koz s dobyt看kem, který má omezenou vnímavost k *H. contortus* (např. mladý skot) (Besier et al, 2016a; Naeem et al, 2020).

Bylo potvrzeno, že schopnost přežvýkavců odolávat parazitickým infekcím je úzce spojená s dobrým výživovým stavem. Prokázalo se, že ovce jsou náchylnější k infekci kvůli nedostatku bílkovin v potravě ve srovnání s ovci, kterým byl podáván doplňkový protein. Bílkoviny posilují imunitu zvířat a snižují proliferaci parazitů (Besier et al, 2016a; Naeem et al, 2020).

Očkování proti helmintům jako alternativa k použití anthelmintik byla dlouhou dobu předmětem výzkumu. Vhodná vakcína proti infekci *Haemonchus* používaná u ovcí byla vyvinuta ve výzkumném ústavu Moredun v Edinburghu. Je založena na použití latentního antigenu H11 (protein z gastrointestinálního traktu *H. contortus*) a H-gal-GP (*Haemonchus* galaktóza obsahující glykoproteinový komplex) (Arsenopoulos et al, 2021).

2.2 Vývoj nových anthelmintik

V dnešní době je velmi obtížně bojovat proti infekcím vyvolané *H.contortus*, protože je omezené množství dostupných léčiv a mnoho kmenů je na tato anthelmintika rezistentních¹. Proto je nezbytné, aby došlo k vývoji nových anthelmintik účinných i proti rezistentním druhům hlístic (Zajíčková et al, 2020).

2.2.1 Možnosti získání nových anthelmintik

Obecně se používají čtyři různé přístupy při hledání nových anthelmintik, které mohou pomoci při terapii infekcí způsobené rezistentními helminty (Geary, 2016.).

První je klasický přístup, který je založen na syntéze nových chemických látek aktivních proti parazitickým hlísticím. I přes nové poznatky v oblastech proteomiky, genomiky a metabolomiky se jedná o velmi složitý, dlouhý a nákladný proces vývoje nových účinných léčiv (Woods et al, 2007).

Další možností je syntéza derivátů, z jichž využívaných anthelmintik. Tyto deriváty mohou zlepšit vlastnosti i účinnost léčiv. Výhodou je snížení času a nákladů při uvedení léčiv na trh. Problémem je ale vyšší riziko vzniku rezistence (Geary et al, 2012; Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Třetím přístupem je využití léků, které jsou indikované u jiných typů onemocnění. Výhodou je značně zjednodušené schvalování a velká pravděpodobnost účinnosti i u rezistentních kmenů. Nevýhodou může být nespecifické působení léčiv na parazity a tím může docházet k nežádoucím účinkům (Geary, 2016).

Použití přírodních převážně rostlinných produktů je další přístup při léčbě i prevenci infekce (Geary et al, 2012).

2.2.2 Screening anthelmintické účinnosti

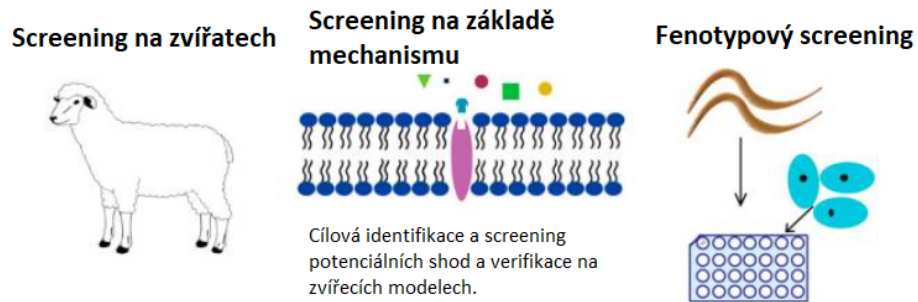
Objev anthelmintického účinku potenciálních anthelmintik je založen na třech odlišných screeningových přístupech: screening na zvířatech, cílený screening a fenotypový screening hlístic (test na bázi celého organismu). Pomocí screeningu

mohou být testovány nová syntetická anthelmintika, přírodní sloučeniny nebo deriváty již používaných anthelmintik (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Screening na zvířatech je nejstarší metoda zjištění účinnosti látek. Zvířata jsou nejprve infikována danými parazity a poté jsou vystaveny testovaným sloučeninám. Jako modely hostitelů se nejčastěji používají ovce a kozy. Během screeningu se monitoruje schopnost přežití a rozmnožování parazitů. Výhodou je, že se mohou otestovat sloučeniny přímo proti různým fázím životního cyklu parazitů včetně vajíček, larev a dospělých jedinců. Nevýhodou je potřeba mít velké množství zvířat a rozsáhlé zařízení pro testovaná zvířata. Proto se často potenciálně účinné látky testují na izolovaných helmintech, i když může být také obtížné získat dostatečné množství dospělých parazitů pro experimenty. Dochází totiž k obětování definitivního hostitele a kultivace dospělých jedinců *in vitro* je také mimořádně náročná (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Při cíleném screeningu je potřeba identifikovat specifický cíl (protein, receptor), u kterého se předpokládá, že bude mít vliv na vývoj nebo funkci parazitů. Pokud je cíl identifikován, následuje právě screening nových inhibitorů nebo antagonistů sloučenin, které mají vliv na funkci cíle. Používají se především metody umožňující High Throughput Screening (HTS), tj. screening účinnosti velkého počtu látek v miniaturních objemech (Hertzberg, Pope, 2000; Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Pro detekci potenciálních sloučenin, které iniciují paralýzu parazita, abnormality v krmení a rozmnožování nebo smrt, se používají přístupy založené na celém organismu. Fenotypový screening umožňuje identifikaci látek, jako jsou malé molekuly, peptidy nebo další chemické látky, které mají biologickou aktivitu schopnou měnit fenotyp buňky nebo organismu v boji se stresem vyvolaným novým kandidátem na lék. Byly vyvinuty i vysoce výkonné testy na celý organismus. Ty umožní rychlý screening chemických sloučenin na anthelmintickou aktivitu proti různým parazitickým stádiím u *H. contortus*. I přesto tímto screeninem je objevení vhodného typu léčiva nebo rostlinných látek omezené kvůli tomu, že většina parazitických stádií helmintů nemůže být udržována *in vitro* a některé modely nevykazují stejnou citlivost a bioakumulaci anthelmintických sloučenin jako parazitické druhy (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).



Klady	Efektivní	Přímá interakce cíle a látky	Lze detekovat látky s novým způsobem působení a vícenásobným způsobem působení
Zápory	Časová a pracovní náročnost Potřeba velkého množství směsi Nákladná	Způsob účinku nelze zjistit Nemusí být účinný v celém organismu	Poměr identifikace shody je poměrně nízký
Léčiva	Avermectin Pyrantel		Monepantel

Obrázek 4 Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých screeningových technik využívaných při hledání látek s anthelmintickou účinností (přeloženo z Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

2.2.3 Další metody stanovení anthelmintické účinnosti

Další populární strategie hledání nových molekul je založena na důkazech etnofarmakologie. Jedná se o vědecké ověření využití tradiční nebo „lidové“ medicíny včetně léčivých rostlin používaných po dlouhá staletí léčiteli. Rostliny se používali k léčbě parazitárních infekcí ve formě surových přípravků (bylin) nebo již připravených léčivých přípravků na jiná onemocnění. Pro ověření účinku rostlinných přípravků se využívají moderní vědecké postupy, které umožňují určit farmakologickou aktivitu a účinnost pomocí experimentálních modelů. Pokud je prokázána aktivita surového rostlinného extraktu, musí následně dojít k identifikaci účinné látky pomocí bio-řízené extrakce. Při extrakci jsou rostlinné materiály extrahovány pomocí různých rozpouštědel a testovány na biologickém modelu do té doby, dokud není identifikována nejaktivnější frakce. Využívají se k tomu metody frakcionace, jako je automatizovaná flash chromatografie (FC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo spojení kapalinové chromatografie s ELSD detektorem a MS detekcí (LC-ELSD-MS). Struktura a složení látek je stanoveno pomocí hmotnostní spektrometrie

(MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR). Aktivní molekuly poté mohou být testovány na specifických parazitárních proteinech, které jsou známy jako cíle látek, jako jsou enzymy v klíčových biologických drahách a receptory pro iontové kanály. I přestože je navrhováno mnoho cílů látek, jen několik z nich je validováno pro použití při objevu látek. Některá tradiční léčiva mohou působit prostřednictvím synergické činnosti odlišných molekul v extraktu z rostlin. V těchto případech je identifikace a izolace klíčových složek problematická. Při použití rostlinných extraktů se synergickými účinky může dojít ke snížení rychlého rozvoje rezistence, protože šance na rozvoj souběžných mutací v mnoha genech je výrazně nižší. Identifikace aktivních rostlinných molekul je velkou výzvou při realizaci potenciálu rostlinného extraktu jako nového zdroje pro objev léčiv (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Alternativní strategií pro novou anthelmintickou identifikaci je obrácený farmakologický přístup, který zahrnuje techniky screeningu léčiv na základě cíle. V tomto přístupu se zkoumají rostliny a zřizují se knihovny molekul. Knihovny jsou založeny buď na náhodných rostlinách (knihovny nezaujatých sloučenin) nebo na knihovnách založených na tradičním použití/znalostech. Molekuly se testují na předpokládaných cílech, jako jsou enzymy, iontové kanály, klíčové molekuly nebo receptory podílející se na důležitých biologických aktivitách v buňce. Některé molekuly mohou působit na doposud nedefinované cíle, proto nejsou identifikovány při screeningu aktivity. Obrácený farmakologický přístup má mnoho výhod. Nejdůležitější je ta, že vyžaduje méně pokusů na zvířatech k nalezení nových léčiv ve srovnání s používáním složitých sloučenin, což je často časově náročné a nemůže zaručit účinnost *in vivo* (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Pro testování vlivu potenciálních anthelmintik na viabilitu helmintů je možné využít i některé kolorimetrické či bioluminiscenční metody založené na měření enzymatické aktivity (Nguyen et al, 2021).

Test MTT se používá jako indikátor životaschopnosti a proliferace buněk. Jedná se o kolorimetrický test, který je založen na redukci žluté tetrazolové soli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenylnitrotetrazolium bromid; MTT) na fialové krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami. Životaschopné buňky obsahují enzymy oxidoreduktasy závislé na NAD(P)H (= nikotinamidadenin dinukleotidfosfát), které

redukuje MTT. Krystaly formazanu se rozpustí pomocí solubilizačního roztoku a výsledný barevný roztok se kvantifikuje měřením absorbance. Čím tmavší bude roztok, tím je větší počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk (Sigma Aldrich [online]).

Vhodnou metodou pro stanovení enzymatické aktivity je použití markeru životaschopnosti helmintů – adenosintrifosfátu (ATP). ATP vzniká v mitochondriích a je důležitým zdrojem energie, který se účastní procesů kontrakce, fosforylace a aktivního transportu. Metoda umožňuje měření koncentrace intracelulárního ATP za použití luciferasy. Luciferasa je enzym, který pochází ze světlušky a způsobuje oxidaci D-luciferinu na oxyluciferin. Oxyluciferin vyzařuje světlo o určité intenzitě. Intenzita světla (bioluminiscence) je přímo úměrná intracelulární koncentraci ATP, která signalizuje metabolicky aktivní buňky (Nguyen et al, 2021).

2.3 Přírodní produkty s anthelmintickou účinností

Po staletí se léčivé rostliny používají k léčbě různých zdravotních problémů, i z toho důvodu mají velký potenciál nahradit konvenční anthelmintika nebo být použity v kombinaci s nimi z důvodu zvýšení jejich účinku (Zajíčková et al, 2020).

Rostliny produkují velké množství látek tzv. primární a sekundární metabolity. Primární metabolity jako bílkoviny, sacharidy a tuky jsou pro rostliny důležité jako živiny. Sekundární metabolity se rozdělují do tří skupin: terpeny (monoterpeny, seskviterpeny, saponiny a glykosidy), fenolové sloučeniny (taniny a flavonoidy) a sloučeniny obsahující dusík (alkaloidy a aminy). Látky s potenciálním anthelmintickým účinkem jsou terpeny, kondenzované taniny a flavonoidy (Zajíčková et al, 2020; Lanusse et al, 2018).

Velké množství rostlin bylo po řadu let zkoumáno, zda mají anthelmintický účinek. Některé z rostlin neměly žádný účinek, jiné naopak měly srovnatelnou nebo dokonce vyšší účinnost než běžná anthelmintika (Zajíčková et al, 2020).

Anthelmintickou účinnost vykazují nejen jednotlivé sloučeniny rostlinného původu, ale i rostlinné extrakty a přírodní produkty. Jsou i některé patenty, které popisují směsi bylin s anthelmintickým účinkem proti různým vývojovým stádiím parazitů. Za posledních 18 let bylo testováno přibližně 215 rostlinných druhů proti parazitickým hlísticím, jako jsou *Haemonchus contortus*, *Taenia crassiceps*, *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium*, *Schistosoma mansoni* a neparazitickým volně žijícím hlísticím, jako jsou *Caenorhabditis elegans* a *Pheretima posthuma* (Zajíčková et al, 2020; Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Anthelmintické působení účinných látek je založeno na dvou obecných mechanismech. Prvním je přímá interakce aktivních látek s parazitem. Druhý mechanismus je založen na interakci látek s imunitním systémem hostitele (Zajíčková et al, 2020).

2.3.1 Rostlinné terpeny

Do skupiny terpenů patří velké množství strukturálně odlišných látek. Jedná se o nejrozšířenější skupinu rostlinných těkavých látek. Terpeny jsou součástí různých rostlinných orgánů a využívají se v léčbě zvířecích i lidských chorob. Tyto bioaktivní látky jsou syntetizovány jako esenciální oleje, které jsou směsí různých terpenů, hlavně monoterpenů. Silice a obsažené monoterpeny vykazují významné anthelmintické vlastnosti jak *in vitro*, tak i *in vivo* (Lanusse et al, 2018).

Anthelmintické účinky silic jsou známy u *Croton zehntneri* (kroton), *Eucalyptus staigeriana* (eukalyptu, známý jako železná kůra s citrónovou vůní), *Mentha piperita* (máta peprná), *Lippia sidoides* a *Thymus vulgaris* (tymián obecný) (Ferreira et al, 2018).

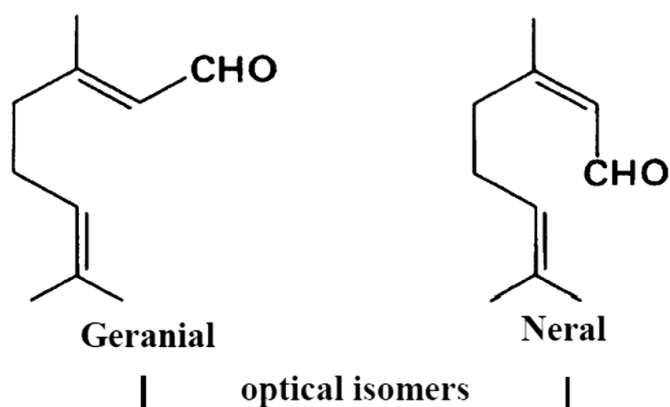
Předpokládá se, že anthelmintický účinek terpenů je způsoben inhibicí acetylcholinesterasy, GABA (=gama-aminomáselná kyselina) a tyraminových receptorů, které jsou důležité pro parazity z důvodu příjmu potravy (Zajíčková et al, 2020; Castagna et al, 2020).

Saponiny vytvářejí póry v buněčné membráně, které způsobují zvýšení propustnosti a tím mohou zvýšit účinek taninů (pokud jsou také přítomny) na intracelulární proteiny parazitů (Zajíčková et al, 2020).

Rostlinou používanou v rozvojových zemích díky anthelmintickému účinku je *Annona muricata*, známá jako graviola. Lidovém lékařství se používá jako anthelmintikum, antipyretiku, sedativum, antispasmodikum, antikonvulzivum a jako hypotenzní látka u lidí. Biologicky aktivní látky obsažené v *A. muricata* jsou alkaloidy, fenoly a acetogeniny, které mají prokázanou antiparazitární aktivitu i proti *H. contortus* (Ferreira et al, 2013).

Další rostlina voňatka citrónová (*Cymbopogon citratus*, známá jako citrónová tráva) má také v lidovém léčitelství anthelmintické účinky. Odvary ze suchých listů jsou používané jako žaludeční, antipyretické, antiseptické a uklidňující. Esenciální olej z *C. citratus* má antibakteriální, antimykotické, antioxidační, insekticidní účinky. Působí také proti parazitům rodu *Leishmania*. Účinnou látkou je citral, který je kombinací neralu (cis-citral) a geranialu (trans-citral) (viz Obrázek 5). Stejně obsahové látky a

účinky mají i *Cymbopogon martini* (voňatka martinova, známá jako palmarosa) a *Cymbopogon schoenanthus* (voňatka šašinová) (Macedo et al, 2015; Katiki et al, 2011).



Obrázek 5 Optické izomery citralu – neral (*trans*-citral), garenial (*cis*-citral) (převzato z Macedo et al, 2015).

Anthelmintické účinky mají výtažky z *Cissus quadrangularis* (žumen čtyřhranný) a *Schinus molle* (pepřovec obecný, plody jsou známé jako růžový pepř), stejně jako esenciální oleje z *Ruta chalepensis* (ruta halebská), *Citrus aurantifolia* (citrónovník limetový), *Anthemis nobile* (rmenec sličný) a *Lavandula* (rod levandule). U těchto esenciálních olejů byl anthelmintický účinek prokázán *in vitro* a je podobný ve srovnání s účinky léků proti *H. contortus* (Zajíčková et al, 2020).

Jednou z rostlin s významným anthelmintickým účinkem je *Cucurbita pepo* (tykev obecná). Různé výtažky ze semen *C. pepo* byly prokázány jako účinné proti *H. contortus* a *Heligmosoides bakeri in vitro* a proti *Ascaridia galli*, *Aspicularis tetraptera* a *Heligmosoides bakeri in vivo* (Zajíčková et al, 2020)

Některé rostlinné výtažky vykazovaly slibnou aktivitu proti gastrointestinálním hlísticím *in vitro*, ale účinek se nepotvrdil *in vivo*. Jedná se například o trans-cinnamaldehyd extrahovaný ze skořice (*Cinnamomum verum*), který byl účinný proti *A. suum in vitro*, ale nevykazoval žádnou aktivitu při podávání zvířatům (Zajíčková et al, 2020).

Z důvodu vysokých nákladů na izolaci jednotlivých monoterpenů je jejich praktické použití omezené. Vhodnou alternativou je jejich kombinace s jinými

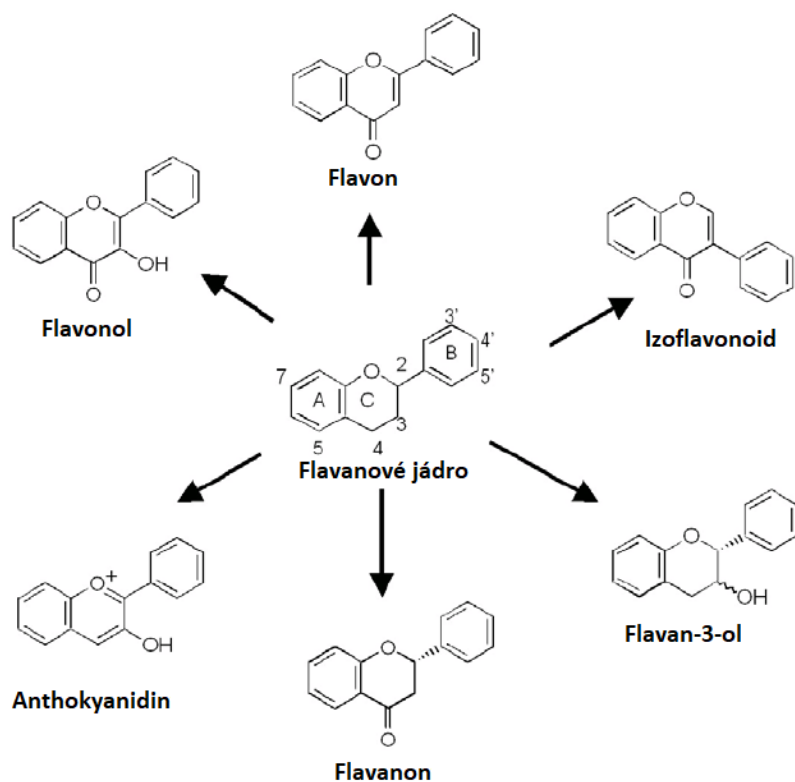
anthelminticky účinnými látkami, která by mohly být použity i proti rezistentním parazitům (Silva et al, 2021).

2.3.2 Rostlinné fenoly

Fenolové sloučeniny vytváří velkou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů s hlavními biosyntetickými podskupinami flavonoidy, taniny, proanthokyanidiny, fenolické kyseliny, lignany a mnoho dalších. V rostlinách zastávají mnoho funkcí, jako je strukturální podpora a ochrana proti UV záření, patogenům, stresu a býložravcům. Fenoly mají četné bioaktivní vlastnosti, přestože nejsou živinami, jejich příjem ve stravě má účinky na ochranu zdraví. Všechny fenoly obsahují nejméně jeden aromatický kruh s jednou hydroxylovou skupinou. (Spiegler et al, 2017; De la Rose et al, 2019).

2.3.2.1 Flavonoidy

Rostlinné flavonoidy jsou třídou široce distribuovaných fenolových sloučenin. Základní struktura flavonoidů je flavanové jádro. Jedná se o difenylpropan, jehož benzenová jádra jsou spojena třemi uhlíky, které vytváří heterocyklus spolu s navázaným kyslíkem. Flavanové jádro je prekurzorem pro vznik dalších typů flavonoidů (viz. Obrázek 6). Flavonoidy jsou modulátory efluxních transportních proteinů a mohly by tak sloužit jako synergisté k potenciaci aktivity syntetických anthelmintik. Výsledky získané z rostlinných extraktů bohatých na flavonoidy jsou mimořádně povzbudivé (Lanusse et al, 2018; Říhová, 2008).



Obrázek 6 Prekurzor flavanové jádro umožňující vznik dalším typům flavonoidů
(převzato z Nishiumi et al, 2011)

Nejčastějšími flavonoidy, u kterých byly zkoumány účinky proti hlísticím, jsou flavony a flavonoly. Flavonoly se nachází např. ve vičenci (rod *Onobrychis*), kde jsou glykosylovány zbytkem rutinosylu, což způsobuje snížení motility *H. contortus*. Ale frakce o nízké molekulové hmotnosti ze stejné rostliny, která by měla tyto sloučeniny obsahovat, byla neaktivní proti larvám *A. suum* (Spiegler et al, 2017).

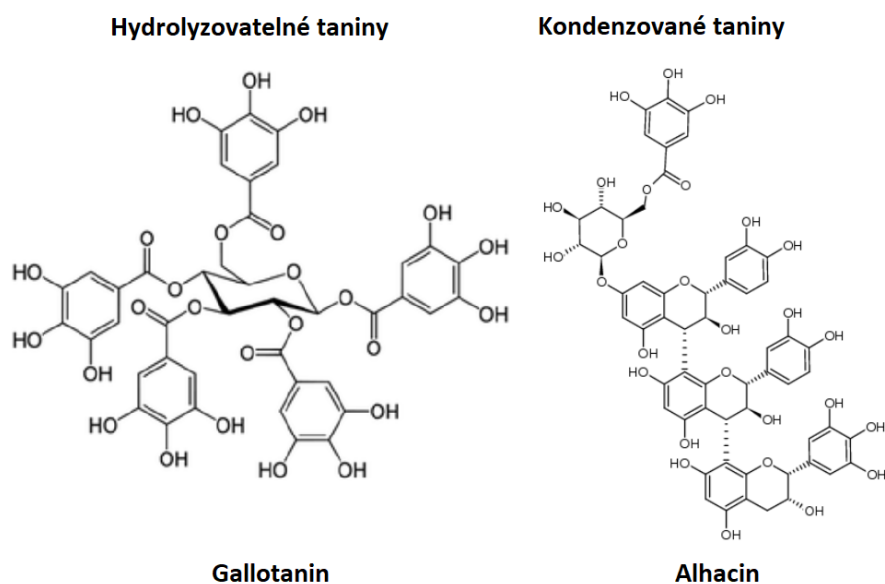
Bylo prokázáno, že ethanolový extrakt z *Artemisia campestris* (pelyněk ladní) inhibuje líhnutí vajíček a způsobuje smrt a ochrnutí u dospělých jedinců *H. contortus*. Pelyněk obsahuje převážně deriváty flavonolu kvercetin a flavonu apigenin. Inhibici líhnutí vajíček ve smíšené kultuře hlístic (*H. contortus*, *O. dentatum* a *T. colubriformis*) získané z přirozeně infikovaných koz způsobuje také extrakt z *Agave sisalana*, ale migraci larev extrakt neovlivňoval. Vylučování larev *H. contortus* je inhibováno při použití účinných látek naringenin, luteolin a kvercetin (Spiegler et al, 2017).

Luteolin spolu s luteolin 7-O- β -glukuronosid a luteolin -7- β -glukosid patří do skupiny flavonů, které lze izolovat z extraktů rostliny *Vernonia amygdalina*. Tato rostlina je využívána hlavně v tropických oblastech Afriky v lidovém léčitelství. Bylo

zjištěno, že tyto rostlinné extrakty jsou účinnější proti parazitárním druhům běžně se vyskytujících u přežvýkavců ve srovnání s běžně užívanými léčivy ivermektinem, levamisolem a albendazolem. Rostlina *V. amygdalina* neobsahuje pouze tyto flavony, ale i další látky např. seskviterpenoidní laktony (vernodal, vernodalin) a triterpeny (thyamin, kyselina askorbová a další) (Zajíčková et al, 2020; Alara et al, 2017; Adediran, Uwalaka, 2015).

2.3.2.2 Taniny

Taniny (třísloviny) jsou hlavní fenolové polymery, které se nacházejí v rostlinných tkáních. Je známo, že tyto molekuly dodávají některým plodům trpkou a hořkou chuť. Taniny jsou komplexní fenoly, které lze rozdělit do dvou tříd – hydrolyzovatelné taniny (HT = *hydrolysable tannins*) a kondenzované taniny (CT = *condensed tannins*) (viz. Obrázek 7). Hydrolyzovatelné taniny jsou směsí jednoduchých fenolů, např. kyseliny ellagové, kyseliny gallové, se sacharidy. Hydrolyzovatelné taniny se tak nazývají proto, že v přítomnosti kyseliny mohou být hydrolyzovány za vzniku fenolových kyselin a molekul sacharidů. Kondenzované taniny vznikají kondenzací dvou nebo více monomerních jednotek flavan-3-olu (Albuquerque et al, 2021).



Obrázek 7 Struktury a příklady hydrolyzovatelných (gallotanin) a kondenzovaných taninů (alhacin) (převzato z: Hang et al, 2015; ChemSrc [online])

Hydrolyzovatelné taniny mají apoptické, protinádorové, anti-EBV (EBV = Epstein-Barr virus) a anti-MRSA (MRSA = methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) působení v organismu. Hydrolyzovatelné taniny jsou účinnější než kondenzované třísloviny a v dávkách uváděných pro použití CT by mohly být pro zvířata toxické. Při použití nízkých dávek netoxických pro zvířata se zlepšilo vstřebávání živin a jejich produktivní výkonnost. HT extrahované z kaštanovníku jedlého (*Castanea sativa*) jsou smrtelné pro dospělé jedince *H. contortus*. Anthelmintická aktivita je založena na zevním i vnitřním strukturálním poškození parazita. Hlavními pozorovanými poraněními jsou destrukce v okolí úst, konečníku, vulvy a porušení integrity struktury kutikuly. Další rostliny, které mají anthelmintické účinky s obsahem HT, jsou *Melastoma malabatricum* (odule malabarská) a *Manihot exculenta* (maniok jedlý). U koz infikovaných *H. contortus* je srovnatelný anthelmintický účinek jako u běžných léčiv, např. albendazolu, oxfendazolu. (Acevedo-Ramírez et al, 2019; Suteky a Dwatmadji, 2019)

Studie zabývající se anthelmintickými účinky taninů se zaměřuje zejména na aktivitu kondenzovaných tříslovin, zatímco účinek hydrolyzovatelných tříslovin je studován jen zřídka (Acevedo-Ramírez et al, 2019).

Anthelmintický a výživový účinek kondenzovaných taninů se liší v závislosti na řadě faktorů, včetně jejich koncentrace a chemických struktur, fyziologického stavu, stravy hostitele přežvýkavců a cílových gastrointestinálních hlístic. CT mohou působit přímo na hlístice (anthelmintický účinek) nebo nepřímo zlepšením nutričního stavu a imunitní reakce hostitele proti infekci. Přímý anthelmintický účinek je založen na tvorbě komplexů mezi taniny a proteiny, které mohou měnit některé mechanismy nezbytné pro přežití parazitů (ztráta kutikuly u larev L3, krmení, pohyblivost, plodnost, vylíhnutí vajíček a řada enzymaticky zprostředkovaných biochemických funkcí) (Lanusse et al, 2018).

Snížení počtu fekálních vajíček gastrointestinálních parazitů u ovcí bylo prokázáno po podání rostlin *Lotus corniculatus* (štírovník růžkatý), *Lotus pedunculatus* (štírovník bažinný), *Hedysarum coronarium* (kopyšník věncový), *Lespedeza cuneata* (lespedézie hedvábitá) a *Onybrichis vicifolia* (vičenec ligrus), které obsahují CT (Hoste et al, 2015; Ahuir-Baraja et al, 2021). CT jako je katechin a epikatechin nevykazují

žádnou nebo pouze slabou anthelmintickou aktivitu proti *A. suum* a *C. elegans*. Naopak gallokatechin a epigallokatechin inhibují motilitu a migraci larev L3 *A. suum*, krmení larev *Ostertagia ostertagi* a *Cooperia oncophora*, rozmnožování *H. contortus* a *T. colubriformis* a životaschopnost dospělých *C. elegans* (Spiegler et al, 2017).

Rostlinný extrakt z *Musa paradisiaca* (banánovník) obsahuje velké množství látek včetně kondenzovaných taninů. Díky nim dochází k inhibici líhnutí larev hlístic, které byla ve studii považována za středně účinnou. Inhibice migrace larev byla také přítomná, ale nebyla dostatečná pro vyhodnocení (Kakimori et al, 2019).

Acacia cochliacantha, luštěnina zvaná „cubata“, se používá v tradiční medicíně k léčbě gastrointestinálních onemocnění. Listy *A. cochliacantha* mají antiparazitární účinek prokázaný u kůzlat, ovcí a skotu. Účinek je spojován s ovicidní a larvicidní aktivitou proti různým gastrointestinálním parazitům, včetně *H. contortus*. Pokles fekálních vajíček *H. contortus* u ovcí je spojován s podáním listů *Lysiloma acapulcensis* a *Mimosa caesalpinifolia*, které jsou přidávány do krmných směsí (Castillo-Mitre et al, 2021).

Terminalia macroptera je využívána v tradiční medicíně při léčbě ran, infekcí, bolesti, kašle, tuberkulózy a hepatitidy. Tato rostlina má také protizánětlivé, antibakteriální, antivirové, antimykotické, antiparazitární vlastnosti a obsahuje fenolové sloučeniny a ellagitaniny. Extrakt *T. macroptera* má anthelmintický účinek proti *H. contortus* u malých přežvýkavců (Tagne et al, 2021).

2.3.3 Přírodní látky z bakterií a hub

Kromě rostlin jsou dalším významným zdrojem přírodních anthelmintik bakterie, mořské a vyšší houby (Zajíčková et al, 2020).

Aktinomycety jsou bakterie vyznačující se velkou genetickou a funkční diverzitou. Produkují sekundární metabolity, které jsou zdroji antibiotik, protinádorových látek, anthelmintik a antimykotik. Například avermektin, odvozený od bakterie *Streptomyces avermitilis*, je silným anthelmintikem cílící na hlístice, arachnidy a hmyz (Jagannathan et al, 2021).

Alkaloidy 6-N-acyladenin, phorioadenin A izolované z jihoaustřalské mořské houby *Phoriospongia sp.* mají nematocidní aktivitu proti *H. contortus*. Aktivita je mírně slabší, než mají komerční anthelmintika levamisol a klosantel (Mayer et al, 2020). Aktivitu jako levamisol a klosantel vykazují alkaloidy betainy a echinobetainy A, B izolované z mořské houby *Echinodictyum sp.* Další sloučeniny jako geodin A, onnamid F, thiokyanatiny, fromiamycalin a halaminol A jsou potenciálními novými anthelmintiky (Zajíčková et al, 2020)

Nematofágní houba *Arthrobotrys musiformis* vykazuje nematocidní aktivitu proti infekčním larvám a vajíčkům *H. contortus*. Nematofágní houby *A. musiformis*, *Clonostachys rosea* a *Duddingtonia flagrans* jsou široce zkoumány díky slibným výsledkům proti gastrointestinálním hlísticím (Angeles-Hernández et al, 2021). Další houbou, která je vhodným kandidátem pro výzkum anthelmintik, je *Cerrena unicolor* (outkovka jednobarvá). Testy *in vitro* byly provedeny s hlísticemi rodu *Rhabditis*, u kterých dochází k ochrnutí části těla, což vede k poruchám pohybu. Jedlé houby rodu *Pleurotus* mají různé terapeutické vlastnosti, včetně anthelmintické aktivity. Extrakty *Pleurotus djamor* (růžová hlíva ústřičná) obsahují metabolity (allitol a neidentifikované terpeny), které jsou schopné inhibovat líhnutí a snížit počet vajíček *H. contortus*. Výtažky z plodnic a mycelia *Agaricus blazei* (žampion mandlový) jsou bohaté na fenolové sloučeniny schopné působit na helminty (Ziaja-Softys et al, 2022). Izolované lektiny z hub *Coprinopsis cinerea* (hnojník mrvní), *Aleuria aurantia* (mísenka oranžová), *Marasmius oreades* (špička obecná), *Laccaria bicolor* (lakovka dvoubarvá) a výtažky *Paecilomyces lilacinus* a *Trichoderma longibrachiatum* mají účinky proto *H. contortus* a měly by být předmětem dalších studií (Zajíčková et al, 2020).

2.3.4 Výhody použití přírodních látek

Použití léčivých rostlin a jiných přírodních produktů místo chemických léčiv má mnoho výhod. Jednou z nich je přítomnost mnoha bioaktivních sloučenin s různými způsoby účinku, které často působí synergicky k dosažení terapeutického účinku. Použití přírodních směsí také podstatně snižuje riziko vzniku rezistence na anthelmintika (Zajíčková et al, 2020).

Rostliny a jiné přírodní produkty jsou navíc dobrým zdrojem živin, které ovlivňují přirozenou imunitu a odolnost hostitele. Kromě anthelmintických účinků mají některé sekundární metabolity také další zdravotní přínosy pro hostitele, jako jsou antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antimykotické účinky. Některé fenolové sloučeniny jako kurkumin z *Curcuma longa* mají antioxidační a protizánětlivé účinky. Hepatoprotektivní účinek mají výtažky z plodů a kořenů *Piper chaba* (Zajíčková et al, 2020).

Velkou výhodou přírodních produktů oproti chemickým léčiv je, že představují nízké riziko pro životní prostředí, protože nejsou xenobiotiky, která mohou kontaminovat a poškodit ekosystémy (Zajíčková et al, 2020)

2.3.5 Nevýhody použití přírodních látek

Využití přírodních látek má také mnoho nevýhod. Například složení bioaktivních sloučenin se liší podle použitých částí rostli a také podle pěstebních podmínek (teplota, kvalita půdy a období výsadby) a to může být důvodem pro nekonzistentní reakci na ošetření. Dalším problémem při použití léčivých rostlin je jejich zdroj. I přesto, že použití přírodních produktů je šetrnější z hlediska nulové kontaminace životního prostředí, může docházet ke sběru rostlin z chráněných oblastí nebo mohou být použity vzácné druhy rostlin, což je nežádoucí. Léčivé rostliny navíc nejsou pro životní prostředí zcela neškodné, například rostliny s vysokým obsahem saponinů jsou toxické pro ryby (Zajíčková et al, 2020). Problémem je i složitost přírodních produktů a jejich extrakce a větší optimismus ohledně úspěchu se sloučeninami připravenými metodami kombinatorické chemie. Rostliny obsahují vysokou koncentraci aktivních sloučenin, ale ta nemusí odpovídat koncentraci aktivních sloučenin přijímaných hostitelem v jeho stravě. I jako syntetická anthelmintika i anthelmintika založená na rostlinných extraktech musí mít správné dávkování. (Dilrukshi Jayawardene et al, 2021).

Jedním ze způsobů, jak některé problémy překonat, by mohlo být kontrolované pěstování léčivých rostlin na poli, sběr invazivních druhů rostlin (např. *Juniperus pinchotii*) nebo použití vedlejších produktů agroindustrií, jako je bambucká moučka a hroznové výluhy. Bambucká moučka je zbytkem ořechů *Vitellaria paradoxa*, který zůstává po extrakci lipidů. Bylo prokázáno, že izolované třísloviny z moučky jsou účinné proti larvám L3 *A. suum*. Hroznové výlisky, vznikající při zpracování hroznů, a extrakty

vykazovaly vysokou aktivitu proti vajíčkům a larvám *H. contortus in vitro* (Zajíčková et al, 2020).

2.4 Kapradiny s anthelmintickou účinností

Kapradiny jsou zastoupeny asi 305 rody, které zahrnují více než 12 000 druhů po celém světě. Kapradorosty (*Pteridophyta*) zahrnující kapradiny, plavuně a přesličky jsou staré minimálně 380 milionů let. Nachází se ve vlhkých tropických a mírných lesích a mají také důležitou roli v zemské biodiverzitě (Devi et al, 2015).

Kapradiny se rozmnožují pomocí výtrusů, řadí se tedy mezi výtrusné rostliny. Vývoj začíná klíčením výtrusů za vzniku útvarů zvaných prokely, na kterých jsou přítomny pohlavní orgány. V pohlavních orgánech vznikají samičí a samčí pohlavní buňky. Splynutím gamet vzniká typická dospělá rostlina (Botanická zahrada Praha [online]).

Kapradiny měly dříve důležitou roli v tradiční medicíně, kde se používali i jako anthelmintika. Avšak zatímco léčivé hodnoty vyšších rostlin byly důkladně prozkoumány, kapradorosty byly zatím téměř ignorovány (Devi et al, 2015).

2.4.1 Asijské kapradiny

Actinopteris radiata, *Acrostichum aureum* a *Hemionitis arifolia* jsou kapradiny s anthelmintickými vlastnostmi, které se využívají v lidovém léčitelství. Anthelmintická účinnost byla potvrzena pomocí *in vitro* a *in vivo* testy u přirozeně infikovaných ovcí proti *H. contortus*. Látky obsažené v kapradinách (taniny, fenoly) způsobují ochrnutí, úhyn helmintů a snížení počtu vajíček ve stolici ovcí (Devi et al, 2015). Taniny a fenoly obsažené v *Drynaria quercifolia* způsobují anthelmintickou aktivitu (Rajesh et al, 2014).

Rod *Diplazium* zahrnuje přibližně 350 druhů kapradin. *Diplazium esculentum* je významným zástupcem, který je běžně známý v himalájské oblasti jako divoká zelenina. Tradičně se používá k prevenci nebo léčbě několika onemocnění, jako je cukrovka, neštovice, astma, průjem, bolest hlavy, spalničky, zácpa a spoustu dalších. Účinky výtažků jsou antioxidační, antimikrobiální, antidiabetické, imunomodulační, stimulační centrální nervový systém (CNS) a antianafylaktické. Extrakty z *D. esculentum* mají také anthelmintickou aktivitu proti *Pheretima posthuma* (Semwal et al, 2021).

Dryopteris crassirhizoma je kapradina vyskytující se v Japonsku, Koreji a Číně. Kořeny *D. crassirhizoma* se tradičně používají na různá onemocnění, jako je chřipka, bakteriální onemocnění rakovina. Rostlina obsahuje phloroglucinol, flavonoidy a fenoly, které mají anthelmintickou aktivitu proti *Dactylogyrus intermedius* (Jiang et al, 2013).

V jihovýchodní Asii roste vytrvalá kapradina *Nephrolepis biserrata*. Rostlina má antibakteriální, hepatoprotektivní a antimykotické účinky. Byly u ní prokázány i antiparazitické účinky proti pijavkám *Zeylanicobdella arugamensis* (Shah et al, 2020).

Mangrovové kapradiny *Acrostichum aureum* a *Rhizophora apiculata* se vyskytují v jihovýchodní Asii. Kapradiny mají protizánětlivé, antioxidační, analgetické, antivirové a cytotoxické účinky. V tradiční medicíně se používají kořeny a listy kapradiny jako lék na rány, vředy a zastavení krvácení. U ovcí infikovaných *H. contortus* bylo pozorováno snížení počtu fekálních vajíček (Ultari et al, 2021).

Aglomorpha quercifolia je druh kapradin, který je využíván v tradiční medicíně v různých částech světa. Např. v Indii se používá při bolestech, léčbě infekcí hrdla, tuberkulózy, žloutenky, úplavice a tyfové horečky. *A. quercifolia* má antioxidační, antibakteriální, analgetické, protizánětlivé účinky. Je využívána i jako anthelmintikum, antipyretikum a antirevmatikum. Účinky jsou spojené s obsahem sekundárních metabolitů, jako jsou terpenoidy, karboxylové kyseliny a jejich deriváty (Costa et al, 2021).

V lidovém léčitelství se díky anthelmintickým účinkům používají další rostliny, jako *Blechnum orientale*, *Cyrtomium falcatum*, *Dicranopteris linearis*, *Drynaria quercifolia*, *Dryopteris sparsa*, *Pityrogramma calomelanos*, *Pteridium revolutum* a *Tectaria coadunata* (Benniamin, 2011).

2.4.2 Africké kapradiny

Lygodium microphyllum je popínavá stálezelená kapradina, která se vyskytuje po celém světě, např. v Africe, Indii, Austrálii. Na Floridě je brána jako invazivní plevel. Kapradiny obsahují alkaloidy, třísloviny a steroidy, které jsou důvodem anthelmintického účinku proti *Tubifex tubifex*. Mechanismus působení látek proti

helmintů je spojován s vázáním tříslovin na volné bílkoviny v glykoproteinu na pokožce parazita, což způsobuje smrt. Druhý možný mechanismus je spojen s alkaloidy, které působí na CNS a vedou k paralýze helmintů (Alam et al, 2021).

V jižní Africe se používají kořeny kapradiny *Pityrogramma calomelanos* jako anthelmintika. Odvary lístků se používají na vředy v ústech a v nose (Bamigboye et al, 2020).

Kapradina z Pobřeží slonoviny *Nephrolepis biserrata* obsahuje alkaloidy, kumariny, flavonoidy, polyfenoly, steroly, terpeny a třísloviny. Má antioxidační a anthelmintický účinek, který je méně účinný než u albendazolu (Brice et al, 2021).

2.4.3 Evropské kapradiny

Kaprad' samec (*Dryopteris filix-mas*) má nejčastěji popsané léčebné vlastnosti ve výzkumné literatuře. Hlavní aktivní látkou je filicin, který je směsí biologických aktivních sloučenin, např. kyseliny filixické, filixidinové, kaempferolu, rutinu a dalších. Etery filicinové kyseliny jsou pro *C. elegans* toxické. Anthelmintický účinek je spojen s úhynem hlístic. Přípravky odvozené od kořenů a oddenků *D. filix-mas* mohou být použity pro přípravu léčiv pro léčbu helminthiáz lidí a zvířat. Ve velkém množství může být pro člověka a zvířata toxický. Existují záznamy o zvracení, závratích a poruchami zraku až slepotě nebo dokonce smrti (Egorova et al, 2021; Yañez et al, 2020).

V následující části se zaměřím na čtyři vybrané druhy kapradin, které se nachází v našem okolí a jejich potenciální anthelmintické účinky byly zkoumány v rámci experimentální části diplomové práce.

2.4.3.1 *Athyrium distentifolium* – vzorek F5

Athyrium distentifolium, nazývaná jako papratka horská, patří do čeledi *Athyriaceae* (paprátkovité). Jedná se o druh, který je hojně rozšířený v horských oblastech po celé severní polokouli, např. v Alpách, Pyrenejích, Severní Americe. Kapradina je až 1,5 metrů vysoká a velmi se podobá papratce samičí (*Athyrium filix-femina*) (botany.cz [online]; Woodhead et al, 2005).

Druhy *Athyrium* se v tradiční medicíně používají po celém světě k léčbě různých onemocnění, jako je kašel, revmatické bolesti, bolák, popáleniny a opary. Dále se používá jako antiparazitikum, anthelmintikum a karminativum. Některé druhy prokázaly také antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, antiproliferativní a anti-HIV (HIV = virus lidské imunitní nedostatečnosti) potenciál (Salehi et al, 2019).



Obrázek 8 Vzhled *Athyrium distentifolium* (převzato z: BOTANY [online])

2.4.3.2 Rod *Dryopteris*

Rod *Dryopteris* patří do čeledi *Dryopteridaceae* (kapradovité) a zahrnuje přibližně 450 druhů rozmístěných po severním mírném pásmu Evropy, Asie, Severní Ameriky (Han et al, 2015).

Hlavní léčivé rostliny rodu *Dryopteris* byly používány v lidovém léčitelství jako anthelmintika. Moderní farmakologický výzkum prokazuje, že kapradiny mají anthelmintické i antivirové, protinádorové, antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky. Kapradiny obsahují velké množství sloučeniny, jako jsou phloroglucinoly, flavonoidy, terpenoidy, steroidy, fenypropanoidy, fenoly a fenolové glykosidy. Phloroglucinoly jsou převládající sekundární metabolity rodu *Dryopteris*, které jsou charakteristickými složkami s různými biologickými aktivitami (Han et al, 2015).

2.4.3.2.1 *Dryopteris borrieri* – vzorek F13

Kapradina *Dryopteris borrieri* (kaprad' rezavá) je rozšířená v oblasti Euroasie, kromě Skandinávie a Itálie. V České republice se vyskytuje v horských a podhorských oblastech, např. Beskydy, Šumava, Krkonoše aj. Rostlina preferuje především listnaté nebo smíšené lesy. Může dojít k záměně kapradiny s *Dryopteris filix-mas* (kaprad' samec) (naturalbohemia.cz [online])



Obrázek 9 Vzhled *Dryopteris borrieri* (převzato z: Příroda z Vysočiny [online])

2.4.3.2.2 *Dryopteris cambrensis* – vzorek F15

Kapradina *Dryopteris cambrensis* (kaprad' kambrická) roste v jehličnatých i smíšených lesích v celé západní a východní Evropě. Jsou rozlišovány čtyři poddruhy podle oblastí výskytu. Na našem území se vyskytuje poddruh *Dryopteris cambrensis subsp. Insubrica*. V našem prostředí je brána jako velmi vzácný druh, který se typicky vyskytuje pouze v ojedinělých exemplářích a patří ke kriticky ohroženým (botany.cz [online]).



Obrázek 10 Vzhled *Dryopteris cambrensis* (převzato z: Portál české flóry [online])

2.4.3.2.3 *Dryopteris aemula* – vzorek F18

Dryopteris aemula (kaprad' osténkatá) roste ve vlhkých mechovitých lesích a vyskytuje se v severní Evropě a také v asijské části Turecka. Kapradina bývá zaměňována s mladými rostlinami *Dryopteris dilatata* (kaprad' rozložená) (Hardy Fern Library [online]).



Obrázek 11 Vzhled *Dryopteris aemula* (převzato z: PLADIAS [online])

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda extrakty vybraných druhů kapradin mají anthelmintický účinek.

Dílními úkoly pak bylo:

- Získat vajíčka a dospělce z ovcí infikovaných vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*)
- Připravit extrakty vybraných druhů kapradin
- Testovat vliv extraktů kapradin na líhnutí vajíček
- Vyzkoušet novou metodu pro sledování viability dospělců *H. contortus* s využitím stanovení koncentrace ATP a proteinů
- Testovat vliv extraktů z kapradin na viabilitu dospělců *H. contortus*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- „Phosphate buffered saline“ (PBS) tablety, Sigma
- Agar
- „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“, Roche
 - ATP standard
 - Luciferasa
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Lachner
- Ethanol (96%), Penta
- Ethylacetát
- Flotační roztok
- Fosfátový pufr (PBS)
- Fyziologický roztok F1/1 (0,9% NaCl)
- HCl (6 M)
- Chloroform
- Médium
 - Amfotericin B, Thermo Fisher Scientific
 - Glukóza, Penta
 - N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-4-butansulfonové kyselina (HEPES), Roth
 - Penicilin-Streptomycin (Pen-Strep), Sigma
 - RPMI-1640 médium (R8758), Sigma
- MeOH (85%)

- N-butanol
- N-hexan
- Kohoutková voda
- Lugolův roztok (1%)
- NaCl, Penta
- „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“, Thermo Fisher Scientific
 - Hovězí sérový albumin (BSA)
 - Roztok A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH)
 - Roztok B (4% CuSO₄·6 H₂O)
- Redestilovaná voda
- Sonikační roztok (SONOP)
- Suchý led
- Tris/EDTA pufr
 - Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Triplex III), Sigma
 - Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Merck

4.1.2 Biologický materiál

Jako biologický materiál pro experimenty byl použit ISE kmen *H. contortus* (MHco3). ISE kmen (Inbred Susceptible Edinburgh) byl odvozen z izolátu SE, u kterého se předpokládá, že pochází z východní Afriky (Keni). Inbreedingu bylo dosaženo 15 koly sériových experimentálních infekcí za použití vajíček jednotlivých dospělých samic v každé generaci (Sargison et al, 2019). Jedná se o kmen, který je citlivý na běžně používaná anthelmintika – benzimidazoly, makrocyclické laktony a imidazothiazoly.

Dalším biologickým materiálem byly extrakty z evropských druhů kapradin (viz tabulka 2). Kapradiny byly sbírány v Botanické zahradě Univerzity Karlovy v Praze a také v soukromé zahradě RNDr. Libora Ekrta, Ph.D.

Tabulka 2 Extrakty kapradin použitých při experimentech

Extrakty použitých kapradin		
Číselné označení	Latinský název	Český název
F2	<i>Athyrium filix-femina</i>	papratka samičí
F5	<i>Athyrium distentifolium</i>	papratka horská
F6	<i>Blechnum spicant</i>	žebrovice různolistá
F12	<i>Dryopteris dilatata</i>	kaprad' rozložená
F13	<i>Dryopteris borneri</i>	kaprad' Borrerova
F14	<i>Dryopteris remota</i>	kaprad' tuhá
F15	<i>Dryopteris cambrensis</i>	kaprad' plevinatá
F18	<i>Dryopteris aemula</i>	kaprad' osténkatá

4.1.3 Spotřební materiál

- 2 ml mikrozkušavky se šroubovacím uzávěrem, SSi Bio
- Jednorázové pipetovací špičky, Eppendorf
- Mikrozkušavky, Eppendorf
- Nesterilní 96-jamkové destičky černé, Costar® Black Flatbottom
- Nesterilní 96-jamkové destičky Greiner, CELLSTAR® 96 well plates
- Zirkonové kuličky SiliBeads, Sili

4.2 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22, Scaltec
- Automatické pipety Eppendorf Xplorer, Eppendorf
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Fischer Scientific
- Elektromagnetická míchačka + míchadlo, Heidolph
- Inverzní mikroskop
- Kuličkový homogenizátor FastPrep-24 5G, MP Biomedicals
- Laboratorní nádobí
- Lednice
- Mrazicí box (-80°C, -20°C)

- Multikanálové automatické pipety Eppendorf Xplorer, Eppendorf
- pH metr, SI Analytics
- Pipety Eppendorf Research, Eppendorf
- Tecan Infinite M200, Spark Control Tecan v. 2.2, Tecan
- Thermomixer Comfort, Eppendorf
- Vortex IKA MS2 mini shaker, Gemini

4.3 Metody

4.3.1 Příprava pufrů a médií

▪ Příprava flotačního roztoku

Flotační roztok byl připraven smícháním 1 kg cukru krystal a 700-750 ml redestilované vody. Za pomoci magnetické míchačky a míchadla se cukr ve vodě rozpustil. Po rozpuštění byla pomocí hustoměru zjištěna hustota roztoku. Požadovaná hustota byla $1,27 \text{ g.cm}^{-3}$. Podle potřeby bylo možné přisypat cukr a nechat ho rozpustit. Roztok s potřebnou hustotou byl přelit do několika uzavíratelných nádob přelepených páskou, aby se nerozlil. Uzavíratelné nádoby byly uchovávány v chladící místnosti s teplotou 10°C .

▪ Médium

Hco médium bylo připraveno suplementací média RPMI-1640 tak, aby obsahovalo 0,8% glukózy, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ amfotericinu B, 10 U/ml penicilinu, 10 g $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu a 10 mM N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[4-butansulfonové kyseliny] (HEPES) pufru při pH 6,8.

▪ Agar

Rozmícháním 30 g agaru v 500 ml vody vznikla kaše, která byla přidána do hrnce s 1,5 l horké vody. Agar byl přiveden k varu za stálého míchání. Poté byl hrnec s agarem ochlazován studenou vodou na teplotu 48°C , která byla udržována pomocí magnetické míchačky s ohřevem. Do hrnce bylo přidáno míchadlo a hrnec byl zakryt alobalem. 2 l připraveného agaru byly použity na izolaci 2 kmenů z 4-5 slezů.

- **Fyziologický roztok**

Fyziologický roztok byl připraven smícháním 81 g NaCl s 9 l teplé vody. Po rozpuštění soli byl roztok přelit do akvária (do 4/5 objemu) a kanystrů přes trychtýř a byl používán na oplach slezů a doplnění akvária.

- **PBS**

Jedna tableta PBS byla rozpuštěna ve 200 ml redestilované vody, aby vznikl 0,01 M fosfátový pufr s pH 7,4.

- **SONOP – Ethanol (70% v/v) + 2 mM EDTA pufr, pH 10,9**

0,372 g EDTA bylo rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody, pH bylo upraveno pomocí 5 M NaOH na hodnotu 10,9. Po upravení pH bylo přidáno 30 ml redestilované vody a 370 ml ethanolu (96%). Výsledný objem byl 500 ml. SONOP byl uchováván v lednici.

- **Tris/EDTA pufr – 100 mM Tris-HCl + 2 mM EDTA pufr, pH 7,6-7,8**

12 g Tris a 0,74 g EDTA bylo rozpuštěno v 600 ml redestilované vody. Bylo upraveno pH pomocí 6 M HCl na přibližnou hodnotu 7,6. Odměrná baňka byla doplněna redestilovanou vodou na 1 l. Z baňky byl připravený roztok přelit do laboratorní láhve a uchováván v lednici.

- **ATP standard**

Standard byl ředěn redestilovanou vodou na koncentraci 10 mg/ml. Objem redestilované vody byl vypočítán pomocí ředící rovnice $c_1V_1=c_2V_2$. Po naředění byl uchováván při -20°C po dobu 4 týdnů.

- **Luciferasa**

Lyofilizovaná luciferasa byla rozpuštěna v 10 ml redestilované vody, otočila se a nechala se 5 minut stát. Rozpuštěná luciferasa se uchovává při -20°C. Při použití zmražené luciferasy byla rozmrazena a vytemperována na pokojovou teplotu (cca 30-60 minut).

▪ 6 M HCl

Pro přípravu 100 ml 6 M HCl bylo doplněno 52,98 ml 35% HCl redestilovanou vodou na 100 ml. Připravená 6 M HCl byla uchovávána při pokojové teplotě.

▪ Pracovní roztok C

Pracovní roztok C byl připraven smícháním roztoků A (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH – čirý roztok) s roztokem B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – modrý roztok) v poměru 50:1 za vzniku zeleného roztoku.

4.3.2 Extrakce kapradin

Pro přípravu jednotlivých extraktů byl použit lyofilizovaný a homogenizovaný materiál osmi druhů kapradin. V Erlenmeyerově baňce bylo macerováno 5 g suchého materiálu ve 100 ml 85% methanolu po dobu 72 hodin ve tmě. Po maceraci se rostlinný materiál rozvířil a byl filtrován pomocí Büchnerovy nálevky. Čistý extrakt byl sbírán do Erlenmeyerovy baňky. Zbytkový materiál byl podruhé macerován ve 100 ml 85% MeOH po dobu 6-12 hodin ve tmě. Opět byla provedena filtrace a čisté extrakty se smíchaly. Následně byl smíšený extrakt odpařen ve vakuu při teplotě 45°C v odpařovacích baňkách do sucha a zvážen.

Suchý extrakt byl rozpuštěn v 50 ml redestilované vody a přelil se do dělicí nálevky s 50 ml n-hexanu. Po protřepání se nechala ustálit rovnováha mezi vodou a n-hexanem, který byl zachycen do Erlenmeyerovy baňky a uložen do lednice. Zbylá voda v dělicí nálevce byla použita pro další dělení v dalším rozpouštědle. Celý proces se opakoval s chloroformem, ethylacetátem a n-butanolem. Po posledním rozpouštědle, n-butanolu, byly všechny frakce v Erlenmeyerových baňkách odpařeny ve vakuu při 45°C a poté zváženy.

V posledním kroku byly jednotlivé frakce znovu rozpuštěny ve 3 ml příslušného rozpouštědla a převedeny do předem zvážených vialek. Frakce extraktů byly odpařeny dusíkem do sucha a byly uchovány při teplotě -80°C. Pro experimenty byly extrakty rozpuštěny v DMSO tak, aby koncentrace byla 100 mg/ml. Pokud nebyl extrakt spotřebován, uchovával se při teplotě -20°C.

4.3.3 Experimenty s *H. contortus*

4.3.3.1 Izolace vajíček

Jehňata infikovaná larvami *H. contortus* byla použita i pro izolaci vajíček. Jehňata měla okolo řitního otvoru připevněný sáček, do kterého se sbírala jejich stolice po dobu 24 hodin. Každých 24 hodin se sáčky vyměnili a připevnili se nové. Stolice se sbírala po dobu 7 dní.

Nejprve se ovčí trus namočil v kohoutkové vodě, ale byl snadněji rozmělněn. Rozmělněný trus se nalil na navlhčené síto s póry o rozměru 250 μm . Pod všemi síty byly fotografické misky, které zachytávaly filtrát ze sít. Trus v sítu se ještě několikrát promyl vodou a filtrát se přelil na síto s póry 100 μm . Celý proces se opakoval a filtrát byl přelit na poslední síto s póry 25 μm . Síta a misky byly pečlivě omyty, aby nedocházelo ke zbytečné ztrátě vajíček přilnutých na povrchu. Obsah posledního síta byl přelit do řádně popsaných čistých kónických zkumavek tak, aby byly zkumavky plné.

Zkumavky s filtrátem byly centrifugovány 3 minuty při 1600 rpm. Po centrifugaci byl rychle slit supernatant, zkumavka byla po okraj doplněna flotačním roztokem a zamíchána. Následovala další centrifugace na 3 minuty při 1000 rpm. Po stočení byly vajíčka odebrána z povrchu hladiny pomocí 10 ml pipety do čisté kónické zkumavky. Doplnil se flotační roztok a zkumavky se opět stočily (3 minuty, 1000 rpm). Krok centrifugace byl opakován do přečištění vajíček.

Po poslední centrifugaci se vajíčka (světlý povrch) se odeberou do nové 15 ml zkumavky. Poté byla zkumavka doplněna vodou a stočila se (3 minuty, 1600 rpm). Po centrifugaci vajíčka sedimentovala, byl odpipetován supernatant. Opět se zkumavka doplnila vodou a nechala se centrifugovat (3 minuty, 1600 rpm). Po odpipetování supernatantu se k izolovaným vajíčkům přidaly přibližně 2 ml studené vody a vše se promíchalo.

Ze zkumavky s izolovanými vajíčky se odebere pětkrát 10 μl a napipetuje se 5 kapek na podložní sklíčko. V kapkách se pozorovali a počítali vajíčka. Po sečtení vajíček se vypočítal průměr ve všech kapkách. Výsledek se přepočítal na 1 ml suspenze. Z celkového objemu suspenze byl získán celkový počet vajíček.

4.3.3.2 Test líhnutí vajíček (EHT)

Test líhnutí vajíček se původně používal pro stanovení rezistence hlístic na benzimidazolová anthelmintika. Princip je založen na inkubaci a hodnocení líhnutí larev hlístic z vajíček, která jsou inkubována v roztocích látek s různými koncentracemi. Pro tento test je důležité, aby byl z izolace získán dostatečné množství vajíček, které se ještě nevyvinuly v larvy (Vadlejch et al, 2018).

Provedení testu

Test líhnutí vajíček z trusu ovcí se prováděl v 96 jamkových destičkách. Do jamek na okraji se přidalo 280 µl vody, aby se zabránilo odpařování roztoků. Do každé jamky v řadě byl napipetován 1 µl extraktu kapradin rozpuštěný v DMSO. K extraktům bylo přidáno 199 µl vodného roztoku vajíček ISE kmenu *H. contortus* (5 vajíček/20 µl v 1 jamce). Výsledné koncentrace extraktů v jamkách byly 12,5; 25; 50; 100 a 200 µg/ml. 0,5% DMSO byl použit jako pozitivní kontrola a byl napipetován na konec řady. Roztoky extraktů, vodný roztok vajíček a kontroly byly pipetovány v triplicátech. Poté byla připravená destička inkubována 48 hodin při teplotě 27°C. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10 µl 1% vodného Lugolova roztoku, který ukončil test. Následně byly v každé jamce počítány počty nevylihnutých vajíček a počet larev L1. Počítalo pomocí inverzního mikroskopu při 40x zvětšení. Experiment byl opakován dvakrát.

4.3.3.3 Izolace dospělců *H. contortus*

Zdravá jehňata stará 3-4 měsíce byla infikována 5000 L3 larvami *H. contortus* ISE kmen. Za čtyři týdny byla jehňata usmrcena podle platné legislativy. Jejich slezy byly vyjmuty a při teplotě 37°C byly transportovány do laboratoře, kde byly dospělci izolováni *post mortem* pomocí agarové metody. Slez se rozstříhl a byl omyt pomocí připraveného fyziologického roztoku F1/1, aby se dospělci pustili. Obsah slezu se také použije. Na připravené tácy s rozprostřenou gázou se nalil smíchaný obsah slezu, uvolnění dospělci a agar v poměru 1:1. Po zatuhnutí agaru se gáza navázala na tyčku a ponořila se do akvária s fyziologickým roztokem F1/1. Dospělci se postupně uvolňovali z agaru na dno nádoby a mohli se postupně odsávat do kádinky. Následně byli dospělci rozdělováni ručně podle pohlaví.

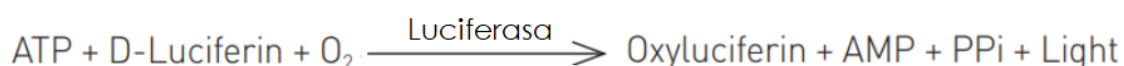
4.3.3.4 Inkubace dospělců

Podle pohlaví rozdělení dospělci *H. contortus* se inkubovali ve 24-jamkových destičkách. V jamkách bylo napipetováno 900 µl Hco média s testovanou látkou o požadované koncentraci (koncentrace DMSO max. 0,1%). Inkubace probíhala 48 hodin při teplotě 37°C a 5% CO₂. Po 48 hodinách inkubace se červi opláchli v PBS, po 10 samičkách a samečcích byli sbíráni do 2 ml mikrozkuvek se šroubovacím víčkem s 50 µl SONOPu a ihned dáni na suchý led. Vzorky byly uchovávány při -80°C do měření.

4.3.3.5 Stanovení koncentrace ATP

Stanovení koncentrace ATP je vhodnou metodou určení životaschopnosti buněk. ATP je zdrojem energie v živých buňkách a podílí se na mnoha životně důležitých biochemických reakcí. Když buňky zemřou, přestanou syntetizovat ATP a zbylé ATP je rychle degradováno (Promega [online]).

Principem bioluminiscenčního testu je reakce, při které dochází k přeměně ATP (=adenosin trifosfát) na AMP (= adenosinmonofosfát) a luciferinu na oxyluciferin pomocí luciferasy (viz Obrázek 12). Vzniklý oxyluciferin vyzařuje záření, které je měřeno při 562 nm. (Promega [online]).



Obrázek 12 Princip stanovení ATP: Pomocí luciferasy dochází k přeměně ATP na AMP a luciferinu na oxyluciferin vyzařující světlo (převzato z: (Promega [online])).

Provedení testu

Vzorky se během zpracování musely uchovávat při nízké teplotě. Využívala se vychlazená centrifuga na 4°C a led. Nízká teplota byla důležitá, protože by mohlo dojít k degradaci ATP. Ke každému vzorku se přidala odměrka homogenizačních zirkonových kuliček a 450 µl vychlazeného Tris/EDTA pufru. Vzorky se homogenizovaly pomocí FastPrep24 homogenizátoru po dobu 30 sekund. Poté se ke vzorkům přidalo dalších 450 µl vychlazeného Tris/EDTA pufru a opět se homogenizovalo, ale pouze po dobu 5 sekund. Vzorky se následně centrifugovaly po dobu 10 minut (13 200 rpm, 4°C).

Po připravení ATP standardu se rozpustí 10 μl standardu v 990 μl Tris/EDTA pufru za vzniku roztoku s koncentrací $1,65 \times 10^{-4}$ M. Kalibrační křivka je připravena dalším ředěním vzniklých roztoků podle Tabulky 3.

Tabulka 3 Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace ATP

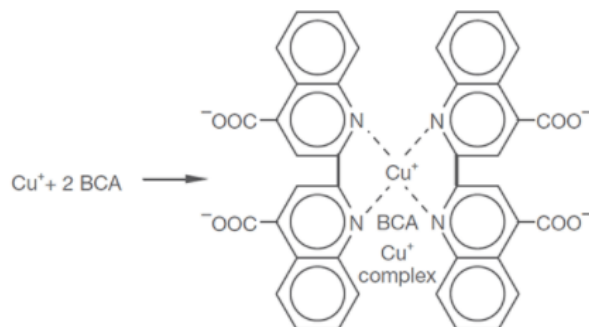
Roztok	Objem roztoku	Tris/EDTA pufr	Koncentrace [M]
A	10 μl ATP standardu	990 μl	$1,65 \times 10^{-4}$
C1	10 μl (A)	990 μl	$1,65 \times 10^{-6}$
C2	100 μl (C1)	400 μl	$3,30 \times 10^{-7}$
C3	50 μl (C1)	450 μl	$1,65 \times 10^{-7}$
C4	100 μl (C3)	400 μl	$3,30 \times 10^{-8}$
C5	50 μl (C3)	450 μl	$1,65 \times 10^{-8}$
C6	100 μl (C5)	400 μl	$3,30 \times 10^{-9}$
C7	50 μl (C5)	450 μl	$1,65 \times 10^{-9}$
C8	0 μl	500 μl	0

Na černou 96-jamkovou destičku bylo pipetováno 50 μl roztoků (C1-C8) pro kalibraci v duplikátech. Z připravených vzorků se odebralo 5 μl supernatantu a přidalo se 45 μl Tris/EDTA pufru pokojové teploty. 50 μl připraveného roztoku luciferasy se napipetoval pomocí automatické multikanálové pipety. Luciferasa byla co nejrychleji pipetována ve směru měřicího paprsku, aby ve všech jamkách byly stejné podmínky pro měření. Následně byla destička vložena do luminometru. Po měření byly vyhodnoceny výsledky pomocí programu Microsoft Excel.

4.3.3.6 Stanovení koncentrace bílkoviny pomocí BCA

Metoda stanovení proteinu pomocí kyseliny bichoninové (BCA) kombinuje redukci Cu^{2+} na Cu^+ proteinem v alkalickém prostředí (reakce je známá jako Biuretova reakce), s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí kationtu Cu^+ pomocí BCA (Thermo Fisher Scientific [online]).

V prvním kroku dochází k reakci proteinu s Cu^{2+} v alkalickém prostředí a redukcí Cu^{2+} na Cu^+ . V následujícím kroku reagují za vzniku komplexu 2 molekuly BCA s měďnatým kationtem, který vznik v prvním kroku (viz Obrázek 13). Intenzivní fialově zbarvený produkt je rozpustný ve vodě a vykazuje silnou lineární absorpenci při 562 nm se zvyšující se koncentrací bílkovin (Thermo Fisher Scientific [online]).



Obrázek 13 Princip probíhajících reakcí při stanovení koncentrace bílkovin
(Thermo Fisher Scientific [online])

Provedení testu

Po změření ATP mohly být vzorky využity pro stanovení koncentrace bílkovin nebo uchovány při -20°C do měření. Když byly vzorky měřeny následující dny, bylo potřeba vzorky po rozmražení zhomogenizovat pomocí FastPrep24 homogenizátoru po dobu 30 s. Následně se vzorky musely centrifugovat 10 minut při 13 200 rpm. Pokud se vzorky zpracovávaly ihned po změření ATP, nemusely se dále zpracovávat.

Pro přípravu kalibrační křivky se používá 0,2% hovězí sérový albumin (BSA, Pierce™). 0,2% BSA se musí 10x naředit Tris/EDTA pufrém, aby vznikl 0,02% roztok BSA. Tris/EDTA s bílkovinou se pipetuje do mikrozkušavky s odpařeným Tris/EDTA, aby složení kalibrační křivky bylo stejné jako složení vzorků.

Roztoky pro kalibrační křivku jsou připraveny mísením roztoku 0,02% BSA s Tris/EDTA pufrém o potřebném objemu podle Tabulky 4.

Tabulka 4 Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace proteinů

	Koncentrace	0,02% roztok BSA	Tris/EDTA pufr
1	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0 μl	200 μl
2	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 μl	160 μl
3	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$	80 μl	120 μl
4	120 $\mu\text{g}/\text{ml}$	120 μl	80 μl
5	160 $\mu\text{g}/\text{ml}$	160 μl	40 μl
6	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	200 μl	0 μl

Na 96-jamkovou destičku Greiner se napipetovalo 10 μ l roztoků pro vytvoření kalibrační křivky ze zkumavek 1-6 vždy o 4 paralelních měření pro každou koncentraci (viz Tabulka 3). Z výsledků 4 měření se při výpočtech udělal průměr, který byl využit při vyhodnocování. Následně se na destičku napipetovalo 10 μ l supernatantu připravených vzorků. Ke všem napipetovaným roztokům na destičce se přidalo 200 μ l pracovního roztoku C (vzniká smísením roztoku A a B) pomocí automatické multikanálové pipety.

Připravená destička se inkubovala 30 minut při 37°C a rychlosti třepání 350 rpm. K inkubaci byl využit Thermomixer. Poté se měřila absorbance při 562 nm pomocí přístroje Tecan. Výsledky byly dále zpracovávány pomocí programu Microsoft Excel.

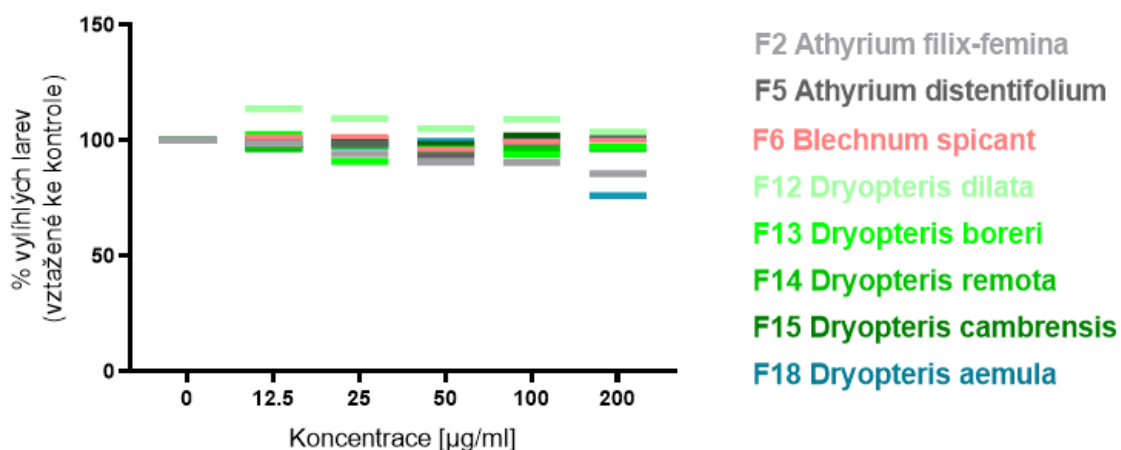
Tímto způsobem byla ve vzorcích homogenitu *H. contortus* stanovena koncentrace proteinů, ke které pak byla vztažena změřená koncentrace ATP. Normalizovaná koncentrace ATP vyjadřuje viabilitu hlístic.

5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv extraktů z kapradin na líhnutí vajíček

EHT byl použit pro hodnocení schopnosti líhnutí vajíček ISE kmenu *H. contortus*, které byly vystaveny extraktům kapradin po dobu 48 hodin při 27°C. Bylo použito pět koncentrací extraktů – 12,5, 25, 50, 100 a 200 µg/ml. 0,5% roztok DMSO byl použit jako kontrola.

Obrázek 14 zobrazuje účinnost jednotlivých extraktů po 48-hodinové inkubaci vajíček ISE kmene *H. contortus*. Jednotlivé body reprezentují průměr ze dvou měření (n=2). Směrodatná odchylka (SD) u většiny vzorků byla v rozmezí 0,01-10,3%. U kapradiny F18 (*Dryopteris aemula*) v koncentraci 200 µg/ml došlo ke snížení schopnosti líhnutí larev o 28%, s SD=19,1%.



Obrázek 14 Vliv extraktů kapradin na líhnutí vajíček *H. contortus*

5.2 Vliv extraktů z kapradin na viabilitu dospělců

Anthelmintický účinek kapradin byl testován na samcích a samicích *H. contortus*. Byl využit kmen ISE, který je citlivý na běžně používaná anthelmintika. Bylo vybráno osm druhů evropských kapradin, jejichž extrakty byly použity ve čtyřech koncentracích 1, 10, 50 a 100 µg/ml.

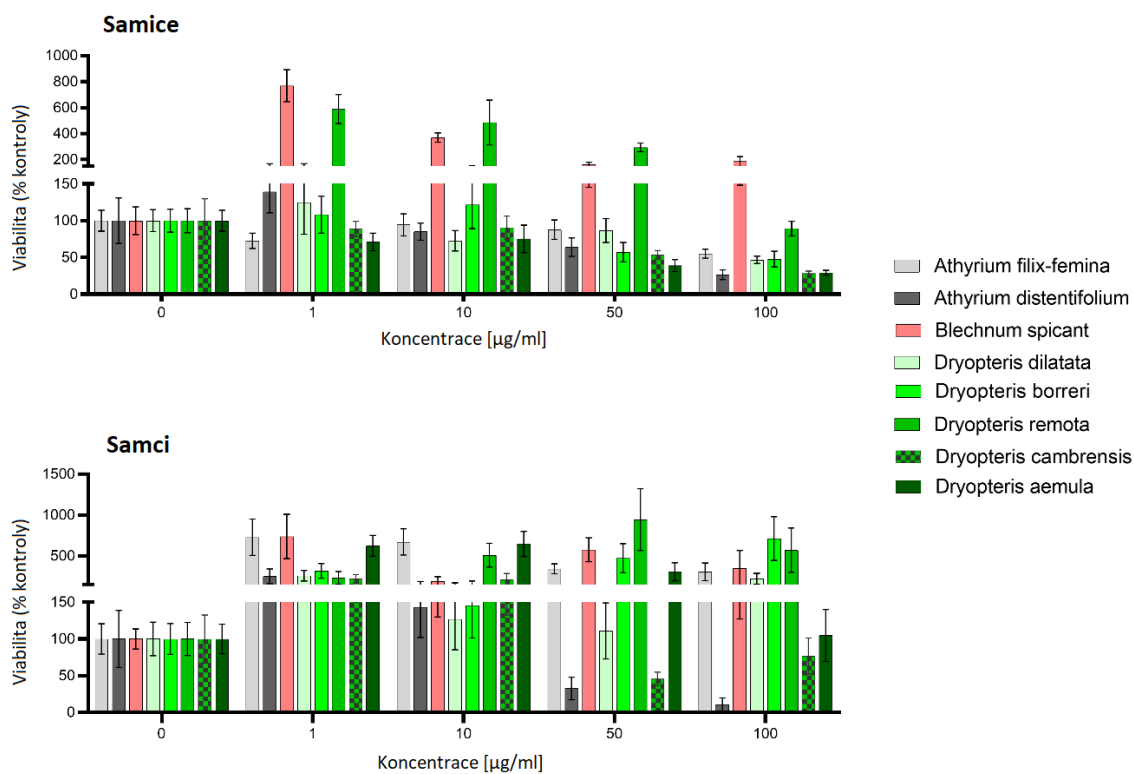
Stanovení množství ATP je vhodnou metodou pro určení viability buněk/organismů. ATP se v buňkách podílí na životně důležitých funkcích. Pokud je buňka poškozena nebo zemře, dochází k poklesu koncentrace ATP v buňce (Promega [online]).

Pro normalizaci hodnot koncentrace ATP v jednotlivých vzorcích byla stanovena celková koncentrace proteinů v µg pomocí BCA stanovení. Normalizovaná hodnota ATP vyjadřuje viabilitu hlístic.

5.2.1 Screening anthelmintické účinnosti kapradin

Nejprve byl proveden screening 8 druhů evropských kapradin, aby byly zjištěny extrakty s anthelmintickým účinkem. Viabilita dospělců *H. contortus* je vyjádřena v procentech kontroly (= 100%), kde hlístice byly inkubovány v mediu pouze s 0,1% DMSO.

Obrázek 15 znázorňuje dva grafy zobrazující vliv jednotlivých výtažků kapradin u dospělců *H. contortus*. Screening byl proveden v 8 replikátech pro samice a samce. Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Z grafu závislosti viability na koncentraci extraktů je patrné, že dochází životaschopnost samic a samců snižují extrakty z kapradin *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreeri*, *Dryopteris cambrensis* a *Dryopteris aemula*. S těmito 4 kapradinami byly prováděny další testy.

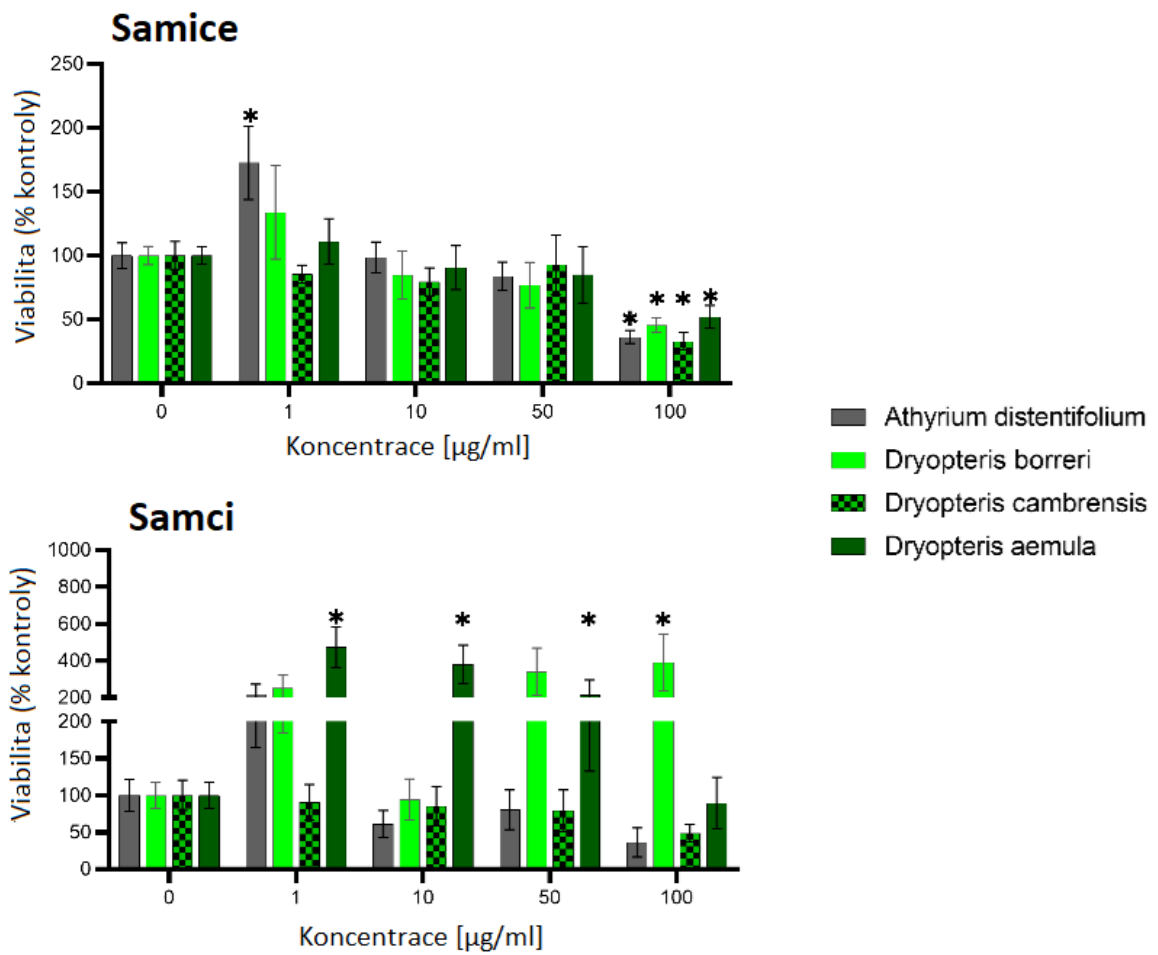


Obrázek 15 Vliv výtažků 8 druhů kapradin na viabilitu dospělců *H. contortus*

5.2.2 Vliv vybraných kapradin na viabilitu dospělců

Kapradiny, účinné ve screeningu, byly použity pro další experimenty. Byly provedené tři nezávislé experimenty – 2 experimenty po 4 replikátech a 1 po 8 replikátech v každém z experimentu (n=16). Data jsou prezentována jako průměr ± střední chyba průměru. Pro statistickou analýzu byl použit two-way ANOVA test s Dunnettovým vícenásobným srovnávacím testem v programu GraphPad Prism 9.

Obrázek 16 zahrnuje dva grafy závislosti viability samic/samců na koncentraci extraktů čtyř kapradin. Byly použity čtyři koncentrace extraktů – 1, 10, 50, 100 µg/ml. U samic dochází ke snížení viability při použití koncentrace 100 µg/ml u všech použitých extraktů oproti kontrolním vzorkům. Snížení je hodnoceno jako statisticky signifikantní. U samců dochází ke snížení viability u dvou druhů kapradin, ale tento pokles nebyl signifikantní. Extrakty z kapradin *Dryopteris borrieri* a *Dryopteris aemula* u samců zvyšovaly koncentraci ATP oproti použité kontrole.



Obrázek 16 Vliv vybraných 4 druhů kapradin na viabilitu dospělců *H. contortus*;

*= $p < 0,05$

6. DISKUSE

Haemonchus contortus, významný parazit malých přežvýkavců, se vyskytuje téměř se po celém světě. Ovce nebo kozy pozřou infekční larvy L3 během pasty. Larvy se dostávají do slezu, kde sají krev hostitele. Pro onemocnění zvané hemonchóza je typickým příznakem anémie. U nemocných zvířat dochází ke snížení produkce mléka, vlny, úbytku hmotnosti až smrti (Craig, 2009).

K léčbě a kontrole hemonchózy se nejčastěji používají syntetická anthelmintika. Častá a občas i nesprávná aplikace anthelmintik vedla k rozvoji rezistence u těchto helmintů, ke zvýšení přítomnosti reziduí v mase a mléce a také ke kontaminaci životního prostředí (Ahmed et al, 2020). Navíc syntetická léčiva jsou pro některé zemědělce, hlavně v rozvojových zemích, nedostupná a drahá. V důsledku toho roste snaha najít alternativní řešení, která by zmenšovala ekonomické ztráty způsobené infekcí. Rostliny a z nich vytvořené extrakty a produkty, často využívané v lidové medicíně, by rovněž mohly sloužit jako zdroj cenově dostupných a účinných anthelmintik (Ahmed et al, 2020; Egualé et al, 2007).

Mnoho rostlin bylo zkoumáno pro jejich anthelmintický účinek. Jednou z rostlin s významným účinkem je *Cucurbita pepo*, u jejichž semen byly prokázány účinky proti *H. contortus*. Široce studovaná je díky svým léčebným vlastnostem *Carica papaya*. Prokázáný anthelmintický účinek *in vitro* je u *Veronia amygdalina*, silic *Cissus quadrangularis*, *Schinus mole*, *Ruta chalepensis*, *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* a *Levandula* (Zajíčková et al, 2020).

Pro naše experimenty byly použity extrakty kapradin získaných z Botanické zahrady Univerzity Karlovy v Praze a soukromé zahrady RNDr. Libora Ekrta, Ph.D. Extrakce kapradin vycházela z postupu zmíněném ve studii L. Langhansové (Langhansová et al, 2017).

Po maceraci sušeného rostlinného materiálu v 85% MeOH byla prováděna extrakce pomocí čtyř rozpouštědel – n-hexanu, chloroformu, ethylacetátu a n-butanolu. Získané frakce byly odpařeny pomocí vakua, rozpuštěny v příslušném rozpouštědle a opět odpařeny do sucha pomocí dusíku. Takto mohly být uchovávány

extrakt při teplotě -80°C. Před experimenty byly extrakty rozpuštěny v DMSO, aby byla koncentrace extraktu 100 mg/ml.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit anthelmintický účinek extraktů evropských druhů kapradin.

Nejprve byla pomocí EHT zjištěna schopnost extraktů z kapradin inhibovat líhnutí vajíček *H. contortus* v larvy L1. Vajíčka ISE kmenu byla inkubována s extrakty kapradin po dobu 48 hodin při 27°C. Po inkubaci byly pomocí mikroskopie zjištěny počty vajíček a vylíhnutých larev. Schopnost líhnutí larev je vyjádřena v procentech kontroly (vajíčka ovlivněná pouze rozpouštědlem tj DMSO). U vajíček inkubovaných s extraktem kapradiny *Dryopteris aemula* došlo k určitému snížení schopnosti líhnutí larev, ale toto snížení nebylo statisticky signifikantní.

Anthelmintický účinek kapradin byl dále zkoumán na dospělých *H. contortus*. Samci a samice byli inkubováni s jednotlivými extrakty kapradin po dobu 48 hodin při teplotě 37°C. Poté byla stanovena koncentrace ATP, která byla vztažena k hodnotě koncentrace celkových proteinů. Normalizovaná hodnota ATP vyjadřuje viabilitu dospělců. Se zvyšující se koncentrací extraktů došlo k poklesu viability u samic. K signifikantnímu poklesu viability samic docházelo až při koncentraci 100 µg/ml u čtyřech z osmi testovaných kapradin. Účinné byly extrakty z *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreri*, *Dryopteris cambrensis* a *Dryopteris aemula*. Mezi samicemi a samci byly patrné značné rozdíly v reakci na přítomnost extraktů z kapradin. U samců inkubovaných s některými druhy kapradin došlo pravděpodobně vlivem stresu ke zvýšení produkce ATP.

Ve studii K. D. Rajeshe (Rajesh, 2014) byla testována anthelmintická účinnost u 6 druhů kapradin. Byly použity ethanolové extrakty kapradin, kterým byly vystaveni dospělci *H. contortus* izolovaní z abomasa ovcí. Byla stanovena doba potřebná k paralýze a úhynu jednotlivých červů. U extraktů, které vykazovaly účinky, byly dále testovány účinky *in vivo* na stádu infikovaných ovcí (*Ovis aries*). Ovce infikované *H. contortus* byly léčeny ethanolovými extrakty o koncentraci 100 mg/ml, které jim byly podávány perorálně pomocí injekční stříkačky o objemu 10 ml. 0. den (před ošetřením ovcí léčivy) a 5., 7. a 9. den po ošetření se odebíraly vzorky stolice, ve kterých byl

pomocí mikroskopu počítán celkový počet vajíček v zorném poli. Studie potvrdila anthelmintický účinek všech 6 kapradin.

Oproti studii Rajeshe (2014) byly v našich experimentech použity ethanolové extrakty jiných druhů kapradin a v koncentraci 1, 10, 50 a 100 µg/ml, což jsou menší koncentrace, než byly použity ve studii Rajeshe (2014). Extrakty z *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreri*, *Dryopteris cambrensis* a *Dryopteris aemula*, které vykazaly potenciální účinnost budou podrobeny dalším experimentům. Bude vyzkoušena jejich účinnost *ex vivo* na rezistentních kmenech *H. contortus* a případně testována jejich účinnost *in vivo* na ovčích infikovaných *H. contortus*. Z důvodu možné toxicity kapradin by měl být také sledován jejich účinek např. na ovčích hepatocytech.

7. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce

- byly z trusu infikovaných ovcí izolovány vajíčka vlasovky slézové (ISE kmen)
- byli ze slezu infikovaných ovcí izolováni dospělci vlasovky slézové (ISE kmen)
- byla provedena extrakce 8 vybraných druhů evropských kapradin
- byla testována účinnost extraktů kapradin na líhnutí vajíček pomocí EHT s mikroskopickým vyhodnocením. Žádný z testovaných extraktů neinhiboval signifikantně líhnutí vajíček vlasovky slézové.
- byl testován vliv extraktů kapradin na viabilitu dospělců *H. contortus* (ISE kmen) pomocí stanovení koncentrace ATP a proteinů. Účinné byly extrakty z *Athyrium distentifolium*, *Dryopteris borreri*, *Dryopteris cambrensis* a *Dryopteris aemula* v koncentraci 100 µg/ml.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

<i>A. cochliacantha</i>	<i>Acacia cochliacantha</i>
<i>A. muricata</i>	<i>Annona muricata</i>
<i>A. musiformis</i>	<i>Arthrobotrys musiformis</i>
<i>A. quercifolia</i>	<i>Aglaomorpha quercifolia</i>
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
ATP	adenosintrifosfát (<i>adenosinetriphosphate</i>)
BCA	kyselina bichoninová (<i>bichoninic acid</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
<i>C. citratus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. pepo</i>	<i>Cucurbita pepo</i>
CNS	centrální nervový systém
CT	kondenzované taniny (<i>Condensed tannins</i>)
<i>D. crassirhizoma</i>	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>
<i>D. esculentum</i>	<i>Dryopteris esculentum</i>
<i>D. filix-mas</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i> (kaprad' samec)
DMSO	dimethylsulfoxid
EBV	virus Epstein-Barrové (<i>Epstein-Barr virus</i>)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EHT	test líhnutí vajíček (<i>Egg hatch test</i>)
FC	flash chromatografie (<i>Flash Chromatography</i>)
GABA	γ -aminomáselná kyselina (<i>4-aminobitanoic acid</i>)
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>

H11	protein z gastrointestinálního traktu <i>H. contortus</i>
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-4-butansulfonové kyselina
H-gal-GP	<i>H. contortus</i> galaktóza obsahující glykoproteinový komplex
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HT	hydrolyzovatelné taniny (<i>Hydrolysable tannins</i>)
HTS	vysoce výkonný screening (<i>High Throughput Screening</i>)
ISE	<i>Inbred Susceptible Edinburgh</i>
L1	larva prvního stádia
L2	larva druhého stádia
L3	larva třetího stádia
L4	larva čtvrtého stádia
LC-ELSD-MS	spojení kapalinové chromatografie s ELSD detektorem a MS detekcí (<i>Liquid chromatography-Evaporative light scattering detector-Mass spectrometry</i>)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD(P)H	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (
NMR	nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
<i>O. dentatum</i>	<i>Oesophagostonium dentatum</i>
PBS	fosfátový pufr

PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase chain reaction</i>)
P-gp	P-glykoprotein (<i>P-glycoprotein</i>)
SD	směrodatná odchylka
SEM	střední chyba průměr (<i>Standard error of the mean</i>)
SONOP	Sonification solution
SPE	extrakce na pevné fázi (<i>Solid Face Extraction</i>)
<i>T. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
<i>T. macroptera</i>	<i>Terminalia macroptera</i>
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>V. amygdalina</i>	<i>Vernonia amygdalina</i>

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Seznam doporučených léků proti infekci vyvolanou H. contortus</i>	16
Tabulka 2 <i>Extrakty kapradin použitých při experimentech</i>	43
Tabulka 3 <i>Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace ATP</i>	50
Tabulka 4 <i>Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace proteinů</i>	51

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Životní cyklus <i>H. contortus</i>	11
Obrázek 2 Klinické příznaky hemonchózy	13
Obrázek 3 Provedení FAMACHA testu u kozy	14
Obrázek 4 Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých screeningových technik.....	20
Obrázek 5 Optické izomery citralu	25
Obrázek 6 Prekurzor flavanové jádro umožňující vznik dalších typů flavonoidů	27
Obrázek 7 Struktury a příklady hydrolyzovatelných a kondenzovaných taninů	28
Obrázek 8 Vzhled <i>Athyrium distentifolium</i>	37
Obrázek 9 Vzhled <i>Dryopteris borreri</i>	38
Obrázek 10 Vzhled <i>Dryopteris cambrensis</i>	39
Obrázek 11 Vzhled <i>Dryopteris aemula</i>	39
Obrázek 12 Princip stanovení ATP	49
Obrázek 13 Princip probíhající reakcí při stanovení koncentrace bílkovin.....	51
Obrázek 14 Vliv extraktů kapradin na líhnutí vajíček <i>H. contortus</i>	53
Obrázek 15 Vliv výtažků z 8 druhů kapradin na viabilitu dospělců <i>H. contortus</i>	55
Obrázek 16 Vliv výtažků ze 4 druhů kapradin na viabilitu dospělců <i>H. contortus</i>	56

11. POUŽITÁ LITERATURA

Acevedo-Ramírez P.M. del C., Hallal-Calleros C., Flores-Pérez I., Alba-Hurtado F. et al. *Anthelmintic effect and tissue alterations induced in vitro by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, Volume 266, February 2019, Pages 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.008>

Adediran O.A., Uwalaka E.C. *Effectiveness evaluation of levamisole, albendazole, ivermectin, and vernonia amygdalina in West African dwarf goats*. *Journal of Parasitology Research*, Volume 2015, Article ID 706824. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/706824>

Ahmed A.H., Ejo M., Feyera T. Regassa D. et al. *In Vitro Anthelmintic Activity of Crude Extracts of Artemisia herba-alba and Punica granatum against Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology Research*, Volume 2020, Article ID 4950196. <https://doi.org/10.1155/2020/4950196>

Ahuir-Baraja A.E., Cibot F., Llobat L., Garijo M.M. *Anthelmintic resistance: is a solution possible?* *Experimental Parasitology*, Volume 230, November 2021, 108169. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108169>

Alam Md.M., Emon N.U., Alam S., Rudra S. et al. *Assessment of pharmacological activities of Lygodium microphyllum Cav. leaves in the management of pain, inflammation, pyrexia, diarrhea, and helminths: In vivo, in vitro and in silico approaches*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 139, July 2021, 111644. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111644>

Albuquerque B.R., Heleno S.A., Oliviera M.B.P.P., Barros L. et al. *Phenolic compounds: current industrial application, limitations and future challenges*. *Food & Function*, 2021, 12, 14-29. Doi: 10.1039/D0FO02324H

Angeles-Hernández S., Torres-Hernández G., Alonso-Díaz M.A., Son-de-Fernex E. et al. *Effect of an Arthrotrys musiformis (Fungi: Orbiliales) culture filtrate on the population of gastrointestinal parasitic nematode eggs in faeces of grazing lambs*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, April 2021, Volume 24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100565>

Arsenopoulos K.V., Fthenakis G. C., Katsarou E. I., Papadopoulos E. *Haemonchosis: A Challenging Parasite Infection of Sheep and Goat*. *Animals* February, 2021. 11(2), 363. <https://doi.org/10.3390/ani11020363>

Bamigboye R.A., Yusuf A.A., Oloyede F.A. *EFFECT OF LEAD TREATMENT ON THE STIPE AND LEAFLET ANATOMY OF Pteris vittata AND Pityrogramma calomelanos (PTERIDACEAE: FERN)*. *Ife Journal of Science*, Volume 22, No. 2 (2020). Doi: 10.4314/ij.s.v22i2.10

Benniamin A. *Medical ferns of North Eastern India with special reference to Arunachal Pradesh*. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, Volume 13 (3), July 2011, Pages 516-522. Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/12015/1/IJTK%2010%283%29%20516-522.pdf>

Besier R.B., Kahn L.P, Sargison N.D., Van Wyk J.A. *Chapter Four – The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of Haemonchus contortus Infection in Small Ruminants*. *Parasitology*, Volume 93, 2016, Pages 95-143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>

Besier R.B., Kahn L.P, Sargison N.D., Van Wyk J.A. *Chapter Six – Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants*. *Parasitology*. Volume 93, 2016, Pages 181-238. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>

Botanická zahrada Praha [online]. Kapradiny [Cit. 2022-03-19]. Dostupné z: <https://www.botanicka.cz>

BOTANY.CZ. *Athyrium distentifolium; Dryopteris cambernsis*; [online]. [Cit. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://botany.cz/>

Bowman D.D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 7th Ed., 255-283. W.B. Saunders Company, 1999.

Brice K.A., Rosine A-A.M., Firmin O-B.K., Akhanovna M-B.J., Yves-Alain B. *Phytochemical and Biological Investigation of Nephrolepis biserrata, a Fern Variety From Côte D'Ivoire*. *Am. J. PharmTech Res.* 2021; 11(04). Dostupné z: https://web.archive.org/web/20211124184407id_/http://ajptr.com/assets/upload/publish_article/AJPTR114003.pdf

Castagna F, Britti D, Oliverio M, et al. *In Vitro Anthelmintic Efficacy of Aqueous Pomegranate (Punica granatum L.) Extracts against Gastrointestinal Nematodes of Sheep*. Pathogens. 2020;9(12):1063. Published 2020 Dec 18. doi:10.3390/pathogens9121063

Castillo-Mitre G.F., Rojo-Rubio R., Olmendo-Juárez A., Mendoza de Gives P. et al. *In vivo anthelmintic activity of Acacia cochliacantha leaves against Haemonchus contortus in Boer goat kids*. Rev. mex. de cienc. pecuarias vol.12 no.1 Mérida ene. /mar. 2021 Epub 20 – Sep-2021. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5131>

Costa H.R., Samão I., Silva H., Silveira P., Silva A.M.S., Pinto D.C.G.A. *Aglaomorpha quercifolia (L.) Hovenkamp & S. Linds a Wild Fern Used in Timorese Cuisine*. Foods 2021, 10, 87. <https://doi.org/10.3390/foods10010087>

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

Dargie, J.D.; Allonby, E.W. *Pathophysiology of single challenge infections of Haemonchus contortus in Merino sheep: Studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon*. Int. J. Parasitol. 1975, 5, 147–157. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90021-1)

De la Rosa L.A., Moreno-Excamilla J.O., Rodrigo-García J., Alvarez-Parilla E. *Chapter 12 – Phenolic compounds*. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruit and Vegetables, 2019, Pages 253-271. doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9

Dědková T. *Navození rezistence hlístic na albendazol* [online]. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D. https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/63700/DPTX_2013_1_11160_0_416432_0_141096.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Devi R.K., Rajesh N.V., Vasantha S., Sathia Geetha V. *Anti-Parasitic action of Actinopteris radiata, Acrostichum aureum and Hemionitis arifolia*. Pteridological research, Volume 4(1), June 2015, Pages 1-9, Article ID: jpr150315101. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/296486135>

Dilrukshi Jayawardene K.L.T., Palombo E.A., Boag P.R. *Natural Products Are a Promising Source for Anthelmintic Drug Discovery*. *Biomolecules*. 2021;11(10):1457. Published 2021 Oct 4. doi:10.3390/biom11101457

Egorova A., Gatiyatullina A., Terenzhev D., Belov T., Kalinnikova T. *Toxic action of substances from male fern *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott (1834) on freeliving soil nematode *Caenorhabditis elegans* Maupas (1900)*. *E3S Web of Conferences*, May 2021, Volume 254, 09011. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125409011>

Egualé T., Tilahun G., Debella A., Feleke A., Makonnen E. *In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus**. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 110, Issue 3, 4 April 2007, Pages 428-433. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.003>

Emery David L., Hunt Peter W., Le Jambre Leo F., *Haemonchus contortus: the then and now, and where to from here?* *International Journal for Parasitology*, Volume 46, Issue 12, November 2016, Pages 755-769, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>

Eshan M., Hu R-S., Liang Q-L., Hou J-L., Song X., Yan R., Zhu X-Q. Li X. *Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives*. *Vaccines* September, 2020, 8(3), 555. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030555>

Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., Contini S.H.T. et al. *Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: in vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus**. *Parasites & Vectors* 11, 269 (2018), April 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2849-x>

Ferreira L.E., Castro P.M.N., Chagas A.C.S., Franca S.C., Belebóni R.O. *In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep*. *Experimental Parasitology*, July 2013, Volume 134, Issue 3, Pages 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.032>

Fetterer, R.H.; Rhoads, M.L. *A hemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology*. *Vet. Parasitol.* 1998, 80, 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00187-3)

Gareh A, Elhawary N. M., Tahoun A., Ramez A. M., El-shewehy D. M. M., Elbaz E., Khalifa M. I., Alsharif K. F., Khalifa R. M. A., Dyab A. K., Monib M. E. M., Arafa M. I., Elmahallawy E. K. *Epidemiological, Morphological, and Morphometric Study on Haemonchus spp. Recover From Goat in Egypt*. Front. Vet. Sci., 26 October 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.705619>

Geary T.G, Chibale K., Abegaz B., Andrae-Marobela K., Ubalijoro E. *A new approach for anthelmintic Discovery for humans*. Trends in Parasitology. Volume 28, No. 5, May 2012.

Geary T.G. *Haemonchus contortus: applications in drug ntelmin*. Parasitology, Volume 93, 2016, Pages 429-463. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.013>

Getachew T., Dorchie P, Jacquet P. *Trends and challenges in the effective and sustainable control of Haemonchus contortus infection in sheep. Review*. Parasite, EDP Sciences, 2007, 14 (1), pp.3-14. [ff10.1051/parasite/2007141003](https://doi.org/10.1051/parasite/2007141003)

Han X., Li Z., Li Ch-Y., Jian W-N., Wang H-T., Wang Ch-H. *Phytochemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus Dryopteris*. Chemistry & Biodiversity, August 2015, Volume 12, Issue 8, Pages 1131-1162. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400157>

Hardy Fern Library. *Dryopteris aemula* [online]. [Cit. 2022-03-16]. Dostupné z: <https://hardyfernlibrary.com/ferns/home.html>

Hertzberg R.P., Pope A.J. *High-throughput screening: new technology for the 21st century*. Current Opinion in Chemical Biology, Volume 4, Issue 4, August 2000, Pages 445-451. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00110-1)

Hoste H., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Mueller-Harvey I., Sotiraki S., Thamsborg S.M., Terrill T.H. *Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock*. Veterinary Parasitology, Volume 212, Issues 1-2, 15 August 2015, Pages 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026>

ChemSrc [online]. Alhacin [Cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.chemsrc.com/en/>

Jagannathan S.V., Manemann E.M., Rowe S.E., Callender M.C., Soto W. Marice Actinomycetes, *New Sources of Biotechnological Products*. Marine Drugs 2021 Volume 19, Issue 7. <https://doi.org/10.3390/md19070365>

Jiang, B., Chi, C., Fu, Yw. et al. *In vivo anthelmintic effect of flavonol rhamnosides from Dryopteris crassirhizoma against Dactylogyrus intermedius in goldfish (Carassius auratus)*. Parasitol Res 112, 4097–4104 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3600-3>

Kakimori M.T.A., Debiage R.R., Gonçalves F.M.F., Gonçalves da Silva R.M., Yoshihara E., Toledo de Mello-Peixoto E.C. *Anthelmintic and antioxidant potential of banana bracts (Musa paradisiaca) extract in ruminants*. Acta Veterinaria Brasilica, March 13 (2019) 18-23. <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2019131.7917>

Kotze A.C., Prichard R.K. *Chapter Nine – Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus: History, Mechanisms and Diagnosis*. Parasitology. Volume 93, 2016, Pages 397-428. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>

Langhansová L., Landa P., Kutil Z., Tauchen J. et al. *Myrica rubra leaves as a potential source of a dual 5-LOX/COX inhibitor*. Food and Agricultural Immunology, 09 January 2017, 28:2, Pages 343-353. <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1272554>

Lanusse C., Canton C., Virkel G., Alvarez L., Costa-Junior L., Lifschitz A. *Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants*. Trends in Parasitology, Volume 34, Issue 8, August 2018, Pages 664-682. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.005>

Ma, G., Wang, T., Korhonen, P.K. et al. *Dauer signalling pathway model for Haemonchus contortus*. Parasites Vectors 12, 187 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3419-6>

Macedo I.T.F., de Oliveira L.M.B., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L. et al. *Anthelmintic activity of Cymbopogon citratus against Haemonchus contortus*. Vet. Parasitology. February 2, 2015. Volume 24. Pages 268-275. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015059>

Mayer A.M.S., Guerrero A.J., Rodríguez A.D., Tagliatela-Scafati O., Nakamura F., Fusetani N. *Marine Pharmacology in 2014–2015: Marine Compounds with*

Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, Antiviral, and Anthelmintic Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. Marine Drugs 2020, Volume 18, Issue 1. <https://doi.org/10.3390/md18010005>

Merck, Sigma Aldrich, 2022 [online]. MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation [Cit. 2022-02-19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com>

Naeem, M., Iqbal, Z. & Roohi, N. *Ovine haemonchosis: a review.* Trop Anim Health Prod 53, 19 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02439-8>

Natura Bohemica příroda České republiky, 2012 [online]. *Dryopteris borreeri – kaprad' rezavá* [Cit. 2022-3-16]. Autor: Václav Dvořák. Dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz>

Nguyen, L.T., Zajíčková, M., Mašátová, E. et al. *The ATP bioluminescence assay: a new application and optimization for viability testing in the parasitic nematode Haemonchus contortus.* Vet Res 52, 124 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00980-4>

Nishiumi S., Miyamoto S., Kawabata K., Ohnishi K. et al. *Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors.* Frontiers in bioscience, June 2011, 3. 1332-62. Dostupné na: https://www.researchgate.net/publication/51174448_Dietary_flavonoids_as_cancer-preventive_and_therapeutic_biofactors

PLADIAS, 2014-2022 [online]. *Dryopteris carthusiana – kaprad' osténkatá.* [Cit. 2022-3-16]. Dostupné z: <https://pladias.cz>

Portál české flóry [online]. *Kaprad' kambrická / Dryopteris cambrensis.* [Cit. 2022-3-16]. Dostupné z: <http://flora.upol.cz>

Promega, 2022 [online]. ATP Assays [Cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com>

Příroda Vysočiny [online]. *Dryopteris borreeri (Newman) Oberh. et Tavel – kaprad' borreerova v Kraji Vysočina.* [Cit. 2022-3-16]. Dostupné z: <http://prirodavysočiny.cz>

Qamar M. F., Maqbool A., Khan M. S., Ahmad N., Muneer M. A. *Epidemiology of Haemonchus in sheep and Goats under different managerial conditions*. Veterinary World, November, 2009, Vol. 2 (11):413-417.

Rajesh K. D. *Anthelmintic efficacy of selected ferns in sheeps (Ovis aries.Linn)*. International Journal of Ethnobiology & Ethnomedicine, Volume 1, Issue 1, Pages 1-14, January 2014. Article ID: EBM14 07. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/296486131_Anthelmintic_efficacy_of_selected_ferns_in_sheeps_Ovis_ariesLinn

Rajesh K.D., Vasantha S., Rajesh N.V., Panneerselvam A. *Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis in Four Pteridophytes*. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 27(2), July-August 2014, Article No. 72, Pages 408-412. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/283359437>

Říhová Helena. *Flavonoidy. Stručný přehled a biologický význam*. Hradec Králové, 2008. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce prof. RNDr. Eva Kvasničková CSc. https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/17036/BPTX_0_0_11160_0_55761_0_18142.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Salehi B., Ezzat S.M., Fokou P.V.T., Albayrak S., Vlaisavljevic S. et al. *Athyrium plants – Review on phytopharmacy properties*. Journal of Traditional and Complementary Medicine, July 2019, Volume 9, Issue 3, Pages 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.09.001>

Sargison N.D., Redman E., Morrison A.A., Bartley D.J. et al. *Mating barriers between genetically divergent strains of the parasitic nematode Haemonchus contortus suggest incipient speciation*. International Journal for Parasitology, Volume 49, Issue 7, June 2019, Pages 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.02.008>

Semwal P., Painuli S., Painuli K.M., Antika G., Tumer T.B. et al. *Diplazium esculentum (Retz.) Sw.: Ethnomedicinal, Phytochemical, and Pharmacological Overview of the Himalayan Ferns*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2021, Article ID 1917890, 15 Pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1917890>

Shah, M.D., Venmathi Maran, B.A., Haron, F.K. et al. *Antiparasitic potential of Nephrolepis biserrata methanol extract against the parasitic leech Zeylanicobdella arugamensis (Hirudinea) and LC-QTOF analysis*. Sci Rep 10, 22091 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79094-4>

Schwarz E. M, Korhonen P. K., Campbell B. E., Young N. D et al. *The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode Haemonchus contortus*. Genome Biology 14(8): R89, August 2013. DOI:10.1186/gb-2013-14-8-r89

Silva C.R., Lifschitz A.L, Macedo S.R.D., Campos N.R.C.L. et al. *Combination of synthetic anthelmintics and monoterpenes: Assessment of efficacy and ultrastructural and biophysical properties of Haemonchus contortus using atomic force microscopy*. Veterinary Parasitology, Volume 290, February 2021. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109345>

Spiegler V., Liebau E., Hensel A. *Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with ntelmintik activity against intestinal nematodes*. Natural Product Reports, 2017, 34, Pages 627-643. Doi: 10.1039/C6NP00126B

Suteky T., Dwatmadji. *The Use of Melastoma malabatricum and Manihot esculenta extract as natural anthelmintic on the Performance of Kacang goat*. Earth and Environmental Science 347 (2019) 012015. Doi: 10.1088/1755-1315/347/1/012015

The University of Rhode Island, 2022 [online]. *Northeast small ruminant parasite control* [Cit. 2022-6-11]. Dostupné z: <https://web.uri.edu/sheepngoat/famacha/>

Thermo Fisher Scientific [online]. Pierce™ BCA Protein Assay Kit; BCA Assay and Lowry Assays [Cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>

Ultari A., Handayani D., Eriadi A. *A Review: Study of Chemical Content, Bioactivity of Mangrove Fern Plants (Acrostichum aureum L.)*. EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology, Volume 3, Issue 1, Jan-Feb: 2021. Doi: 10.36349/easjpp.2021.v03i01.002

Vadlejch J., Burešová E., Langrová I. *Zjišťování anthelmintické účinnosti biologicky aktivních látek rostlin*. Metodika [online]. Praha, 2018. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská

univerzita v Praze. https://metodiky.agrobiologie.cz/wp-content/uploads/Anthelminticka_ucinnost_PSM_vadlejch-et-al._FIN.pdf

Wang Chunqun, Li Fangfang, Zhang Zongze et al. *Recent Research Progress in China on Haemonchus contortus*. *Front. Microbiol.*, 21 August 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01509>

Woodhead M., Russel J., Squirrell J., Hollingsworth P.M., Mackenzie K. et al. *Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions*. *Molecular Ecology*, April 2005, Volume 14, Issue 6, Pages 1681-1695. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02543.x>

Woods D.J., Lauret Ch., Geary T. *Anthelmintic Discovery and development in the animal health industry*. *Drug Discovery*, Volume 2, 2007. Pages S25-S33. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S25>

Yañez A., Gutiérrez D.G., Ponce M.M. *Weedy ferns (Polypodiopsida) in Argentina: diversity, distribution and impact on human activities and ecosystems*. *An Acad Bras Cienc* (2020) 92(1): e20180983 DOI 10.1590/0001-3765202020180983.

Zajíčková M., Nguyen L.T., Skálová L., Raisová Stuchlíková L., Matoušková P. *Anthelmintics in the future: current trends in the anthelmin and development of new drugs against gastrointestinal nematodes*. *Drug Discovery Today*. Volume 25, Number 2. February 2020. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>

Zarlenga D.S., Hoberg E.P, Tuo W. *Chapter Five – The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis*. *Advances in Parasitology*, Volume 93, 2016, Pages 145-180. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.023>

Ziaja-Softys M. Kołodziej P., Stefaniuk D., Matuszewska A., Jaszek M., Bogucka-Kocka A. *Low-Molecular-Weight Secondary Metabolites from Fungi: *Cerrena unicolor* as a New Proposal of an Effective Preparation against *Rhabditis* Nematodes*. *Molecules* 2022, Volume 27, Issue 5. <https://doi.org/10.3390/molecules27051660>