

PROJEKTA ATSKAITE - KOPSAVILKUMS

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds
lauku attīstībai

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

LATVIJAS BIOZINĀTŅU UN TEHNOLOĢIJU UNIVERSITĀTE
VETERINĀRMEDICĪNAS FAKULTĀTE



Projekts Nr. 22-00-A01612-000007

“Latvijas tradicionālā ārstniecības augs biškrēsliņa lapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāru kontroli”

ZINĀTNISKĀ ATSKAITE

Īstenošanas periods: 06.06.2022-31.05.2025

Projekta kopējās izmaksas: EUR 410 460,00

Projekta vadītāja: profesore, Dr.med.vet., vadošā pētniece **Līga Kovaļčuka**

Projekta koordinators: LBTU projektu administratore **Ilze Viķe**: ilze.vike@lbtu.lv

Sadarbības partneri:

- ☐ Rīgas Stradiņa universitāte, Farmācijas fakultāte
- ☐ SIA “Mikaitas”
- ☐ ZS “Ceļmalas”
- ☐ IK Raimonds Šnore
- ☐ IK Andris Pridāns
- ☐ IK Nata Mālniece
- ☐ ZS Trejdeviņi Trešelnieki
- ☐ Lopkopības saimniecību asociācija (LSA)



Latvijas tradicionālā ārstniecības augs biškrēsliņa lapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāru kontroli

Saturs

1. Projekta partneri un izpildītāji.....	3
2. Kopsavilkums.....	5
3. Projekta mērķis un uzdevumi.....	6
4. Projekta pārskatā lietotie saīsinājumi.....	7
5. Ievads.....	8
6. Projekta aktualitāte.....	11
7. Materiāli un metodes.....	12
7.1. Aktīvo vielu ieguve, analīze.....	12
7.2. Zāļu formas izstrāde, aprobācija.....	12
7.3. Eksperimenta fāze <i>in-vitro</i>	13
7.4. Eksperimenta fāze <i>in-vivo</i>	14
7.5. Lauka pētījuma fāze – <i>in-vivo</i>	17
7.6. Laboratoriskie izmeklējumi.....	18
7.6.1. Asins hematoloģiskā un bioķīmiskā analīze.....	18
7.6.2. Fekāliju koproloģiskā izmeklēšana.....	19
7.6.3. Paraugu mikrobioloģiskā izmeklēšana.....	19
7.6.4. Paraugu histopatoloģiskā izmeklēšana.....	20
7.7. Datu statistiskā apstrāde.....	22
8. Rezultāti un Diskusija.....	24
8.1. Zāļu formas izstrāde, aprobācija.....	24
8.2. Eksperimenta fāze <i>in-vitro</i>	24
8.3. Eksperimenta fāze <i>in-vivo</i>	25
8.3.1. Vispārīgie veselības rādītāji.....	25
8.3.2. Asins hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji.....	26
8.3.3. Parazitoloģiskie rezultāti.....	27
8.3.4. Bakterioloģiskie rezultāti.....	29
8.3.5. Histoloģiskie rezultāti.....	31
8.4. Lauka pētījuma fāze.....	37
8.4.1. Vispārīgie veselības rādītāji.....	37
8.4.2. Asins hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji.....	40
8.4.3. Parazitoloģiskie rezultāti.....	45
8.4.4. Bakterioloģiskie rezultāti.....	47
9. Publicitāte.....	48
10. Pētījumā sasniegtie mērķi.....	51
11. Secinājumi.....	52
12. Izmantotā literatūra.....	53
13. Pielikums.....	55

1. PROJEKTA PARTNERI UN IZPILDĪTĀJI:

1. Vadošais partneris:

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte (LBTU)) Veterinārmedicīnas fakultāte – projekta administrēšana, literatūras izpēte, metodikas izstrāde, ārstniecības augu *in-vitro* pētījumi, *in-vivo* pētījumu veikšana, zinātniskā interpretācija, rezultātu interpretācija.

www.lbtu.lv.

Izpildītāji:

- ☐ Vadošā pētniece, prof. Līga Kovalčuka: kovalcuka@gmail.com, liga.kovalcuka@lbtu.lv
- ☐ Vadošā pētniece, prof. Dace Keidāne: dace.keidane@lbtu.lv
- ☐ Vadošā pētniece, prof. Anda Valdovska: anda.valdovska@lbtu.lv
- ☐ Vadošā pētniece, prof. Ilze Matīse VanHoutan: imatisevh@gmail.com
- ☐ Pētniece, Alīna Kļaviņa: alina.klavina@lbtu.lv
- ☐ Pētniece, Aīda Vanaga: aida.vanaga@lbtu.lv
- ☐ Pētniece, Aija Mālniece: ajia.malniece@lbtu.lv
- ☐ Dace Stankeviča: dace.stankevica@lbtu.lv
- ☐ Pētnieks, Ivars Lūsis: ivars.lusis@lbtu.lv
- ☐ Pētniece, doc. Daiga Gāliņa: daiga.galina@lbtu.lv
- ☐ Laborants Inga Burkāne
- ☐ Laborants, Kristīne Ganola
- ☐ Dzīvnieku kopēja Daiga Meija
- ☐ Dzīvnieku kopējs Renārs Rauga

2. Sadarbības partneri:

2.1. Rīgas Stradiņa universitāte, Farmācijas fakultāte (RSU FF) – Latvijas tradicionālo ārstniecības augu (biškrēsliņa) iegūšana, ekstraktu sagatavošana, izpēte, atšķaidījumu sagatavošana, jaunu zāļu formu izveide, aprobācija.

www.rsu.lv

Izpildītāji:

- ☐ Vadošā pētniece, prof., Dr.pharm., Dace Bandere: dace.bandere@rsu.lv
- ☐ Vadošā pētniece, Dr.sc.ing. Agnese Brangule: agnese.brangule@rsu.lv
- ☐ Vadošā pētniece, Mg.pharm. Ance Bārzdiņa: ance.barzdina@rsu.lv
- ☐ Laborants Renāte, PhD, Teterovska (Šukele): rsukele@gmail.com

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

www.mikaitas.lv

Izpildītāji:

- ☐ Veterinārārste, aitu saimniecības īpašniece - Aija Šneidere

2.3. ZS “Ceļmalas” – projekta idejas līdzautors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un eksperimentālo dzīvnieku nodrošināšana projekta vajadzībām.

Izpildītāji:

- ☐ Veterinārārsts, aitu saimniecības īpašnieks – Jānis Miķelsons

2.4. IK Andris Pridāns – projekta idejas līdzautors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un lauka pētījuma dzīvnieku nodrošināšana projekta vajadzībām.

Izpildītāji:

- ☐ Aitu saimniecības īpašniece – Līga Pridāne

2.5. IK Raimonds Šnore – projekta idejas līdzautors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un lauka pētījuma dzīvnieku nodrošināšana projekta vajadzībām.

Izpildītāji:

- ☐ Aitu saimniecības īpašnieks – Raimonds Šnore

2.6. IK Nata Mālniece – projekta idejas līdzautors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un lauka pētījuma dzīvnieku nodrošināšana projekta vajadzībām.

Izpildītāji:

- ☐ Aitu saimniecības īpašniece – Nata Mālniece

2.7. ZS “Trejdeviņi Trešelnieki” – projekta idejas līdzautors, aitu audzētājs, aitu fekālo un parazitāro paraugu iegūšana un lauka pētījuma dzīvnieku nodrošināšana projekta vajadzībām.

Izpildītāji:

- ☐ Aitu saimniecības īpašniece - Aija Vārkava

2.8. Lopkopības saimniecību asociācija – Projekta publicitātes partneris

Izpildītāji:

- ☐ Ilva Bērziņa

2. KOPSAVILKUMS

Projekta mērķis ir izstrādāt inovatīvus, bioloģiski aktīvus fitopreparātus no Latvijā augošiem ārstniecības augiem, kas paredzēti atgremotājdzīvnieku (piemēram, aitu un kazu) gremošanas sistēmas parazitā – īpaši *Trichostrongylidae* dzimtas – kontrolei.

Galvenie uzdevumi:

- Pētīt augu ekstraktu efektivitāti pret parazitāriem laboratorijas un praktiskos apstākļos (*in-vitro* un *in-vivo*),
- Attīstīt inovatīvu fitopreparātu formu – piemēram, biškrēsliņa ekstraktu intraruminālā bolā,
- Nodrošināt alternatīvu pretparazitāro līdzekļu pielietošanu, īpaši bioloģiskajās saimniecībās, kur ierobežota ķīmisko zāļu izmantošana.

Problēmas būtība:

- Gremošanas parazitāri (strongilīdi) ir plaši izplatīti Latvijas aitkopībā, sasniedzot līdz 80% invāzijas līmeni.
- Komerčiāli pieejamās pretparazitārās zāles ir dārgas, rada blakusefektus, atstāj atliekvielas produkcijā un veicina parazitāru rezistenci.
- Līdzekļu lietošana izraisa arī vides piesārņojumu, ietekmējot kukaiņus un ūdens organismu veselību.

Projekta ieguvumi:

- Jauni, efektīvi un droši fitopreparāti ar zemu rezistences risku;
- Samazināta parazitāru slodze, uzlabota dzīvnieku veselība, produktivitāte un pārtikas drošība;
- Samazinātas lauksaimnieku izmaksas, īpaši bioloģiskajās saimniecībās;
- Mazāks ekoloģiskais nospiedums un vides slogs, jo tiek izmantoti vietējie, bieži sastopami augi (piemēram, biškrēsliņš);
- Iespēja attīstīt ilgtspējīgu lauksaimniecību, saskaņā ar "Vienas veselības" (One Health) pieeju.

Secinājums: Projekts piedāvā risinājumu aktuālai problēmai – pretparazitārās rezistences mazināšanai, izmantojot vietējus augus, tādējādi nodrošinot dzīvnieku labturību, drošu pārtikas ražošanu un vides aizsardzību.

3. PROJEKTA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

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

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

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

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

4. PROJEKTA PĀRSKATĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

1. RSU FF – Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas fakultāte
2. LBTU - Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
3. VMF –Veterinārmedicīnas fakultāte
4. PVHI – Pārtikas un Vides higiēnas institūts
5. KLIN – Klīniskais institūts
6. LSA - Lauksaimniecības saimniecību asociācija
7. LSA – Lopkopības saimniecību asociācija
8. VIC – Veterinārmedicīnas Izglītības centrs
9. LAD – Lauku Atbalsta dienests
10. LR PVD - Latvijas Republikas Pārtikas un Veterinārais dienests
11. L1 – pirmās attīstības stadijas kāpurs/i
12. L2 – otrās attīstības stadijas kāpurs/i
13. L3 – trešās attīstības stadijas kāpurs/i
14. NegK - negatīvās kontroles grupa (aitu grupa, kura netiek attārpota, netiek ievadīts bols).
15. PozK - pozitīvās kontroles grupa (aitu grupa, kura tiek attārpota ar veterinārmedicīnā klasiski izmantotu pretparazītāro līdzekli levamizolu 5 mg/kg).
16. Gran - pētījuma grupa, kurai izbarotas biškrēsliņa saturošas granulas.
17. LaukK – lauka pētījuma kontroles grupa
18. LaukB - lauka pētījuma bolu grupa
19. WBC - leukocīti,
20. RBC - eritrocīti
21. HGB – hematokrīts
22. HCT - hemoglobīns,
23. MCV - vidējais eritrocītu tilpums
24. MCH - hemoglobīna saturs eritrocītā
25. MCHC - hemoglobīna koncentrācija eritrocītā
26. RDW - eritrocītu sadalījuma platums
27. PLT – trombocīti
28. MPV - vidējais trombocītu tilpums
29. AST – aspartāminotransferāze
30. LDH – laktātdehidrogenāze
31. GGT - gamma-glutamīltransferāze
32. CK – kreatīnkināze
33. TP - kopējais proteīns
34. ALB - albumīns

5. IEVADS

Parazitārās invāzijas radītie negatīvie efekti gan uz dzīvnieka veselību, labturību, gan drošas pārtikas ražošanu un vidi ir aktuāli visā pasaulē. Pasaulē (Torres-Acosta, Hoste, 2008) un Latvijā gremošanas sistēmas strongilīdu invāzijas aitū un kazu ganāmpulkos ir būtiska problēma, un invāzijas ekstensitāte atsevišķos ganāmpulkos sasniedz pat 70% - 80% (Keidāne et al., 2022).

Visbiežāk atgremotājdzīvnieki invadējas ar *Trichostrongylidae* dzimtas sekojošām ģintīm: *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp. un *Nematodirus* spp. (Kaplan M.R., 2013). Gremošanas strongilīdi parazitē atgremotājdzīvnieku īstajā kuņģī - glumeniekā un tievajās zarnās.

Invāzijas raksturojas ar dažādas pakāpes diareju, dzīvnieki novājē, samazinās to produktivitāte, kā arī var novērot anēmiju (sevišķi *Haemonchus* spp. invāzijām) (Dehuri M., et al., 2021). Stipras invāzijas gadījumos no dzīvniekiem iegūtais piena un gaļas produkcijas daudzums samazinās pat par 50-70 % (Sargison et al., 2009, Mavrot et al., 2015).

Latvijā aitām visbiežāk konstatē *Eimeria* spp. 97%, *Trichostrongylidae* 91% un *Strongyloides* spp. 76% (Keidāne et.al., 2022). Visiem gremošanas sistēmā parazitējošiem strongilīdiem raksturīgi, ka to olas izdalās ārējā vidē ar dzīvnieku fekālijām. Tālākā parazītu attīstība notiek ārvidē, kur attīstās L3 stadijas kāpurs, kas ir invadēt spējīgs. Tas nozīmē, ka ganības ir piesārņotas ar L3 stadijas kāpuriem un kalpo kā invāzijas avots. Šo parazītu profilakse un kontrole ir būtiska gan no dzīvnieku labturības un ganāmpulka veselības viedokļa (Belecka A., et al., 2021).

Latvijas tirgū pieejamo pretparazitāro medikamentu piedāvājums ir nepietiekams. Atgremotājdzīvniekiem veterinārajās aptiekās pieejamās pretparazitārās zāles satur ivermektīnu, eprinomektīnu, pārstāvot makrociklisko laktonu grupu un albendazolu, fenbendazolu, pārstāvot benzimidazolu grupu, levamizolu (imidazotiazolu grupu), monepantelu (amino-acetonitrila derivāts).

Benzimidazolu grupas medikamentu atliekvielas var konstatēt pat 1-3 nedēļas pēc medikamenta lietošanas un pirms kaušanas aizlieguma periods (karences periods) var sasniegt 7-29 dienas. Tāpat jāņem vērā fakts, ka daļu no zāļu grupas pārstāvjiem nedrīkst lietot laktējošiem dzīvniekiem. Lai gan benzimidazoli kopumā ir droši medikamenti, tomēr, piemēram, albendazols var būt teratogēns un embriotoksisks (Teruel M., 2011). Vairākiem medikamentiem novēro arī krustenisko rezistenci (Prichard R.K., Geary T.G., 2019) un multiplo rezistenti (Kaplan M.R., 2013).

Makrocikliskie laktoni ilgu laiku uzkrājas audos un pirmskaušanas aizlieguma laiks (karences periods) atgremotājdzīvniekiem var sasniegt pat 66 dienas pēc zemādas injekcijas. Tos nedrīkst lietot laktējošiem dzīvniekiem, tostarp grūsnēm dzīvniekiem 60 dienu laikā pirms atnešanās un dzīvniekiem, kuru pienu plānots izmantot pārtikā. Vienlaicīgi visā pasaulē konstatēta augoša rezistence pret pretparazitārajiem līdzekļiem (Kupčinskas et.al. 2016, Untersweg et al., 2021) un Latvijā rezistence konstatēta pret ivermektīnu un albendazolu (Keidāne et al., 2022). Jāņem vērā, ka makrociklisko laktonu grupas zāles, tai skaitā ivermektīns, izdalās 98% caur fēcēm neizmainītā veidā (Beynon, 2012) un ir kaitīgs ārējā vidē esošiem kukaiņiem, kas barojas no dzīvnieku fekālijām, gan izteikti toksisks ūdens dzīvniekiem (Prichard R.K., Geary T.G., 2019) (Beynon, 2012).

Antiparazitārās rezistences iemesli ir vairāki, to skaitā pārlietu bieža, nepamatota un kļūdaina zāļu lietošana (Leathwick, Luo, 2017, Kovaļčuka et al., 2022). Lai mazinātu zāļu radīto rezistenci, šobrīd aktuāli ir pētījumi par jaunu, alternatīvu parazītu kontroles sistēmu ieviešanu, lai mazinātu aitu invadēšanos, parazītu izdalīšanos un ganību piesārņotību (Castagna F. et al., 2021).

Visā pasaulē tiek meklēti alternatīvi līdzekļi, kā mazināt parazītu radīto slogu dzīvniekiem un saimniecības ekonomikai. Kā alternatīva ķīmiskajiem pretparazitārajiem zālēm tiek norādīti fitoterapeitiskie preparāti (Dehuri M., et al., 2021, Castagna F. et al., 2021), ko varētu pielietot lauksaimniecības dzīvniekiem gremošanas sistēmā parazitējošo strongilīdu kontrolei, lai vienlaikus samazinātu parazītu radīto negatīvo ietekmi uz dzīvnieku veselību, imunitāti un produktivitāti, kā arī mazinātu ekonomiskos izdevumus lauksaimniecības uzņēmumiem. Pēdējos gados visā pasaulē pieaug interese par fitoterapeitisko līdzekļu, piedevu izmantošanu lauksaimniecības dzīvniekiem dažādu slimību profilaksei, kontrolei un imunitātes stiprināšanai.

Latvijā ir veikta izpēte un apzināti Latvijas dabā sastopamie augi, kuriem ir potenciāls pretparazitārais efekts (Klavina et al., 2021). Sadarbībā ar RSU un LBTU ir realizēts pētniecības projekts, kurā pētīti vairāku Latvijā sastopamu ārstniecības augu ekstraktu iedarbība uz aitu parazītu attīstību un dzīvot spēju laboratorijas apstākļos, *iv-vitro* (Klavina et al., 2022). Rezultātā biškrēsliņa ekstrakts uzrādīja pozitīvu efektu (nomāca parazītu attīstību un dzīvotspēju *in-vitro*), tādēļ bija nepieciešama tālāka šī auga ekstrakta iestrāde inovatīvā un ērti lietojamā produktā un tā efektivitātes izpēte *in-vivo* apstākļos aitām. Jaunatklātu fitopreparātu izmantošana dotu iespēju lietot dzīvnieka organismam mazāk kaitīgus, dabiskus, bioloģiskas izcelsmes produktus, kas vienlaicīgi mazinātu potenciālos negatīvos efektus, ķīmisko zāļu radītās blakusparādības, vienlaicīgi mazinot zāļu atliekvielu esamību cilvēkiem paredzētajos pārtikas produktos. Jāatzīmē, ka sekmīga fitoterapeitisko līdzekļu ar pretparazitāru efektu lietošanas ieviešana saimniecībās mazinātu Latvijā jau aitām konstatēto gremošanas trakta parazītu rezistenci pret Latvijas tirgū pieejamajiem ķīmiskajiem pretparazitārajiem līdzekļiem (Keidāne, 2022).

Bioloģiskajās saimniecībās pēc pretparazitāru medikamentu lietošanas, gaļas un piena realizācijas laiks pagarinās par 70 dienām. Fitopreparātu lietošana būtiski uzlabotu un atvieglotu parazītu kontroli bioloģiskajās saimniecībās, kur farmakoloģisko līdzekļu lietošana ir ierobežota un nav vēlama (Cabaret J. et al., 2002).

Kā viena no zaļās domāšanas piemēriem, ir lietot valstij raksturīgus ārstnieciskos augus kā parazītu kontroles līdzekļus, kas būtu lētāki kā komerciālie medikamenti, drošāki dzīvniekam un videi, un to ražošanā izmanto vietējās izejvielas. Biškrēsliņi Latvijā ir plaši sastopami ārstnieciskie augi. Pētījuma laikā tika plānots sagatavot biškrēsliņa liofilizātu un to iestrādāt inovatīvi veidotā intraruminālā bolā, ko plānveidā var ievadīt aitām un lēna aktīvās vielas izdale atgremotāju kuņģos radītu nelabvēlīgu vidi parazītu attīstībai. Šādi tiktu samazināta parazītu radītā slodze uz dzīvnieka organismu, samazinot pretparazitāro līdzekļu lietošanu un samazinot zāļu radīto rezistenci, kā arī vienlaicīgi samazinātu ekonomiskos zaudējumus, kas saistīti ar zāļu regulāru lietošanu, parazitožu ārstēšanu, jēru krišanu, masas pieauguma zudumu. Samazinot parazītu koncentrāciju dzīvnieku fekālijās, mazinātos arī ganību piesārņošana un tiktu samazināta parazītu cirkulācija ganāmpulkos. Pētījumā tika arī pārbaudīta biškrēsliņa ietekme kopumā uz zarnu mikrobiotu un klostridiozes sastopamību, kas ir biežs aitu krišanas iemesls.

Pētījumā iegūtie rezultāti veicina ekonomiski dzīvotspējīgu lauksaimniecību, lietojot ilgstošas izdales bolus, mazinātos vajadzība pēc pretparazitāro līdzekļu lietošanas. Samazinot pretparazitāro līdzekļu lietošanu, samazinātos lauksaimnieka izmaksas medikamentu iegādei, dzīvnieku ārstniecībai un samazinot potenciālās rezistences riskus, kas visā pasaulē aitu medicīnā atzīmēta kā liels slogs ekonomikai, vienlaicīgi nodrošinot parazītu kontroli saimniecībā un bioloģiski tīras produkcijas iegūšanu. Jāatzīmē, ka farmaceitisko līdzekļu mazāka, racionāla, pamatota lietošana, mazinātu slogu videi un ekosistēmai, jo lielākā daļa medikamentu, pēc to lietošanas, neizmainītā veidā izdalās no organisma vidē un var negatīvi ietekmēt vides ekoloģiju - kukaiņu un zivju veselību.

Pētījumos izmantotais biškrēsliņš Latvijā ir uzskatāms ne tikai par ārstniecības augu, bet arī plaši sastopams kā nezāle, līdz ar to veicinātu pilna ražošanas cikla nodrošināšanu, izmantojot videi mazāk noderīgus augus fitopreparātu ražošanai, kas uzlabotu ne tikai aitu veselību, bet nodrošinātu drošu, bioloģiski tīru lauksaimniecības produkciju - gaļu, tā radot pievienotu produkcijas vērtību.

Ņemot vērā, ka fitoterapeitiskie līdzekļi nav zāles, to attīstīšanas un ražošanas izmaksas ir mazākas un to gala cena var būt izteikti zemāka kā medikamentiem, kas dotu iespēju ietaupīt lauksaimniekiem.

Jāuzsver, ka efektīva līdzekļa rezultātā, tas būtu liels pienesums pasaulē būtiskas problēmas - pretparazitārās rezistences mazināšanai un vienas veselības koncepta ietvaros tiktu iegūts dzīvniekiem drošs, videi raksturīgs augu līdzeklis parazītu invāzijas mazināšanai un drošas produkcijas iegūšanai.

6. PROJEKTA AKTUĀLITĀTE

RSU FF pētnieku vadībā tika izstrādāta inovatīva ilgstošas izdales 3D printēts intrarumināls bols, kas satur biškrēsliņa lapu ekstraktu, kura pretparazitārā efektivitāte tika pārbaudīta *in-vivo* aitām kontrolētos apstākļos LBTU Veterinārmedicīnas fakultātē un sekojošā lauka pētījumā pie projekta partneriem.

Projektā iegūtie rezultāti veicina dzīvnieku veselību un labturības prasību uzlabojošu un videi draudzīgāku lauksaimniecību, jo lietojot inovatīvus ilgstošas izdales bolus, kas satur augu izcelsmes ekstraktu ar potenciālu pretparazitāru iedarbību, mazinātos gremošanas trakta parazītu radītais negatīvais efekts un mazinātos nepieciešamība pēc ķīmisko pretparazitāro zāļu lietošanu.

Samazinot pretparazitāro zāļu lietošanu, samazinātos potenciālās rezistences riski, kas visā pasaulē aitu medicīnā atzīmēti kā liels slogs dzīvnieku veselībai, labturībai un ekonomikai (Charlier et al., 2014), vienlaicīgi nodrošinot parazītu kontroli saimniecībā un bioloģiski tīras produkcijas iegūšanu. Farmaceitisko līdzekļu mazāka, racionāla, pamatota lietošana, mazinātu slogu videi un ekosistēmai, jo lielākā daļa pretparazitāro medikamentu, pēc to lietošanas, neizmainītā veidā izdalās no organisma vidē un var negatīvi ietekmēt vides ekoloģiju - kukaiņu un zivju veselību un pat augus (Boxal et al., 2004, Bártíková et al., 2016). Jāuzsver, ka efektīva līdzekļa rezultātā, tas būtu liels pienesums pasaulē būtiskas problēmas - pretparazitārās rezistences mazināšanai un vienas veselības koncepta ietvaros tiks iegūts efektīvs pretparazitārs kontroles un profilakses līdzeklis, kas ir bioloģiskam areālam raksturīgs.

Šāds pētījums saskaņā ar pieejamo literatūru, kas pieejama “Web of Science”, “EBSCO HOST”, PubMed” un “ScienceDirect” datubāzēs, izmantojot atslēgas vārdus - *Tanacetum*, *Asteraceae*, *Tanacetum vulgare*, *tansy*, ir vienīgais.

7. MATERIĀLI UN METODES

7.1. Aktīvo vielu ieguve, analīze

Biškrēsliņa lapas tika ievāktas 2022. gada augustā Allažu pagastā (57,083579, 24,782287), Latvijā. Augu identitāti noteica prof. Dr. pharm. D. Bandere. Augu references herbāriji glabājās Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas fakultātes augu kolekcijā ar marķējumu BL-2022. No lakstiem lapas atdalīja ar rokām un istabas temperatūrā žāvēja noēnotā vietā. Izžāvētais materiāls tika uzglabāts papīra maisiņos tumsā. Procedūras tika veiktas saskaņā ar Pasaules Veselības organizācijas vispārējām pamatnostādnēm augu savākšanai un pārstrādei. Lapas tika sasmalcinātas dzirnavās un izsijātas caur 2 mm sietu.

Biškrēsliņa lapu ekstraktu ieguva izmantojot macerācijas metodi, konstanti maisot ar orbitālo kratītāju (PSU-10 i Biosan, Rīga, Latvija) 2 h istabas temperatūrā. Kā ekstragēnts tika izmantots 50% etanols. Maisījumi tika filtrēti caur 9 mm diametra filtrpapīru (Sartorius, FT-3-303-110, Vācija). Tālāk šķīdinātāju no ekstrakta atdalīja ar rotācijas vakuuma iztvaicēšanu (Heidolph Laborota 4002 Control, Vācija) un sekojoši ekstraktu liofilizēja 0,05 mbar 24 h temperatūrā – 80 °C (Zirbus Technologies Vaco Series 2.0 Standart 2018, Bad Grund, Vācija).

7.2. Zāļu formas izstrāde, aprobācija

Liofilizēts biškrēsliņa lapu ekstrakts tika samalts koniskās dzirnavās (Quadro Comil U5, Vācija) sieta acs ø3 mm. Sasmalcināto ekstraktu sajauca ar palīgvielām Cube Mixer KB15 (Erweka, Vācija). Maisījuma sastāvs bija 55% biškrēsliņa ekstrakta, 30% hidroksipropilmetilcelulozes (Methocel K200M, Colorcon, Anglija) un 15% stearīnskābes (Indis nv, Beļģija) (**Tabula 1**). Šis pulverveida maisījums tālāk tika apstrādāts karstas kausēšanas ekstrūderī (Pharma 11 Twin-Screw ekstrūderis, Thermo Scientific) 20°C-30°C-50°C līdz maks. 60°C temperatūrā, atbilstoši katrai ekstrūdera karsēšanas zonai, lai izveidotu mīkstu pavedienu, kas paredzēts iepildīšanai bolā.

Tabula 1. Bolu sastāvs.

Bola satura sastāvs	%	g.
Biškrēsliņa sausais extr.	55	4,0
Hidroksipropilmetilceluloze (<i>Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC</i>)	30	2,2
A boliem - stearīn skābe (<i>Ac. Stearinicum</i>) vai B boliem – polietilēnglikols (PEG300)	15	1,1
Kopā	100	7,3

Bolu sagatavošana: Boli tik sagatavoti 3D drukāšanai ar digitālās gaismas apstrādes (DLP) 3D printeri (Asiga pro 4K 80, Vācija), izmantojot bioloģiski saderīgu fotopolimēru BioMed Amber Resin no FormLabs (ASV). Cilindriskas formas bolusi (izmērs 6,5 cm x 1,6 cm) ar perforētu vāciņu tika izstrādāti, lai tie atbilstu konkrētai ievadīšanas ierīcei (**Attēls 1**). Pēc drukāšanas ar nerūsējošā tērauda skrūvi tika piestiprināts medicīniskas



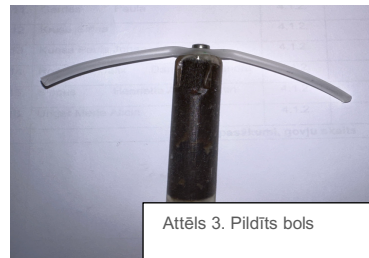
kvalitātes plastmasas (bez lateksa) endotraheālās caurulītes (izmērs 6,0, Zarys, Polija) segments (9 cm garš), veidojot katram bolusam "spārnu" (**Attēls 2**).

Katrā bolā tika ievietota nerūsējošā tērauda lodīte ($\varnothing 7$ mm), un pēc tam bola čaula tika piepildīta ar izkausētā ekstrakta maisījumu un noslēgta ar perforētu vāciņu (**Attēls 3**). Viens bols saturēja vidēji 7,3 g maisījuma, no kuriem 4 g bija ekstrakts. Katra bola vidējais svars bija 17,8 g. Bola formulas izstrādes laikā tika izmantota sairšanas iekārta (ZT732 Erweka, Vācija). Izmantotā sairšanas vide fosfātu buferšķīdums (pH 6,8) 37°C temperatūrā.

Granulu sagatavošana: Granulas tika sagatavotas, sajaucot sausas, samaltas biškrēsliņa lapas ar kalcija hidroģēnfosfātu (Dr. Paul Lohmann) attiecībā 50:50, izmantojot kubveida maisītāju KB15 (Erweka, Vācija), un granulējot maisījumu pārslās, izmantojot ruļļu kompaktoru (AW120, AlexanderWerk, Vācija) (**Attēls 4**).



Attēls 2. Bola čaula



Attēls 3. Pildīts bols



Attēls 4. Granulas

7.3. Eksperimenta fāze *in-vitro*

Eksperimentālā fāzē *in-vitro* notika LBTU VMF PVHI institūta Parazitoloģijas laboratorijā. No saimniecībās iegūtiem fekāliem paraugiem tika izdalīti parazīti un pārbaudīti ar biškrēsliņa ekstrakta liofilizāta atšķaidījumiem, lai novērtētu to preparazitāro ietekmi laboratorijas apstākļos. Olu daudzuma izmaiņas tika novērtētas izmantojot OvaCyte fecal Analyser (Indical Bioscience, Vācija) iekārtu.

Darba šķīduma pagatavošana.

Kopumā tika sagatavoti pieci dažādas koncentrācijas atšķaidījumi:

1. 0,1 g ar biškrēsliņa ekstrakta liofilizāts tika atšķaidīts 0,9 ml ar DMSO šķīdumu, iegūstot atšķaidījumu 100mg/ml. Pārbaudāmās koncentrācijas tālākai nematožu ovocīdai iedarbībai tika sagatavotas samazinošā koncentrācijā.
2. 0,1 ml no darba šķīduma tikai atšķaidīts 0,9 ml DMSO šķīdumā, iegūtā koncentrācija 10mg/ml
3. 0,1 ml no 10 mg/ml tika atšķaidīts ar 0,9 ml DMSO šķīdumam iegūtā koncentrācija 1 mg/ml
4. 0,1 ml no 1 mg/ml tika atšķaidīts ar 0,9 ml DMSO šķīduma, iegūtā koncentrācija 0,1 mg/ml
5. 0,1 ml no 0,1 mg/ml tika atšķaidīts 0,9 ml DMSO šķīduma, iegūtā koncentrācija 0,01 mg/ml

Papildus biškrēsliņa atšķaidījumiem tika sagatavota negatīvā kontrole, kam netika pievienoti medikamenti un biškrēsliņa liofilizāts.

Olu suspensijas pagatavošana

Paraugi tika iegūti no aitu partnersaimniecībām, kurām novēroja augstāko parazitāro nematožu invāziju. Tika sagatavota fekāliju suspensija, kam izmantoja 20 g aitu fekālijas, pievienojot 200 ml destilētu ūdeni un tās tika samaisītas un saspaidītas ar piestu, iegūstot homogēnu šķidrumu. Iegūto olu suspensijas šķidrumu izfiltrēja cauri trīs dažāda izmēra sietiem (100 μ m, 50 μ m, 32 μ m), atdalot cietās frakcijas no fēcēm, un pēdējā sietā koncentrējot parazitārās olas. 32 μ m sietu nomazgāja ar 200 ml

destilētu ūdeni mērcilindrā un iegūto šķidrumu ielēja 40 ml centrifugēšanas stobros un centrifugēja 10min 2000rpm. Pēc centrifugēšanas, augšējā frakcija no stobriem tiek atsūktas līdz nogulsnēm. Nogulsnēm tika pievienots 30 ml sāls šķīdums (blīvumu 1,2), nogulsnes tika samaisītas šķīdumā. Mērcilindri atkārtoti tika ievietoti centrifugēšanai, 15min 3000 rpm. No katra mērcilindra augšējā frakcija līdz nogulsnēm tika nolietā 32µm sietā un siets tika skalots ar destilētu ūdeni mērglāzē un tika atstātas 10min, lai parazitārās olas nosēstos mērglāzes apakšā. Katrā mazajā petri platē tika iepilināta 200µm olu suspensija un papildus pievienots biškrēsliņa ekstrakts:

- 1) 200 µm olu suspensija + 200 µm 10 mg/ml biškrēsliņa liofilizāta atšķaidījums
- 2) 200 µm olu suspensija + 200 µm 1 mg/ml biškrēsliņa liofilizāta atšķaidījums
- 3) 200 µm olu suspensija + 200 µm 0,1 mg/ml biškrēsliņa liofilizāta atšķaidījums
- 4) 200 µm olu suspensija + 200 µm 0,01 mg/ml biškrēsliņa liofilizāta atšķaidījums
- 5) 200 µm olu suspensija + 200 µm destilēts ūdens negatīvajai kontrolei

Ar katru koncentrāciju tika iepildītas 3 plates, lai pārbaudītu efektivitāti. Plate tika inkubēta 48h 25°C un tika nolasīts rezultāts ar OvaCyte fecal Analyser iekārtu. Pēc inkubēšanas paraugos tiek skaitītas parazitārās olas, kuras nav embrionētas un atsevišķi kopā tiek skaitītas embrionētās olas un L1 kāpuri. Lai aprēķinātu pielietotā preparātā efektivitāti, tiek izmantota formula EHI% (olu inhibēšanas tests) = (kopējais neembrionēto olu skaits / (neembrionēto olu skaits + L1 kāpuri)) x 100.

7.4. Eksperimenta fāze *in-vivo*

Projekta eksperimentālajai un lauka daļai iegūta LR Pārtikas un Veterinārā dienesta Izmēģinājuma projekta atļauja Nr. 143/2023 (**Pielikums Nr. 1.**).

Projekta eksperimentālajā fāzē izmantoti projekta partneru SIA “Mikaitas” un ZS “Ceļmalas” izaudzētas, atlasītas un klīniski izmeklētas veselas 30 Latvijas tumšgalves šķirnes Mājas aitas (*Ovis aries*), 5-6 mēnešu vecas.

Atbilstoši valstī noteiktajam regulējumam par lauksaimniecības dzīvnieku transportēšanu, aitas tika nogādātas Veterinārmedicīnas fakultātes Klīnisko pētījumu centrā. Lai nodrošinātu iespējami mazāku kaitējumu, maksimāli novērstu un mazinātu stresu un tā radīto ietekmi uz izmēģinājuma dzīvniekiem – aitām, ko rada pārvietošana no saimniecības un izmitināšana jaunā vietā, aitu pārvadāšana, ievietošana transporta līdzeklī un pēc tam pārvietošana uz novietnēm, notika ļoti uzmanīgi. Izmēģinājuma dzīvnieku skaitu katrā aizgaldā izmitināja saskaņā ar MK noteikumu Nr.1 (no 11.01.2019) 3. pielikuma IV. Nodaļas 24.2. punkta prasībām. Novietnē ir iespēja nodrošināt sugai nepieciešamo klimatisko režīmu: ir ventilācijas sistēma, centrālā apkure, logi. Aizgaldi ir viegli kopjami un dezinficējami, ar viegli kopjamu grīdas segumu, viegli mazgājamām sienām. Kā pakaiši tiek izmantoti salmi. Tiek nodrošināts svaigs dzeramais ūdens (automātiskā dzidrināšana vai no spaiņiem). Piekļuvi dzeramajam ūdenim – automātisko dzirdni regulāri kontrolē dzīvnieku kopējs, veicot to apskati un skalošanu vai spaiņu mazgāšanu un ūdens maiņu. Novietnē regulāri tiek veikts ūdens kvalitātes audits. Ēdināšana tika organizēta saskaņā ar sugas fizioloģiskajām vajadzībām, izmantojot kvalitatīvu, aitām piemērotu sienu. Papildus sākumā tika izmantota rūpnieciski ražota, dzīvnieku vecumam atbilstoša spēkbarība, kāda tikusi izmantota dzīvnieka izcelsmes vietā, pakāpeniski pieradinot pie LBTU iepirkumā iekļautās granulētās papildbarības aitām (ražotājs “Baltic Agro”). Nepārtraukti tika nodrošināta piekļuve laizāmajai sāļij.

Aitas novietotas divās telpās, grupējot tās vienas saimniecības ietvaros, lai mazinātu dzīvniekiem radīto stresu ar jaunu dzīvnieku iepazīšanu. Pēc nejaušības principa aitas tika sadalītas aplokos pa sešām aitām katrā, tātad sadalītas piecās pētījuma grupās (**Tabula 2**), no kurām viena grupa, kurai izbaroja granulas, tika grupētas vienā aplokā, lai nodrošinātu vienmērīgu granulu uzņemšanu visām.

Lai nodrošinātu pētījumā iesaistīto personu subjektivitāti, par aitu sadalījumu grupās iesaistītie pētnieki nebija informēti.

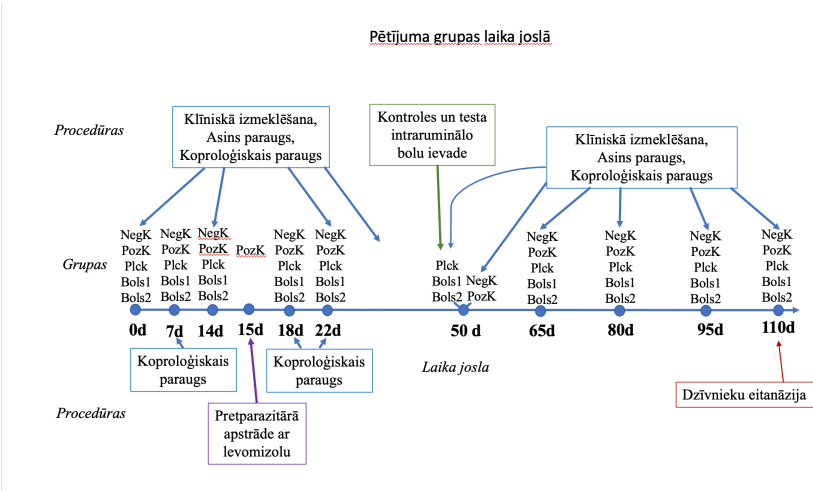
Tabula 2. Pētījuma grupu iedalījums.

1. grupa (NegK)	negatīvās kontroles grupa (aitu grupa, kura netiek attārpota, netiek ievadīts bols).
2. grupa (PozK)	pozitīvās kontroles grupa (aitu grupa, kura tiek attārpota ar veterinārmedicīnā klasiski izmantotu pretparazitāro līdzekli levamizolu 5 mg/kg).
3. grupa (Gran)	pētījuma grupa, kurai izbarotas biškrēsliņa saturošas granulas.
4.grupa (Bols 1)	pētījuma grupa, kurai ievadīs A bolu .
5. grupa (Bols 2)	pētījuma grupa, kurai ievadīs B bolu.

VMF novietnē līdz procedūru uzsākšanai, lai novērstu infekciju, stresa izraisītus riskus, aitu adaptācijas periods ilga 14 dienas, (-14 dienas) tā radot papildus drošību projekta sekmīgai norisei. Šajā periodā dzīvnieku veselības stāvokli, t.sk. apetīti un ūdens uzņemšanu, ēstgribu novēroja veterinārārsts. Projektā iesaistītie pētnieki un partneri (SIA “Mikaitas”, ZS “Ceļmalas”) regulāri apmeklēja aitas, lai veiktu socializāciju un veicinātu aitu pierašanu pie personāla un uzlaboto atpazīstamību un uzticību un novērtētu dzīvnieku labturību.

Projekta 0 dienā tika uzsākts pētījums un atbilstoši laika grafikam (**Attēls 5**) uzsāktas vairākas klīniskās procedūras.

Attēls 5. Eksperimenta pētījuma grupas manipulācijas, laika joslā.



Eksperimentā kontrolētos apstākļos visām aitām tika veiktas sekojošas klīniskās procedūras:

1. Pētījuma dzīvnieku regulāra klīniskā izmeklēšana (**shēma pielikumā Nr. 2**), kas ietvēra arī nosvēršanu (**Attēls 6**). Katrs dzīvnieks klīniski tika izmeklēts individuāli, to viegli manuāli fiksējot tā atrašanās vietā, lai mazinātu stresu. Klīniskā izmeklēšana veikta pēc vispārpieņemtiem labas

veterinārmedicīnas prakses principiem (**Pielikums 2.**). Izmeklēšanu veica projekta pētnieks, sertificēts veterinārārsts ar pieredzi lauksaimniecības dzīvnieku jomā un pētniecībā. Izmeklējuma mērķis bija pārliecināties, ka eksperimentā tiek izmatoti klīniski veseli dzīvnieki. Kā arī eksperimenta laikā, lai sekotu līdzi dzīvnieku vispārējam veselības stāvoklim.

2. Atbilstoši pētījuma shēmai, līdz pat 10 reizes individuālam dzīvniekam ar 7-21 dienu intervālu starp paraugu ņemšanu, tika veikta asins parauga ieguve punktējot jugulāro vēnu (**Attēls 7**). Asins paraugu ņemšana pirms pētījuma un pētījuma laikā tika veikta ar mērķi kontrolēt dzīvnieku vispārējo veselības stāvokli, pirms testējamo vielu ievades un veselības stāvokļa novērošanai visa projekta laikā. Asins parauga ieguvei veica sertificēti veterinārārsti ar pieredzi lauksaimniecības dzīvnieku jomā un pētniecībā. Katrs dzīvnieks tika viegli manuāli fiksēts tā atrašanās vietā, lai mazinātu stresu. Asins paraugs tika paņemts ar kreiso roku nospiežot jugulāro vēnu, lai tā uzpildās ar asinīm un ar labo roku veikta punkcija izmantojot 20 G adatu. Kopā vienā reizē tika iegūti 9-10 ml asiņu no katra dzīvnieka - 3 ml asiņu tiks savākti EDTA K3 saturošos sterilos vakumstobriņos un 6 ml asins seruma stobriņos ar stabilizatoru. Pēc paraugu ieguves tie 30 minūšu laikā tika nogādāti laboratorijā, lai veiktu asins hematoloģisko izmeklēšanu un asins seruma bioķīmisko izmeklēšanu.

3. Fekāliju izmeklēšanai uz parazītu klātbūtni tika iegūti paraugi no taisnās zarnas pirms pētījuma uzsākšanas un pētījuma laikā. Fekāliju parauga ieguvei no taisnās zarnas veica sertificēti veterinārārsti ar pieredzi lauksaimniecības dzīvnieku jomā un pētniecībā, ar mērķi noteikt un kontrolēt parazitāras invāzijas intensitāti (parazītu olu skaitu fekālijās) un fēču bakterioloģisko audzi, pirms pētījuma, pētījuma laikā un pēc tā. Manipulāciju veica vienlaicīgi ar klīnisko izmeklēšanu, kad dzīvnieks bija viegli fiksēts savā atrašanās vietā, tam no taisnās zarnas ampulas manuāli paņemot bakterioloģisko noslaucījumu un svaigu fekāliju paraugu, izmantojot nitrila cimdus un lubrikantu uz tā, lai mazinātu dzīvniekiem stresu un kairinājumu taisnās zarnas apvidū. Pēc paraugu iegūšanas 30 minūšu laikā tie tika nogādāti laboratorijā.

4. Vienreizēja testējamā intraruminālā bola ievade caur muti Bolu grupas aitām. Eksperimenta vajadzībām izstrādātos intraruminālos bolus paredzētajām aitām ievadīja ar speciālu bolu devēju (**Attēls 8**), kas atvieglo to ievadi caur muti un mazina dzīvnieka traumatizācijas risku. Bolu iestiprināja bolu devējā, tam paredzētajā galā, bola devēju ievietoja aitam mutē gar mutes kaktiņu un kontrolējot brīdi, kad bola devējs ar bolu atrodas uz mēles saknes, ievadīja bolu rīkles tuvumā, lai dzīvnieks to norij.

5. Piecpadsmītajā pētījuma dienā Pozitīvās kontroles eksperimenta grupu dzīvniekiem tika veikta pretparazitārā apstrādē, veicot katram dzīvniekam vienu zemādas injekciju ar levamizola hidrohlorīda 5 mg/kg ievadi subkutāni - zemādas.

6. Dzīvnieku rentgenoloģiskais izmeklējums tika veikts tikai eksperimentālās grupas (Bolu grupas) aitām, kurām ir ievadīts intraruminālais bols, maksimāli 5 reizes ar 15 dienu intervālu ar mērķi kontrolēt testējamo bolu atrašanās vietu aitu spureklī un, ka bolā esošām vielām laika gaitā izdaloties, bolam nav tendence migrēt tālāk gremošanas traktā. Bolam, lai tas veiktu savu paredzēto funkciju, ilgtermiņā ir jāatrodas spureklī. Rentgenoloģisko izmeklēšanu veica dzīvnieku novietnē, izmantojot portatīvo digitālo radiogrāfijas sistēmu Mark 121 OCW un portatīvo rentgena staru ģenerātoru VET 2



Attēls 6. Aitu svērsana



Attēls 7. Asins ņemšana



Attēls 8. Bola došana

OBT, lai mazinātu dzīvniekiem stresu, kas rastos tos pārvietojot starp korpusiem. Radioloģiskais izmeklējums un paredzētā fiksācija neizraisa dzīvniekiem sāpes. Izmeklējums tika veikts, ievērojot vispārpieņemtos un valstī reglamentētos radioloģijas drošības noteikumus.

7. Eksperimenta dzīvnieku eitanāzija vispārējās anestēzijas laikā un patologanatomiskās sekcijas veikšana, audu paraugu iegūšana (1.-5. grupa). Lai gan kopumā eksperimentā veiktās procedūras nerada dzīvniekiem tādu audu bojājumus, kas nav savienojami ar dzīvi, eitanāzija tika paredzēta, lai iegūtu orgānu un audu paraugus pilnvērtīgai šīs vielas izpētei, lai izslēgtu, ka biškrēsliņa lapu ekstrakts var ietekmēt kāda orgāna funkcijas. Morfoloģiskā un histoloģiskā, imūnhistoķīmiskā gremošanas sistēmas orgānu, audu paraugu izmeklēšana ļauj salīdzināt parazitārās invāzijas radīto audu bojājumu pakāpi starp eksperimenta grupām, tā papildinot klīniski ievāktu datu kopumu, un analizēt pētāmās vielas efektivitāti.

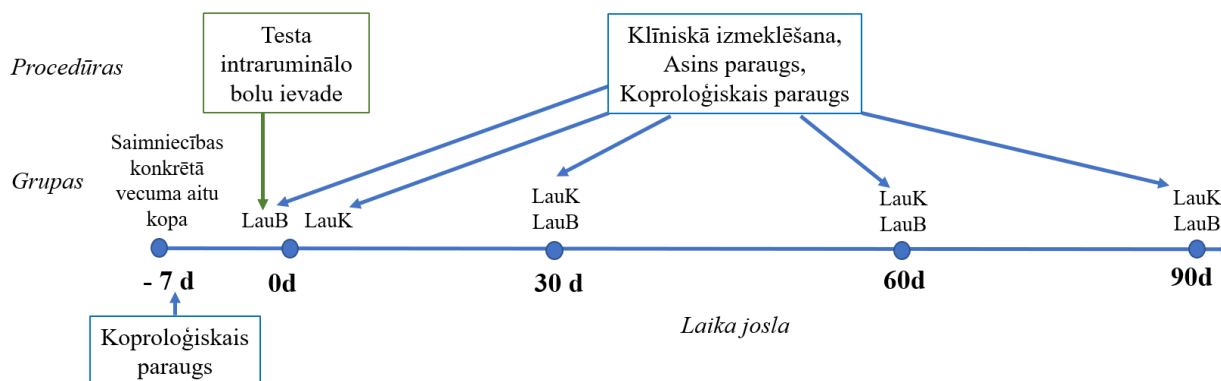
7.5. Lauka pētījuma fāze – *in-vivo*

Projekta lauka fāzē izmantoti projekta partneru: pašnodarbinātas personas Andra Pridāna saimniecības “Mucenieki”, pašnodarbinātas personas Natas Mālnieces saimniecības “Lejas Ķenči”, pašnodarbinātas personas Raimonda Šnores saimniecības “Bungas” un ZS “Trejdeviņi Trešēlnieki” pārvaldībā esošie resursi. Saimniecībā tika iegūti jēri, ataudzēti, grupēti, regulāri pārbaudīti un sagatavotas katrā saimniecībā 20 Mājas aitas (*Ovis aries*), 5-6 mēnešu vecas, ar svaru sākot no 50 kg. Partneri aktīvi pedālījās pētniecībā visu lauka pētījuma posmu, gan uzturot, uzraugot aitas, gan piedaloties izmeklējumu veikšanas laikā.

Otrajā pētījuma etapā aitas atradās un tika turētas aitkopības saimniecībai raksturīgā veidā un dabiskā vidē. Pētījumā izvēlētas saimniecības ir ar pieredzi aitkopībā un teicami ievēro aitu labturības prasības. Lai lauka pētījuma grupās varētu atlasīt aitas ar maksimāli vienādu vidējas pakāpes parazitāro invāziju, sākotnēji visās saimniecībās tā tika noteikta, veicot koproloģiskos izmeklējumus ar McMaster metodi vairākiem dzīvniekiem no konkrētā vecuma aitu saimniecības ģenerālkopas. Tālāk, pētījuma grupas tika veidotas no saimniecībā esošās konkrētā vecuma dzīvnieku ģenerālkopas aitām, kurām konstatēja maksimāli vienādu vidējas pakāpes parazitāro invāziju. Izvēloties un atzīmējot 10 aitas, kas tiks iekļautas kontroles pētījuma grupā LauK un 10 aitas kurām ievadīs testējamo bolu, tika iekļautas pētījuma grupā LauB. Katrā saimniecībā lauka pētījumā iekļautie 20 dzīvnieki pētījuma laikā atradās sava vecuma aitu ģenerālkopā, konkrētās saimniecības dabīgajā vidē un devās ganībās.

Projekta fāze tika uzsākta no 2024. gada februāra līdz 2024. gada oktobrim, kad tika iegūti jēri, audzināti, sagatavoti pētījumam, bet dzīvnieki tiešā pētījumā bija kopumā iekļauti 90 dienas (**Attēls 9**).

Attēls 9. Lauka pētījuma grupas manipulācijas, laika joslā.



Atbilstoši visām labturības prasībām, projektā iesaistītais sertificētais veterinārārsts ieradās saimniecībā, lai veiktu pētījumā plānotās procedūras, lai vienlaikus, nepieciešamības gadījumā, ieteiktu nepieciešamās korekcijas. Dzīvnieku uzraudzību novietnē veica projektā iesaistītie divi sertificētie veterinārārsti- Aija Mālniece un Aīda Vanaga.

Arī lauka pētījuma apstākļos aitām tika veiktas vieglas smaguma pakāpes procedūras:

1) Pētījuma dzīvnieku regulāra klīniskā izmeklēšana (**Pielikumā Nr. 2**).

2) Atkārtota (līdz 4 reizes individuālām dzīvniekam ar 30 dienu intervālu starp paraugu ņemšanu) asins parauga ieguve punktējot jugulāro vēnu.

3) Atkārtota (līdz 4 reizēm individuālam dzīvniekam ar 30 dienu intervālu) fekāliju parauga ieguve no taisnās zarnas, parazitoloģiskajām analīzēm.

4) Atkārtota (līdz 4 reizēm individuālam dzīvniekam ar 30 dienu intervālu) fekāliju parauga ieguve no taisnās zarnas, bakterioloģiskajām analīzēm.

4) Vienreizēja testējamā intraruminālā bola ievade caur muti pētījuma grupai LaukB.

Lauka pētījumam noslēdzoties 90 dienā, pētījumā iesaistītie dzīvnieki palieka saimniecībā un rīcība ar dzīvniekiem notiek saskaņā ar saimniecības menedžmenta plāniem.

7.6. Laboratoriskie izmeklējumi

Projekta laikā iegūtajiem paraugiem tika veikta asins hematoloģiskā un bioķīmiskā analīze, koproloģiskā analīze, bakterioloģiskā un histoloģiskā analīze.

7.6.1. Asins hematoloģiskā un bioķīmiskā analīze

Hematoloģiskie paraugi tika izmeklēti, nosakot šādus rādītājus: leukocīti (WBC), eritrocīti (RBC), hematokrīts (HCT), hemoglobīns (HGB), vidējais eritrocītu tilpums (MCV), hemoglobīna saturs eritrocītā (MCH), hemoglobīna koncentrācija eritrocītā (MCHC), eritrocītu sadalījuma platums (RDW), trombocīti (PLT), vidējais trombocītu tilpums (MPV). Analīzes tika veiktas nekavējoties eksperimenta posmā un dienas laikā lauka pētījuma posmā, izmantojot automātisko hematoloģijas analizatoru Exigo Eos Vet. Tāpat tika sagatavotas asins iztriepes, kurās mikroskopiski analizēta leukocītu formula un šūnu morfoloģija.

Asins serums tika analizēts ar Mindray BS-200E analizatoru, nosakot šādus bioķīmiskos rādītājus: urīnviela, kreatinīns, kopējais bilirubīns, aspartātaminotransferāze (AST), laktātdehidrogenāze (LDH), gamma-glutamīltransferāze (GGT), kreatīnkināze (CK), kopējais proteīns (TP), albumīns (ALB), fosfors, kalcījs, magnijs, triglicerīdi, holesterīns, nātrijs un kālijs.

7.6.2. Fekāliju koproloģiskā izmeklēšana

Katrs paraugs tika ievākts individuāli un marķēts. Paraugi līdz laboratorijai tika nogādāti ar aukstumelementu, lai nodrošinātu +4°C. Koproloģisko paraugu izmeklēšana tika veikta ar MacMaster metodi (4g fekālijas; 56 ml sāls šķīdums) un rezultātā tika iegūts rezultāts par parazītisko olu/oocistu skaitu 1 g/fekāliju. Vēlāk iegūtie rezultāti tika izmantoti, lai aprēķinātu olu/oocistu skaita samazināšanos (%) – FECRT / FOCRT.

7.6.3. Paraugu mikrobioloģiskā izmeklēšana

Mikrobioloģiskai testēšanai iesūtītie aitu fekālie paraugi tika analizēti, nosakot ESBL-*Escherichia coli* klātbūtni, *Clostridium perfringens* skaitu, kā arī rezidējošā *Escherichia coli* pārstāvju izolātiem - antibiotiku rezistenci. ESBL-*Escherichia coli* klātbūtnes noteikšana tika veikta, izmantojot Cromart ESBL agaru (Biolife, Itālija) un inkubējot 24-48 h 37° C aerobos apstākļos. *Clostridium perfringens* skaita noteikšanai izmantojām parauga uzsēšanai semikvantitatīvo četru kvadrantu metodi (Mariani et al., 2015) uz TSC (Tryptozes sulfīta cikloserīna agars, Biolife, Itālija) un inkubējot 42° C temperatūrā anaerobos apstākļos 24 līdz 48 h ilgi. Savukārt zarnu traktā rezidējošā *E.coli* klātbūtnes noteikšanai izmantojām selektīvi-diferenciālo barotni EMB (Eozīna-metilēnzilā agars, Oxoid, Lielbritānija), no kuras baktērijas izolāti tika pārsēti tālāk uz asins agara antibiogrammas veikšanai. Barotņu inkubēšana veikta 37 oC temperatūrā aerobos apstākļos 22 līdz 26 h ilgi.

Clostridium perfringens audzes novērtējumam izmantojām autoru (Mariani et al., 2015) ieteikto metodiku (**Tabula 3**):

3. tabula. Baktēriju augšanas pus-kvantitatīvais izvērtējums (kvv/g).

Nr.p.k.	Kvadrants	Koloniju skaits					
1.	1. kvadrants	0	1-4	≥5	≥5	≥5	≥5
2.	2. kvadrants			<5	≥5	≥5	≥5
3.	3. kvadrants				<5	≥5	≥5
4.	Piedēklis					0	≥1
5.	Baktēriju skaits	<10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	>10 ⁶

Antibiogrammas veikšana izpildīta pēc Kirby-Bauer disku difūzijas metodes (Hudzicki, 2009), izmantojot Millera-Hintona agaru saskaņā ar ražotāja (Biolife, IT) instrukciju. Uz agaru “zāliena” tehnikā uznesa 0,5 McFarland vienības blīvu baktērijas kultūras suspensiju un antimikrobiālos diskus (Oxoid, GB). Sagatavotās plates inkubēja 36±1°C līdz 20 stundām. Pēc inkubēšanas tiek izmērītas inhibīcijas zonas (mm) un rezultāti izvērtēti saskaņā ar EUCAST vadlīnijām (eucast v_13.1 2023_june) (**Tabula 4**).

Tabula 4. Antibiotikas jutības noteikšanai izmantotās antibiotikas.

AB saīsinājums	Antibiotika
CN	gentamicīns
CIP	ciprofloksacīns
IPM	imipenēms
EFT	ceftiofurs
SXT	trimetoprim - sulfa
TMP/W	trimetoprim
CTX	cefotaksime
AMP	ampicilīns
FOX	cefoksitīns
TE	tetraciklīns
FEP-	cefepime

7.6.4. Paraugu histopatoloģiskā izmeklēšana

Audu paraugu iegūšana un histoloģisko preparātu sagatavošana

Pēc aitu eitanāzijas tika iegūti audu paraugi no vairākām gremošanas trakta daļām un ar to saistītajiem orgāniem. Paraugi tika ņemti no sekojošām vietām: priekškuņģiem (spureklis – kraniālā maisa ventrālā daļa; aceknis; grāmatnieks), glumenieka (*corpus* un *pyloris*), tievās zarnas segmentiem (divpadsmitpirkstu zarnas – ~30 cm distāli no *flexura sigmoidea*; tukšās zarnas – ~2 m distāli no duodeno-koliskās saites; gūžas zarnas – ~30 cm proksimāli no ileocekālās pārejas), resnās zarnas segmentiem (aklās zarnas *apex*; lokazarnas centrālā daļa), kā arī no mezenterālā limfmezgla, aizkuņģa dziedzera (*corpus*) un tā limfmezgla, un aknām (kreisā daiva un labā daiva ar žultspūsli).

Visi iegūtie paraugi uzreiz tika fiksēti 10% buferētā formalīnā. Tievās un resnās zarnas segmenti (5–7 cm gari) pirms ievietošanas formalīnā tika abos galos nosieti un to lūmenā injicēts formalīns, lai nodrošinātu pilnvērtīgu fiksāciju no iekšpuses un cauruļveida formas saglabāšanos fiksācijas laikā; pēc 24 stundām šie segmenti tika atgriezti vaļā. Aptuveni 3–4 dienas pēc paraugu iegūšanas tie tika apstrādāti histoloģisko griezumu iegūšanai: paraugi tika piegriezti plānās šķēlēs (ap 2 mm biezumā) un ievietoti kasetēs, pēc kā audu procesorā tie tika pakāpeniski dehidratēti (caur pieaugošām etanola koncentrācijām) un infiltrēti ar ksilolu un parafīnu. Šādi sagatavoti audu griezumi tika ieguldīti parafīna blokos. No parafīnā ieguldītajiem audiem ar rotācijas mikrotomu tika griezti 4 µm plāni audu griezumi, kas pēc deparafinizācijas un rehidratācijas tika nokrāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu (H&E). Preparāti tika dzidrināti un pārklāti ar segstikliņu. No katras aitas tika sagatavoti 14 H&E krāsoti histoloģijas preparāti. Veterinārais patologs (ACVP sertificēts), kas veica mikroskopisko izmeklēšanu, nebija informēts par paraugu piederību konkrētām eksperimentālajām grupām (izmeklējums veikts *aklā veidā*).

Audu mikroskopisko izmaiņu novērtēšanas metodika

Visos iegūtajos gremošanas trakta audu preparātos tika sistemātiski vērtētas histopatoloģiskās izmaiņas pēc iepriekš definētiem kritērijiem. Vērtēti šādi rādītāji: nematožu daudzums un atrašanās vieta, iekaisums gļotādā un gļotādas limfoīdo audu hiperplāzija. Papildus tika pierakstītas arī piezīmes par citām izmaiņām, kuras neietilpa minētajos vērtējumos (piemēram, kokcīdiju klātbūtne, iekaisums dziļākos zarnu sienas slāņos, granulomas u.c.).

Nematožu klātbūtnes vērtēšana

Nematožu klātbūtne audu griezumos tika semikvantitatīvi novērtēta punktu skalā 0–4. Vērtējums “0” atbilda situācijai, kad nematodes netika atrastas, savukārt augstāki vērtējumi atbilda pieaugošam parazītu daudzumam preparātā. Detalizēti kritēriji bija šādi:

- **1 punkts:** 1–2 nematožu *profilu* (šķērsriezumu) vienā histoloģijas preparātā.
- **2 punkti:** 3–5 nematožu profili preparātā.
- **3 punkti:** 6–10 nematožu profili preparātā.

- ☐ **4 punkti:** vairāk nekā 10 nematožu profili vienā preparātā.

Papildus punktu vērtējumam tika atzīmēts, kur nematodes atradās – vai tās lokalizējas tikai zarnu lūmenā, vai arī invadē gļotādu. Katrai aītai kopējais nematožu invāzijas indekss tika iegūts, summējot punktus glumenieka un zarnu paraugos (t.i., tika summēts nematožu vērtējums glumeniekā un dažādos zarnu segmentos).

Gļotādas iekaisuma vērtēšana

Visos orgānos tika izvērtēts iekaisums gļotādā, ņemot vērā iekaisuma šūnu klātbūtni, intensitāti un izplatību. Īpaša uzmanība tika pievērsta tam, kuras šūnu populācijas dominē iekaisuma infiltrātā: katrā paraugā reģistrēja, vai novērojami limfocīti, plazmas šūnas un eozinofīlie leukocīti, un kāda ir to savstarpējā proporcionālā attiecība. Piemēram, tika fiksēts, vai iekaisumā piedalās tikai limfocīti, vai limfocīti kopā ar plazmas šūnām, vai arī šīm šūnām ir piejaukts nozīmīgs daudzums eozinofīlo leukocītu. Ja tika konstatēti eozinofīlie leukocīti, tad tika pierakstīts arī to relatīvais daudzums – vai eozinofīli ir aptuveni vienādā, mazākā vai lielākā skaitā nekā limfocīti un plazmas šūnas. Citu iekaisuma šūnu (piemēram, neitrofilo leukocītu vai makrofāgu) klātbūtne tika atzīmēta piezīmēs.

Iekaisuma intensitāte gļotādā tika novērtēta 0–4 punktu skalā, kur:

- ☐ **0 punkti:** iekaisuma šūnu nav;
- ☐ **1 punkts:** minimāls iekaisums (ļoti neliels šūnu skaits);
- ☐ **2 punkti:** viegls iekaisums;
- ☐ **3 punkti:** vidēji smags iekaisums;
- ☐ **4 punkti:** izteikts (ļoti smags) iekaisums.

Nepieciešamības gadījumā tika izmantoti arī starpvērtības (piemēram, 1,5; 2,5; 3,5), ja iekaisuma smagums nepārprotami atradās starp iepriekš definētajām kategorijām.

Vērtējot iekaisumu, tika ņemtas vērā arī fizioloģiskās normas dažādās gremošanas trakta daļās. Piemēram, priekškuņģos normāli iekaisuma šūnas sastopamas netiek, savukārt zarnās neliels limfocītu un plazmas šūnu daudzums gļotādas pamatkārtā ir normāla parādība. Tādēļ priekškuņģu paraugos iekaisums vispār tika reģistrēts tikai tad, ja vienā preparātā iekaisuma šūnas atradās vismaz divās atsevišķās vietās; šādā gadījumā tam piešķīra 1 punkta (minimāla iekaisuma) vērtējumu. Iekaisuma izplatība tika raksturota kā fokāla, multifokāla vai difūza. Katrai aītai tika aprēķināts kopējais gļotādas iekaisuma indekss, summējot iekaisuma intensitātes punktus visos novērtētajos kuņģa un zarnu segmentos (priekškuņģos, glumeniekā, tievajās un resnajās zarnās; kopumā 10 atsevišķās lokalizācijās).

Gļotādas limfoīdo audu (GALT) hiperplāzijas vērtēšana

Gremošanas trakta limfoīdo audu hiperplāzija tika vērtēta 0–4 punktu skalā, pamatojoties uz limfoīdo folikulu (Peijera plāksnīšu u.c.) skaitu un lielumu gļotādā:

- ☐ **0 punkti:** limfoīdo audu sakopojumi ir sastopami ne vairāk kā vienā vietā preparātā (≤ 1 folikuls/griezumā).
- ☐ **1 punkts:** limfoīdo audu sakopojumi redzami 2–3 atsevišķās vietās preparātā.

- **2 punkti:** limfoīdo audu sakopojumi atrodami vairākās vietās preparātā.
- **3 punkti:** limfoīdo audu sakopojumi ir daudzviet (plaši izplatīti) preparātā.
- **4 punkti:** limfoīdo audu sakopojumi ir daudzviet un lieli (izteikta hiperplāzija).

Īpašs vērtēšanas nosacījums tika piemērots gūžas zarnai (ileum), jo šajā zarnas daļā Peijera plāksnes fizioloģiski ir labi attīstītas. Gūžas zarnā limfoīdo audu sakopojumu klātbūtne tika novērtēta kvalitatīvi kā N (norma), samazināta (atrofija) vai palielināta. Ja gūžas zarnā limfoīdo audu daudzums bija palielināts salīdzinot ar fizioloģisko normu, tad palielinājuma pakāpi papildus novērtēja 1–4 punktu skalā. Kopējais GALT hiperplāzijas indekss katrai aītai tika iegūts, summējot punktu vērtējumus priekškuņģu, glumnieka un zarnu paraugos (ņemot vērā, ka gūžas zarnā hiperplāzija novērtēta ar atsevišķu metodi).

Mezenterālā limfmezgla histoloģijas vērtēšana

Mezenterālajos limfmezglos galvenā uzmanība tika pievērsta limfoīdo audu hiperplāzijai. Limfmezgla folikulārā hiperplāzija (B-šūnu zonas reakcija) tika vērtēta 0–4 punktu skalā, kur 0 nozīmēja, ka limfoīdo folikulu hiperplāzijas nav, bet 1–4 punkti atbilda minimālai, vieglai, mērenai vai izteiktai folikulu hiperplāzijai. Tika atsevišķi pierakstīts, vai konstatēta arī parakortikālā (T-šūnu zonas) hiperplāzija. Vērtējumos pierakstīja, vai hiperplāzija skar tikai folikulus, tikai parakortikālo zonu vai abas zonas. Citas izmaiņas limfmezglā, piemēram, izteikta eozinofilo leikocītu klātbūtne, tika pieminētas piezīmēs.

Aizkuņģa dziedzera izmaiņu vērtēšana

Aizkuņģa dziedzera eksokrīnajā daļā (parenhīmā) specifiski bojājumi vai novirzes tika meklētas un reģistrētas piezīmēs. Atsevišķi tika atzīmēts, ja novēroja iekaisumu ap aizkuņģa dziedzera izvadkanāliem; šādos gadījumos iekaisuma smagums tika novērtēts tāpat kā gļotādās (izmantojot iepriekš aprakstīto 0–4 punktu skalu).

Aknu un žultspūšļa izmaiņu vērtēšana

Aknu parenhīmas izmaiņas (piemēram, deģeneratīvas vai iekaisīgas) tika reģistrētas piezīmēs kvalitatīvi. Ja aknās tika konstatēts iekaisums portālajos apvidos, ap žultsvadiem, vai iekaisums bija žultspūšļa gļotādā, tad šī atrade tika novērtēta pēc analogijas ar gļotādas iekaisumu (pielietojot 0–4 punktu skalu, kā aprakstīts augstāk).

7.7. Datu statistiskā apstrāde

Eksperimentālā pētījuma dati statistiski izvērtēti ar mērķi noskaidrot, kā līdzeklis ietekmē dabiskā ceļā iegūtu endoparazītu invāziju praktiski veselām aītā, kā arī novērtēt aītu dzīvsvara un asiņu analīžu rādītāju izmaiņas. Klīnisko pētījumu centra stacionāra apstākļos veikts maskētā un divkārši kontrolēts pētījums. Datu apkopojumā izmantota informācija no daudzām tabulām, kuras sākotnēji sagatavotas MS Excel formātā. Pirms apstrādes veikta datu pārņemšana statistikas programmā (Stata 17.0 for Windows, StataCorp LP, ASV), validācija un atsevišķu vērtību precizēšana. Asiņu bioķīmiskie un hematoloģiskie

rādītāji grafiski salīdzināti ar literatūrā dotajiem references intervāliem (Frye, 2022) un citiem pieejamiem fizioloģiskās normas rādītājiem.

DZĪVNIEKI

Pētījumā izmantotas aitas ($N = 30$), kas pēc ieviešanas centra novietnē un adaptācijas perioda dalītas 5 eksperimenta grupās ($5 \text{ grupas} \times n = 6$). Adaptācijas perioda laikā veikto izmeklējumu un mērījumu rezultāti nav iekļauti šajā pārskatā. Eksperimenta laikā **ik pēc divām nedēļām** veikti aitu dzīvsvara mērījumi, koproloģiskā izmeklēšana endoparazītu invāzijas noteikšanai, klīniskā izmeklēšana, asiņu bioķīmiskās un hematoloģiskās analīzes. Dzīvnieku grupas izveidotas tā, lai tās būtu analogas, vērtējot pēc adaptācijas periodā iegūtiem atkārtotiem koproloģiskās izmeklēšanas rezultātiem. Līdzekļi (tradicionālā ārstniecības augs biškrēsliņa ekstrakts), kas iestrādāts trīs dažādos nesējos A bolā, B bolā un granulās, aplicēja trīs grupām. Ceturtā aitu grupa nesaņēma nekādu pretparazītāru līdzekli un kalpoja par eksperimenta negatīvo kontroli. Piekto grupu jeb eksperimenta pozitīvo kontroli, dehelmentizēja ar levamizolu. Grupu apzīmējumi attēlos un aprakstā: “Bols 1” vai A grupa, “Bols 2” vai B grupa, “Gran grupa” vai granulā grupa, “Neg kontrole” vai N grupa, “Poz kontrole” vai P grupa. Aitu stāvokli pirms līdzekļa (P grupai attiecīgi levamizola) aplicēšanas 2023. gada 7. novembrī (nultā diena jeb “D0”) raksturo iepriekš veikta svēršana divas reizes (19.10.2023 un 02.11.2023), no kurām aprēķināts katras aitas vidējais dzīvsvars, pilna klīniskā izmeklēšana (2.11.2023), koproloģiskā izmeklēšana (23.10.2023), hematoloģiskā izmeklēšana (02.11.2023) un asiņu bioķīmiskā izmeklēšana (02.11.2023.). Turpmāk visi izmeklējumi atkārtoti 23. novembrī (14. diena jeb “D14”), 6. decembrī (28. diena jeb “D28”), 20. decembrī (42. diena jeb “D42”), un 2024. gada 8. janvārī (56. diena jeb “D56”).

Statistiskā analīze

Aitu dzīvsmasas dinamika, parazītu olu skaita samazināšanās vienā gramā fekāliju, asins bioķīmisko un hematoloģisko parametru svārstības analizētas, izmantojot **dispersijas analīzi atkārtotiem mērījumiem jauktu efektu modelī**. Salīdzinātas piecas grupas (“A bols” jeb A grupa, “B bols” jeb B grupa, “Granulas” jeb G grupa, “N kontrole” jeb N grupa, “P kontrole” jeb P grupa) un piecus paraugu ņemšanas laikus ar divu nedēļu intervālu (pirms ārstēšanas 0. dienā jeb D0; 14. dienā jeb D14; 28. dienā jeb D28; 42. dienā jeb D42; 56. dienā jeb D56). Lauka pētījuma daļā salīdzināta katras saimniecības bola grupa un kontroles grupa laika nogrieznī. Modelī iekļautie efekti bija ārstēšana, laiks no eksperimenta uzsākšanas un mijiedarbība starp ārstēšanu un laiku no eksperimenta uzsākšanas. Rādītāju vidējās vērtības ar standartklūdu katrai dzīvnieku grupai attēlotas grafiski. Atšķirības starp grupām, kā arī faktora ietekme vērtēta kā statistiski nozīmīga, ja $P < 0.05$.

8. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

8.1. Zāļu formas izstrāde, aprobācija

Šajā projektā izstrādātā aitu bolusa pagatavošanas metode, kurā izmantots liofilizēts *Tanacetum vulgare* (biškrēsliņa) lapu ekstrakts, apvienojumā ar hidroksipropilmetilcelulozi un stearīnskābi, ļauj iegūt stabilu, pakāpeniski sairstošu zāļu formu, kas piemērota ilgstošai aktīvo vielu izdalīšanai aitu gremošanas traktā. Izvēlētais sastāvs (55% ekstrakta, 30% hidroksipropilmetilcelulozes, 15% stearīnskābes) nodrošina nepieciešamās tehnoloģiskās īpašības bolusa veidošanai un kontrolētai sairšanai.

Pulverveida maisījuma apstrāde karstas kausēšanas ekstrūderī temperatūrā līdz 60°C ļauj iegūt mīkstu, termiski stabilu masu, kas piemērota bolusu formēšanai. Hidroksipropilmetilceluloze šajā formulā darbojas kā matrica, kas nodrošina pakāpenisku aktīvās vielas izdalīšanos, savukārt stearīnskābe uzlabo masas plastiskumu un sairšanas kontroli. Nerūsējošā tērauda lodītes ievietošana katrā bolā kalpo kā masas stabilizators un nodrošina bolusa noturību kuņģī.

Eksperimentālie dati liecina, ka 1 g bolusa saturs pilnībā sadalās vidēji 1,5 mēnešu laikā fosfātu buferšķīdumā (pH 6,8, 37°C), kas ir optimāls laika periods, lai nodrošinātu ilgstošu aktīvās vielas izdalīšanos un iedarbību pret parazītiem aitu organismā.

Izstrādātā bolusa tehnoloģija ar *Tanacetum vulgare* ekstraktu ir daudzsološs risinājums ilgstošai aitu aizsardzībai pret parazītiem, apvienojot dabiskas izcelsmes aktīvo vielu ar mūsdienīgu kontrolētas izdalīšanās zāļu formu.

8.2. Eksperimenta fāze *in-vitro*

In-vitro pētījumā tika vērtēta biškrēsliņa (*Tanacetum vulgare*) ietekme uz helmintu olu embrionāciju, izmantojot dažādas biškrēsliņa lapu ekstrakta koncentrācijas (no 10 mg/ml līdz 0,01 mg/ml) laboratorijas apstākļos. Rezultāti tika analizēti, izmantojot EHT% — rādītāju, kas atspoguļo helmintu olu neattīstīšanās pakāpi jeb anthelmintisko efektivitāti (**Tabula 5**).

Tabula 5. Biškrēsliņa liofilizātu atšķaidījumu pretparazitārā ietekme *in-vitro*.

	Negatīvā kontrole		Biškrēsliņš 10-1 (10mg/ml)		Biškrēsliņš 10-2 (1mg/ml)		Biškrēsliņš 10-3 (0,1 mg/ml)		Biškrēsliņš 10-4 (0,01mg/ml)	
	Olas	Kāpuri, embrion.ol	Olas	Kāpuri, embrion.ol	Olas	Kāpuri, embrion.ol	Olas	Kāpuri, embrion.ol	Olas	Kāpuri, embrion.ol
1. atkārtojums	48	986	391	4	1605	24	1336	13	1299	7
2. atkārtojums			899	5	657	6	1299	6	815	3
3. atkārtojums			293	3	518	4	996	6	181	1
Vidējie rādīt.	48	986	528	4	927	11	1210	8	765	4
EHT %	4,64		99,25		98,79		99,32		99,52	

1. Negatīvā kontrole

- 1) EHT% = 4.64%
- 2) Šis rādītājs atspoguļo dabiski notiekošo helmintu olu embrionāciju bez jebkādas aktīvās vielas ietekmes.
- 3) Zems EHT% nozīmē, ka lielākā daļa olu attīstījās līdz kāpuru stadijai, kā tas būtu sagaidāms bez ārstēšanas.

2. Biškrēsliņa ekstrakta efektivitāte

- 1) Visas pārbaudītās koncentrācijas uzrādīja ļoti augstu efektivitāti, pārsniedzot 98% EHT.

- 2) Zemākās koncentrācijas (īpaši 0,01 mg/ml) bija tikpat efektīvas, dažos gadījumos pat nedaudz efektīvākas nekā augstākās.
 - 3) Šāda augsta efektivitāte norāda, ka biškrēsliņa ekstrakts spēj ļoti efektīvi novērst embrionāciju un tādējādi potenciāli pārtraukt helmintu attīstības ciklu.
3. Devas neatkarība
- 1) Efektivitāte nemazinās pat pie ļoti zemām devām.
 - 2) Tas liecina, ka jau mazākās biškrēsliņa ekstrakta koncentrācijas var būt pietiekamas terapeitiskai iedarbībai.

8.3. Eksperimenta fāze *in-vivo*

8.3.1. Vispārīgie veselības rādītāji

Klīniskā izmeklēšana tika veikta pēc noteikta protokola, regulāri divas reizes karantīnas periodā un pēc tam 0 dienā, 14 dienā, 28 dienā, 42 dienā, 56 dienā. Tika izmeklēti šādi parametri: *habitus*, sāpju novērtējums pēc sejas, apmatojums, āda, defekācija, urinācija, temperatūra, sirdsdarbības frekvence, redzamās gļotādas, kapilāru pildīšanās laiks (KPL, sek), elpošanas tips un frekvence, ruminācija, spurekļa kustības, spēcīgums, periodiskums, zarnu peristaltika, spēcīgums, citas novirzes no normas. Kā arī tika noteikt aitu svārs.

Visas aitas visā pētījuma periodā bija klīniski veselās, tām nebija nekādu stresa vai slimības klīnisko pazīmju, tādējādi nodrošinot eksperimenta rezultātu ticamību. Starp grupām vai atsevišķiem dzīvniekiem netika konstatētas statistiski nozīmīgas klīnisko parametru atšķirības ($P > 0,05$).

Regulāri noteiktajos klīniskajos parametros *habitus*, sāpju novērtējums, apmatojums, āda visiem dzīvniekiem visa pētījumā laikā netika novērotas novirzes no normas. Tādi klīniskie parametri kā apetīte, ruminācija, urinācija, defekācija visiem dzīvniekiem visa pētījuma periodā bija regulāra un atbilstoša fizioloģiskajām normām. Kapilāru pildīšanās laiks visiem dzīvniekiem visa pētījumā laikā bija 2 sekundes, kas atbilst normai. Visām aitām eksperimenta laikā spurekļa kustības vidēji bija 5 kustības 2 minūtēs, tās bija vidēji spēcīgas un periodiskas, arī zarnu peristaltikas kustības visos gadījumos bija vidēji spēcīgas periodiskas. Ķermeņa temperatūra, sirds darbības frekvence un elpošanas frekvence atbilda aitu vecumam un turēšanas apstākļiem un iegūtie mērījumi atbilst konkrēto dzīvnieku fizioloģiskajām normām. Tā kā statistiski netika konstatētas atšķirības starp grupām un individuāliem dzīvniekiem ($P > 0,05$), tad ķermeņa temperatūras, sirds darbības un elpošanas frekvences rādītāju apkopojums visiem dzīvniekiem kopā norādīts **6. Tabulā**.

Vidēji ķermeņa temperatūra bija $39,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $39,98\text{ }^{\circ}\text{C}$, lai arī atsevišķiem dzīvniekiem incidentāli ķermeņa temperatūra tika konstatēta ap $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, tas tika skaidrots ar ārējās gaisa temperatūras un mitruma paaugstināšanos konkrētajā pētījuma brīdī un konkrētajam aitu vecumam un turēšanas apstākļiem uzskatāms par fizioloģiski atbilstošu. Līdzīgi variēja arī sirds darbības un elpošanas frekvence, kas vidēji eksperimenta laikā iekļāvās normas robežās, bet, paaugstinoties ārējai gaisa temperatūrai un mitrumam, tām bija neliela tendence pieaugt un, ārējai temperatūrai un gaisa mitrumam krītoties, arī šie klīniskie parametri kritās, kas uzskatāms par normālu fizioloģisku procesu.

Visās eksperimentālajās grupās visā pētījuma periodā bija vērojams svara pieaugums. Lielākais svara pieaugums tika reģistrēts P pozitīvajā kontroles grupā (P grupa). Granulu grupā barības uzņemšana

bija samazināta, iespējams, *T. Vulgare* garšas īpašību dēļ, neraugoties uz to, ka garšas uzlabošanai tika pievienota melase.

Tabula 6. Aitu ķermeņa temperatūras, sirdsdarbības frekvences un elpošanas frekvences vidējie rādītāji eksperimentālajā *in-vivo* posmā.

		Karantīna 1. reize	Karantīna 2. reize	Pētījuma 0.diena	Pētījuma 14.diena	Pētījuma 28.diena	Pētījuma 42.diena	Pētījuma 56.diena
Temperatūra C ⁰	VID	39,98	39,75	39,73	39,33	39,45	39,55	39,43
	SN	0,35	0,54	0,36	0,58	0,29	0,30	0,34
	Min	39,4	38,9	38,9	39,0	38,7	39,0	38,8
	Max	40,6	42,0	40,5	40,0	40,0	40,1	40,2
Sirdsdarbības frekvence	VID	115,63	100,47	107,31	118,84	109,00	110,59	97,68
	SN	21,56	22,25	25,27	24,29	16,45	14,73	21,58
	Min	80	64	56	68	84	80	64
	Max	160	156	164	172	160	144	156
Elpošanas frekvence	VID	72,19	65,72	81,09	71,75	83,69	75,78	79,48
	SN	26,10	21,66	26,19	26,22	24,70	19,67	31,69
	Min	22	18	18	18	18	20	38
	Max	128	116	136	124	128	112	184

8.3.2. Asins hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji

Hematoloģiskie rādītāji visās grupās pētījuma laikā saglabājās fizioloģisko normu robežās. Lai gan sākotnēji dažās grupās (īpaši bolus grupās A un B) RBC, HGB un HCT rādītāji bija paaugstināti, statistiski nozīmīgas izmaiņas laika gaitā netika novērotas. Grupā B 14. un 28. dienā konstatēta neliela leukocītu (WBC) skaita pieauguma tendence. Tikai granulu grupā tika novērota pastāvīga monocītu skaita palielināšanās līdz 56. dienai (regresijas koeficients 0,18), kas var liecināt par monocitozi un iespējamu iekaisuma vai stresa atbildreakciju.

Bioķīmiskie rādītāji lielākoties arī saglabājās normas robežās. Pētījuma sākumā visās grupās novērots pazemināts kopējā proteīna (TP) līmenis, kas līdz 28. dienai normalizējās. Albumīna (ALB) koncentrācija sākotnēji bija pazemināta grupā B un granulu grupā, bet vēlāk stabilizējās. AST līmenis dažās grupās samazinājās zem normas vērtībām pētījuma vēlākajos posmos (īpaši 42. un 56. dienā). Urīnviela un kreatinīns visā pētījuma laikā saglabājās fizioloģisko robežu ietvaros.

Preparātu ietekme uz hematoloģiskajiem un bioķīmiskajiem rādītājiem bija minimāla un klīniski nebūtiska.

8.3.3. Parazitoloģiskie rezultāti

Eksperimentā iekļautās aitas tika sagrupētas piecās grupās, katrā grupā pa sešiem dzīvniekiem un pēc 14 dienu adaptācijas/karantīnas perioda uzsākts pētījums. Uzsākot pētījumu, aitām koproloģiskās izmeklēšanas laikā tika diagnosticētas tādas parazītozes kā eimērijas, strongiloidozes, gremošanas strongilīdus un moniēzijas. Rezultāti parādīti **7. tabulā**.

7.tabula. Eimēriju, strongiloidu un moniēziju vidējais oocistu/olu skaits pēc MacMaster metodes.

Eksperimentālās aitu grupas	<i>Eimeria</i> spp. 0 / 56. diena	<i>Strongyloides papillosus</i> 0 / 56.diena	<i>Moniezia</i> spp. 0 / 56.diena
A bols	8700 / 1133	1642 / 967	108 / 75
B bols	5925 / 983	567 / 542	0 / 275
Granulas	6567 / 1217	500 / 1265	0 / 242
N kontrole	9992 / 508	983 / 2517	0 / 367
P kontrole	6750 / 1117	342 / 393	0 / 317

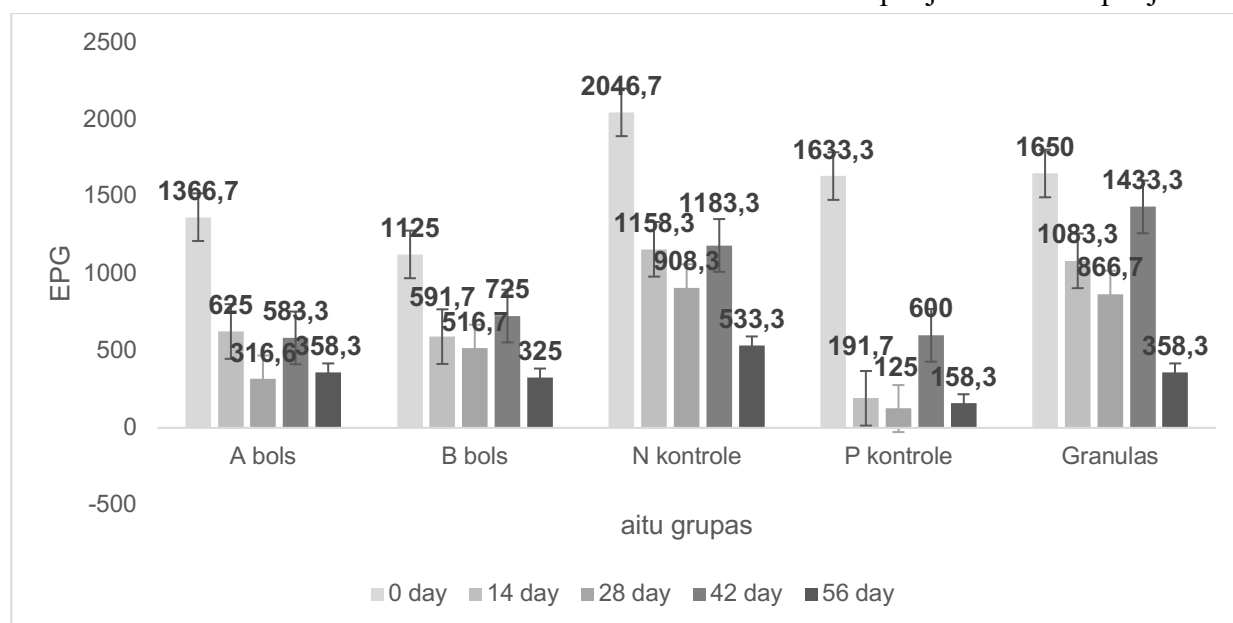
Projekta laikā iegūtie rezultāti parādīja, ka eimēriju invāzijas nebija augstas un būtībā invāziju vidējie rādītāji nemainījās sākot ar pētījuma uzsākšanas brīdi līdz pat pētījuma beigām. Eimēriju invāzijas sāk vērtēt, kā augstas, ja pēc MacMaster metodes iegūto eimēriju olu skaits ir virs 15000 (Andrew B.Forbes, 2021).

Strongyloides papillosus invāzija bija augsta A bolu grupā pētījuma uzsākšanas dienā, bet granulu un N kontroles grupās, pētījuma pēdējā 56. dienā. Pārējo pētījuma grupu aitām *S.papillosus* invāzijas varēja uzskatīt, kā vidēji augstas. Interesanti, ka P kontroles grupā, arī pēc levamizola lietošanas, aitām invāzija nesamazinājās, kas varētu liecināt par *S.papillosus* rezistenci pret levamizolu.

Moniēziju invāzijas tika diagnosticētas aitām visās pētījuma grupās. Atsevišķās pētījuma grupās moniēzijas netika diagnosticētas pētījuma uzsākšanas brīdī, bet to var izskaidrot ar moniēziju bioloģiskā cikla īpatnībām (moniēzijas parazitiskās olas ārējā vidē katru dienu neizdalās). Tāpat, jāatzīmē, ka moniēziju invāzijas pēc MacMaster netiek diferencētas, kā zemas, vidējas vai augstas.

Galvenais pētījuma mērķis bija izpētīt biškrēsliņa (*Tanacetum vulgare*) lapu ekstrakta efektivitāti uz gremošanas strongilīdu invāziju aitām *in vivo*. Rezultāti parādīti **10. attēlā**.

10. attēls. Gremošanas strongilīdu invāziju vidējie rādītāji pēc MacMaster metodes, aitū grupās uzsākot pētījumu un visā pētījuma laikā.



Kā redzams, uzsākot pētījumu (0 diena) aitām, visās pētījuma grupās vidējais gremošanas strongilīdu olu skaits 1 g fekāliju (EPG) ir augsts. A bola grupā 1366.7 olas 1 g fekāliju, B bola grupā 1125, P grupā - 1633.3, granulu grupā -1650, bet visaugstākā invāzija bija kontroles grupas aitām, sasniedzot invāziju 2046.7 parazītu olas 1 g fekāliju. Jāatzīmē, ka gremošanas strongilīdu invāzijas, kādas tika diagnosticētas aitām pirms pētījuma uzsākšanas (0 diena) ir augstas (Hansen and Perry, 1994).

Pētījuma 14. dienā, visās pētījuma aitū grupās, strongilīdu invāzijas samazinājās. P kontroles grupas aitām tika dots dehelmintizācijas līdzeklis levamizols, jāatzīmē, ka turpmākā pētījuma laikā, šīs grupas aitām invāzijas bija zemas, un vairs nesasniedza sākotnējos rādītājus, kas norāda uz to, ka levamizols ir efektīvs pret gremošanas strongilīdiem. A un B bola grupās pētījuma 14. dienā strongilīdu invāzijas būtiski samazinājās līdz 625 olas/1g A bola grupā un 591.7 olas/1g B bola grupā. Aitām, kurām tika izbarotas biškrēsliņa granulas, strongilīdu vidējie rādītāji 14. dienā bija 1083.3 olas 1 g fekāliju. Vismazāko strongilīdu olu samazinājumu novērojām N kontroles grupas aitām – 1158.3 olas 1 g fekāliju.

Gremošanas strongilīdu invāzijas turpināja samazināties arī pētījuma 28. dienā. Būtiski invāzijas samazinājās A bolu grupā (316.6 olas 1 g fekāliju) un B bolu grupā (516.7 olas 1 g fekāliju), bet kontroles grupā un granulu grupas aitām gremošanas strongilīdu olu skaits samazinājās nebūtiski – 908.3 un 866.7 olas 1 g fekāliju.

Pētījuma 42.dienā visās aitū grupās novēroja invāziju palielināšanos, kas varētu būt izskaidrojams ar jauno kāpuru attīstību līdz pieaugušai stadijai un parazītisko olu producēšanu. Kā arī P grupas aitām, 42. dienā novēroja invāzijas paaugstināšanos, kas ir izskaidrojama ar levamizola iedarbību 0. dienā pret pieaugušiem gremošanas strongilīdiem, bet ne pret kāpuru stadijām aitū glumenieka gļotādā. Savukārt 42. dienā kāpuri ir sasnieguši pieaugušo stadiju un sāk producēt parazītiskās olas.

Pētījuma 56. dienā, visās grupās, novērojām strongilīdu invāziju samazināšanos. A bolu grupā invāzija bija 358.3 olas 1 g fekāliju, B bolu grupā – 325 olas 1 g fekāliju, granulu grupā – 358.3 olas 1 g fekāliju un kontroles grupa – 533.3 olas 1 g fekāliju.

Invāziju samazināšanās 56. dienā šobrīd ir grūti izskaidrot, jo var būt vairāki iemesli:

1. Aitas ir pieradušas pie jaunajiem dzīves apstākļiem, jūtas labi, tām nav stresa;
2. Vienā grupā ir neliels dzīvnieku skaits (sešas aitas);
3. Visas aitas brīvi tiek pie barības galda, novēro labas kondīcijas;
4. Aitas tiek labi ēdinātas, proteīniem bagāta barība;
5. Biškrēsliņa ekstrakts ir efektīvs pret gremošanas strongilīdu invāzijām.

Kurš konkrēti no iepriekš minētajiem faktoriem ir noteicošais, bet, kuram ir papildu nozīme, šobrīd nav iespējams definēt.

Eksperimenta pēdējā dienā (56. diena) visām pētījumā iekļautām aitām tika ievākti koproloģiskie paraugi, dzīvnieki tika eitanizēti, un tika veikta to patologanatomiskā izmeklēšana - sekcija. Sekcijas laikā izolēto pieaugušo parazītu veids un skaits parādīts **8. tabulā**.

8. tabula. Diagnosticētie parazīti patologanatomiskās izmeklēšanas laikā.

Parazītu suga	Aitū grupas				
	A bols	B bols	Granulas	N kontrole	P kontrole
<i>Haemonchus contortus</i>	5	4	4	5	4
<i>Trichostrongylus axei</i>	1	0	1	0	1
<i>Ostertagia</i> spp.	0	2	0	0	0
<i>Trichuris</i> spp.	3	5	4	6	3
<i>Chabertia ovina</i>	4	5	4	4	1
<i>Moniezia</i> spp.	2	4	4	1	3

Sekcijas laikā aitū gremošanas traktā, diagnosticējām tādu pieaugušo parazītu, kā *H. contortus*, *T. axei*, *Ostertagia* spp., *Trichuris* spp., *Chabertia ovina*, un *Moniezia* spp..

Jāatzīmē, ka no gremošanas strongilīdiem diagnosticējām glumeniekā tādas parazītozes, kā *H. contortus*, *T. axei* un *Ostertagia* spp., bet resnajās zarnās *Chabertia ovina*. Biežāk diagnosticētās parazītozes, visās pētījuma grupās, bija *H. contortus*, *Trichuris* spp., *Chabertia ovina* un *Moniezia* spp., kas atbilst literatūrā aprakstītajām biežākajām invāzijām aitām.

8.3.4. Bakterioloģiskie rezultāti

Eksperimentālās fāzes pētījuma veikšanai mikrobioloģiskai testēšanai 32 aitu fēču paraugi tika nosūtīti divos atkārtojumos.

Uzsākot pētījumu, mikrobioloģiski fēcēs aitām nekonstatējām ne ESBL *E.coli*, ne *Clostridium perfringens*, savukārt dažiem dzīvniekiem (4/32) konstatējām *E.coli* celmiem rezistenci pret ampicilīnu (1/32), amoksicilīnu+klavulānskābi (1/32) un cefoksitīnu (1/32), kā arī vidēju jutību pret cefepimu (3/32). Pie tam, diviem no septiņiem dzīvniekiem konstatējām *E.coli* rezistenci pret diviem antibiotiku grupu pārstāvjiem (**Tabula 9**).

Tabula 9. *Clostridium perfringens* skaits eksperimentālo dzīvnieku grupā pirms un pēc pētījuma.

aitas (klienta) ID	<i>Clostridium perfringens</i> skaits (kvv/g)	
	27.novembra (2024) paraugi	12. decembra (2024) paraugi
4131	Nekonstatē	Nekonstatē
3824	Nekonstatē	Nekonstatē
3969	Nekonstatē	Nekonstatē
4083	Nekonstatē	Nekonstatē
3836	Nekonstatē	Nekonstatē
3928	Nekonstatē	Nekonstatē / CIP
3961	Nekonstatē	Nekonstatē
3910	Nekonstatē	10 ³ pakāpē
4163	Nekonstatē	Nekonstatē
3773	Nekonstatē	10 ⁴ pakāpē
3842	Nekonstatē / FEP	Nekonstatē
4164	Nekonstatē	Nekonstatē
4042	Nekonstatē / AMC	10 ⁴ pakāpē
4019	Nekonstatē	Nekonstatē
3918	Nekonstatē	Nekonstatē
3810	Nekonstatē	Nekonstatē
3886	Nekonstatē / AMP un FEP	10 ⁴ pakāpē
3946	Nekonstatē / Cefoksitīns un FEP	Nekonstatē / CIP
4071	Nekonstatē	Nekonstatē
4022	Nekonstatē	Nekonstatē
3977	Nekonstatē	Nekonstatē
3753	Nekonstatē	10 ⁶ pakāpē
3831	Nekonstatē	Nekonstatē
4004	Nekonstatē	10 ⁵ pakāpē
4043	Nekonstatē	Nekonstatē
3870	Nekonstatē	Nekonstatē / FEP
3902	Nekonstatē	Nekonstatē
3790	Nekonstatē	Nekonstatē
4082	Nekonstatē	Nekonstatē
3822	Nekonstatē	10 ³ pakāpē
3777	Nekonstatē	Nekonstatē
3833	Nekonstatē	Nekonstatē

Eksperimentālās fāzes noslēguma etapā testēšanai nosūtītajos 32 aitu fēču paraugos mikrobioloģiskā aina pamainījās. Tāpat kā uzsākot pētījumu, mikrobioloģiski fēcēs aitām nekonstatējām

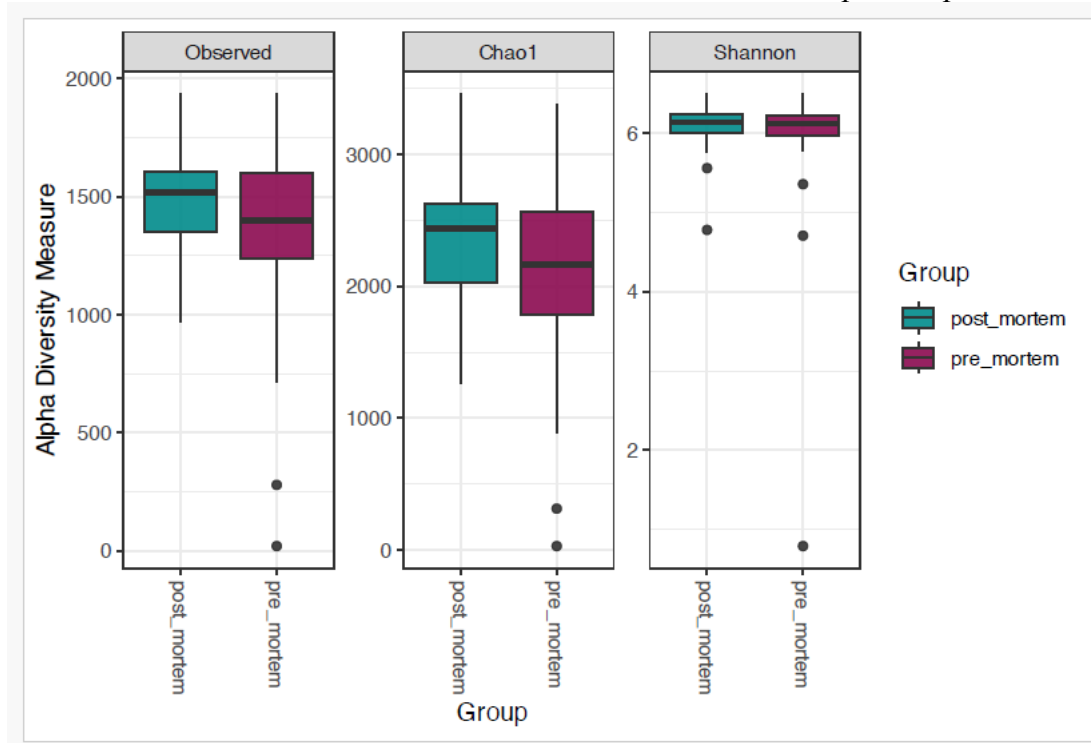
ESBL *E.coli*, taču *Clostridium perfringens* konstatējām jau vairāk dzīvniekiem (7/32), kur skaits variēja no 1×10^3 līdz 1×10^6 KVV/g).

Salīdzinot antibiogrammas rezultātus pētījuma noslēgumā, tad konstatējām *E.coli* celmiem rezistences samazināšanos, t.i., kopumā trīs dzīvniekiem novērojām vidēju jutību (pret ciprofloksacīnu (2/32) un cefepimu (1/32)).

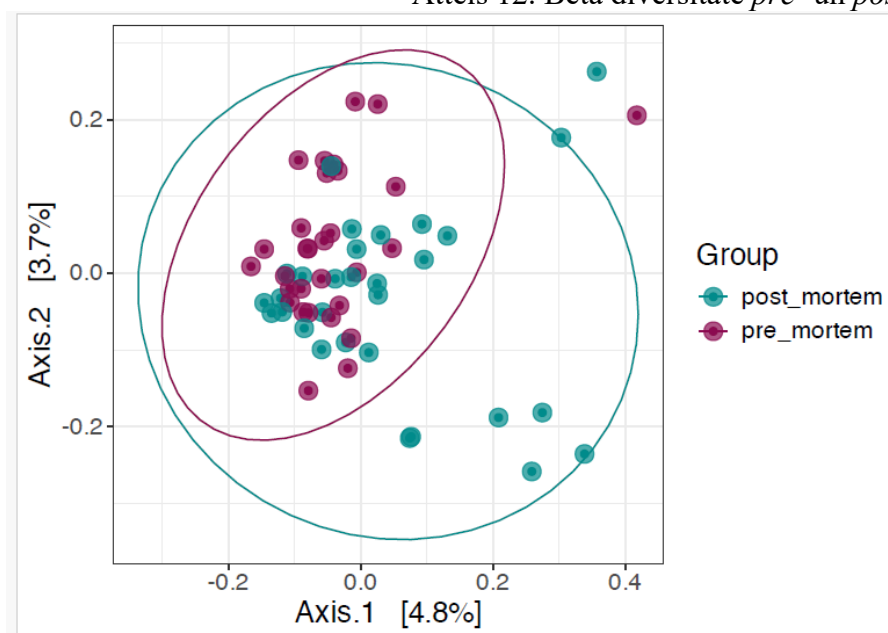
Analizējot **aitu fekāliju mikrobiotas sastāvu** ar 16S rRNS sekvencēšanu, konstatējumi redzami turpmākos attēlos.

Kopsummā - alfa (**Attēls 11**) un bēta (**Attēls 12.**) diversitāte neatšķīrās starp *pre*- un *post-mortem* grupām, kas liecina, ka pētījuma rezultātā mikrobiotas daudzveidība nav būtiski ietekmēta.

Attēls 11. Alfa diversitāte *pre*- un *post-mortem* grupās.

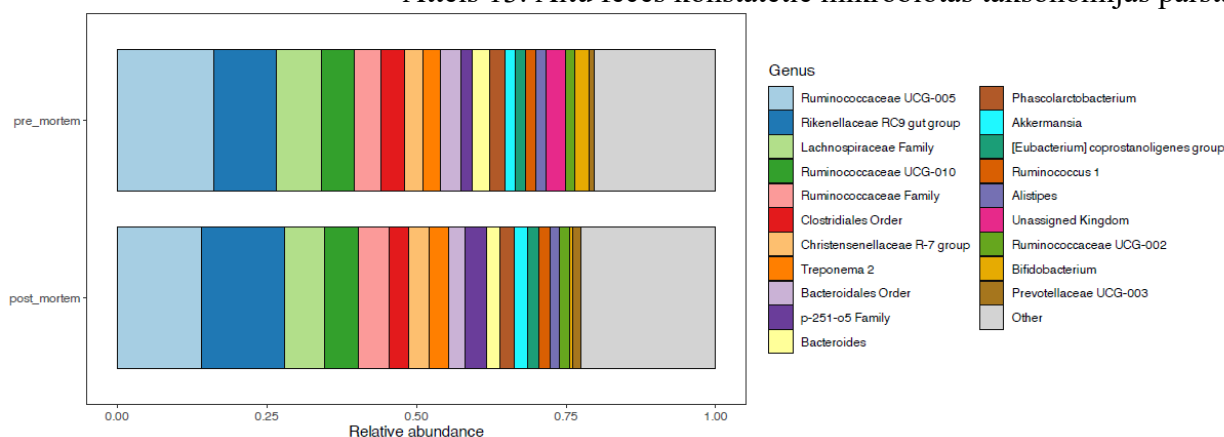


Attēls 12. Bēta diversitāte *pre*- un *post-mortem* grupās.



Kopumā konstatēti vairāk kā 15 mikrobiotas dažādu taksonomisko grupu pārstāvji (**Attēls 13**).

Attēls 13. Aitu fēcēs konstatētie mikrobiotas taksonomijas pārstāvji.



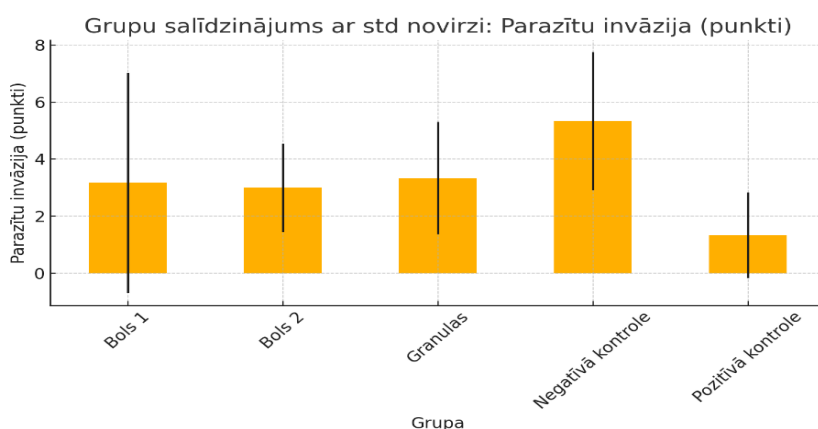
Kā redzams attēlā, tad *pre-mortem* biežāk konstatēja dzīvniekiem *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* dzimtas, *Bacteroidales* kārtas, *Bifidobacterium* pārstāvjus, taču *post-mortem* – *Rikenellaceae*, *Akkermansia* un *Prevotellaceae*. Diferenciālās sastopamības analizē divi taksonomisko grupu pārstāvji (*Bifidobacterium* un *Prevotellaceae*) būtiski atšķīrās starp pētījuma grupām.

8.3.5. Histoloģiskie rezultāti

Nematodes kuņģa-zarnu trakta gļotādā

Gremošanas trakta nematožu invāzija tika konstatēta histoloģiski visās eksperimentālajās grupās, arī pozitīvās kontroles grupā (aitām, kuras bija saņēmušas konvencionālos pretparazitāros līdzekļus). Tomēr nematožu daudzums atšķīrās starp grupām. Kā gaidīts, vismazākais parazītu skaits atrasts pozitīvās kontroles grupas aitām, savukārt visaugstākā parazītu invāzijas intensitāte bija negatīvajā kontrolē (aitām, kas bija invadētas, bet netika ārstētas). Pārējās – biškrēsliņa ekstraktu saņēmušās – grupas ieņēma starpvietu: tajās novērota tendence uz mazāku nematožu invāzijas intensitāti nekā negatīvajā kontrolē, taču parazītu skaits nebija tik zems kā pozitīvajā kontrolē. Kopējais nematožu invāzijas indekss katrai grupai (summējot punktus) ir parādīts zemāk redzamajā grafikā (**Attēls 14**).

14. attēls. Parazītu invāzijas intensitāte starp eksperimentālajām un kontroles grupām.



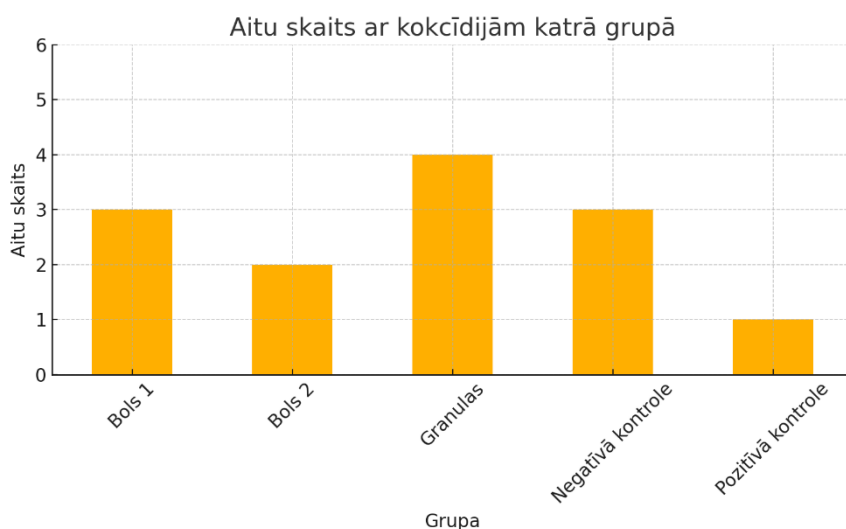
Kopumā piecām no trīsdesmit pētījumā iekļautajām aitām netika konstatēta neviena nematode (pilnībā negatīvs atradums). Šīs aitas sadalījās pa grupām šādi: 2 aitas pozitīvās kontroles grupā, 2 aitas

Bols 1 grupā un 1 aita granulu grupā. Lai statistiski izvērtētu novērotās atšķirības starp grupām (piemēram, vai biškrēsliņa ekstrakta grupu nematožu invāzijas intensitāte statistiski nozīmīgi atšķiras no kontroles grupām), ir nepieciešama papildu datu analīze, jo vizuāli novērotās tendences pašas par sevi vēl negarantē statistiski ticamu efektu.

Kokcīdijas zarnu gļotādā

Zarnu gļotādās konstatēto kokcīdiju klātbūtne tika fiksēta piezīmēs. Visās pētījumā iekļautajās grupās vismaz vienai aītai atrada kokcīdijas zarnu epitēlijā. Vismazākā mērā kokcīdijas konstatēja pozitīvās kontroles grupā – tikai vienai no aītām atrastas dažas oocistas. Savukārt visbiežāk kokcīdijas redzētas granulu grupas aītām, kur četrām no sešām aītām preparātos bija kokcīdiju oocistas. Pārējās grupās (negatīvā kontrole, Bols 1, Bols 2) kokcīdijas atrastas vidēji bieži (2–3 aītām katrā grupā). Statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām netika novērotas ($p > 0,05$; χ^2 tests). Šie rezultāti liecina, ka biškrēsliņa ekstraktam nav būtiskas ietekmes uz kokcīdiju invāziju – ekstrakta grupās kokcīdiju sastopamība nebija zemāka par kontroles grupām (dažos gadījumos pat augstāka), tātad biškrēsliņš visticamāk nav efektīvs pret kokcīdijām. Kokcīdiju sastopamība aītām dažādās grupās redzama **15. attēlā**.

15. attēls. Aitu skaits ar konstatētu kokcīdiju invāziju eksperimentālajās un kontroles grupās.

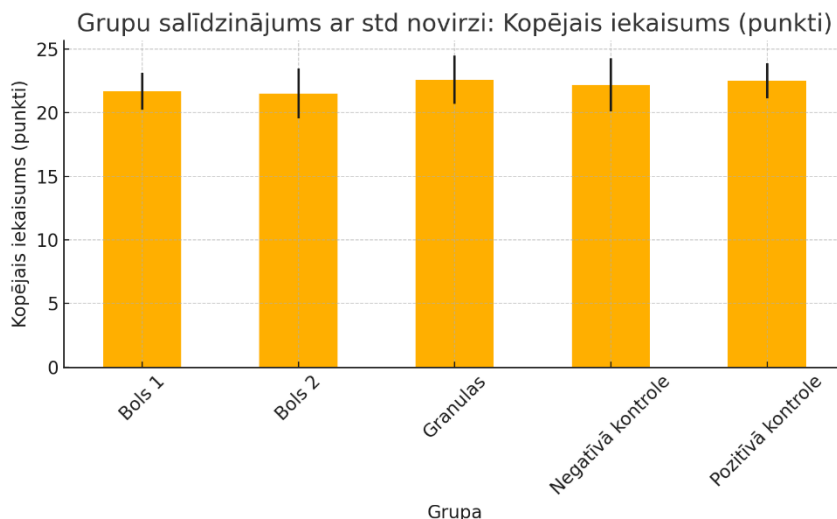


Kuņģa un zarnu gļotādas iekaisums

Kopējais gļotādas iekaisuma punktu skaits (intensitātes indekss), kas iegūts summējot iekaisuma smaguma pakāpes visos novērtētajos kuņģa-zarnu trakta segmentos (priekškuņģos, glumeniekā, tievajās un resnajās zarnās; kopā 10 lokalizācijās), bija līdzīgs visām grupām. Būtiskas atšķirības starp grupām netika novērotas. Interesanti, ka nebija arī statistiski nozīmīgas atšķirības starp pozitīvo un negatīvo kontroli – tātad, pilnīga nematožu neesamība (poz. kontrole) nesamazināja kopējo iekaisuma intensitāti, salīdzinot ar nematožu invadētām un neārstētām aītām (neg. kontrole). Šis novērojums liecina, ka nematožu klātbūtne vai neesamība nebija galvenais faktors gļotādas iekaisuma izraisīšanā šajos apstākļos. Jāuzsver, ka iekaisuma punktu aprēķinā tika iekļauta tikai iekaisuma intensitāte, bet neņemot vērā iekaisuma raksturu (kvalitatīvo šūnu sastāvu) un izplatību, kas arī varētu ietekmēt audu reakcijas,

taču šādi faktori kvantitatīvajā indeksā neatspoguļojas. Kopējais iekaisuma intensitātes indekss atainots **16. attēlā.**

16. attēls. Iekaisuma intensitāte kuņģa-zarnu traktā (10 lokāciju summa) eksperimentālajās un kontroles aitu grupās.



Detalizētāka iekaisuma rezultātu analīze atsevišķās gremošanas trakta daļās parādīja tikai nelielas atšķirības starp grupām, turklāt šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. Piemēram, priekškuņģos (spureklī, aceknī, grāmatniekā) viszemākais vidējais iekaisuma rādītājs novērots granulu grupas aitām, savukārt šai pašai grupai bija nedaudz augstāks iekaisums glumeniekā (salīdzinot ar citām grupām). Lai gan šīs izmaiņas ir nelielas un statistiski nebūtiskas, tās varētu norādīt, ka granulu forma potenciāli izraisa vieglu glumenieka gļotādas kairinājumu (attiecīgi nedaudz lielāks iekaisums glumeniekā), toties priekškuņģos granulas drīzāk mazināja kairinājumu (zemāks iekaisums). Bolus veidā ievadītais ekstrakts nebija izraisījis papildu kairinājumu priekškuņģos – bolus grupu aitām iekaisuma rādītāji spureklī, aceknī un grāmatniekā bija līdzīgi kā pozitīvajai kontrolei, kas nozīmē, ka bolus objekti priekškuņģos būtisku hronisku iekaisuma reakciju neradīja.

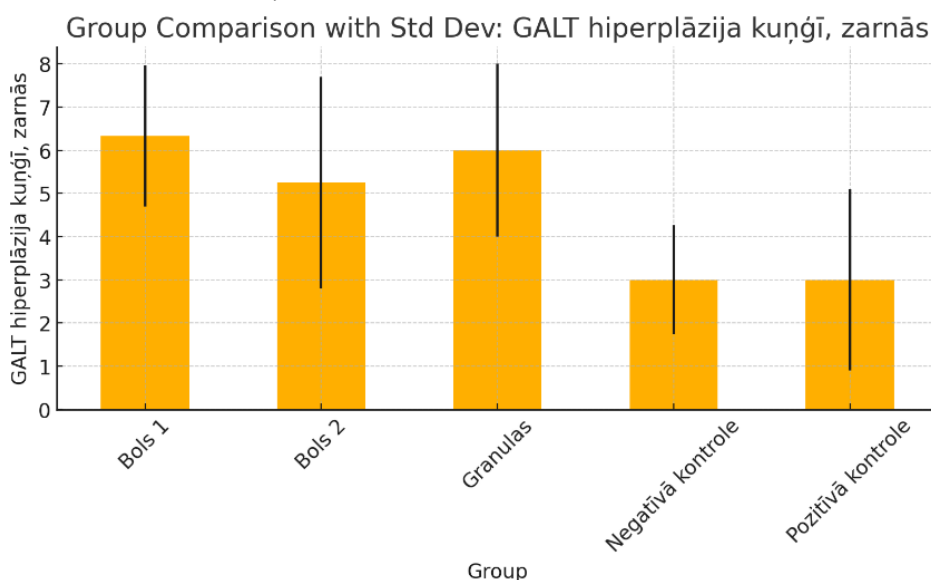
Attiecībā uz iekaisuma šūnu sastāvu dažādās gremošanas trakta daļās novērotais atbilda gaidītajam. Priekškuņģu gļotādās visām aitām, neatkarīgi no grupas, pārsvarā redzami nelieli multifokāli limfocītu sakopojumi *lamina propria* slānī. Glumeniekā tipiski dominēja limfocīti un plazmas šūnas dažādās savstarpējās proporcijās, un iekaisums tur parasti bija difūzs. Atsevišķām aitām (dažādās grupās) glumeniekā novēroja arī ievērojamu eozinofilo leukocītu piejaukumu, taču nekad eozinofīli nebija pārsvarā pār limfocītiem/plazmas šūnām. Tievajās un resnajās zarnās (duodenumā, jejunumā, ileumā, aklajā zarnā un lokazarnā) gļotādas pamatkārtā bija limfocīti, plazmas šūnas un eozinofīlie leukocīti mainīgās proporcijās atkarībā no lokalizācijas. Piemēram, gūžas zarnā (ileum) visbiežāk dominējošā populācija bija eozinofīlie leukocīti, kas atbilst normālai imūnreakcijai Peijera plāksnīšu rajonā. Salīdzinot grupas, negatīvās kontroles aitām visos orgānos dominēja limfocīti (ar vai bez plazmas šūnām); piemēram, glumeniekā šīm aitām bieži fiksēts L>P (limfocīti pārsvarā, plazmas šūnas mazāk, eozinofīlie leukocīti nelielā skaitā). Pozitīvās kontroles grupas aitām galvenokārt arī dominēja limfocīti, un netika novērota izteikta eozinofilo leukocītu klātbūtne – pat ja atsevišķos orgānos iekaisuma intensitāte punktu izteiksmē tām bija augstāka nekā negatīvajā kontrolē. Bols 1 un Bols 2 grupās tāpat pārsvarā dominēja limfocitārs iekaisums, tomēr šajās grupās biežāk nekā citās parādījās arī jaukta tipa infiltrāti: piemēram, fiksēti gadījumi ar L>P vai L+P (limfocīti kopā ar plazmas šūnām vienādā

daudzumā), un Bols 1 grupā novēroja pat dažus gadījumus $L > PE$ (limfocīti pārsvarā, bet klāt arī plazmas šūnas un eozinofīlie leukocīti). Šāda iekaisuma šūnu daudzveidība Bolus grupā varētu liecināt par plašāku imūnreakciju, ko izraisījis biškrēsliņa ekstrakts. Granulu grupā iekaisuma šūnu sastāvs pēc būtības līdzinājās pārējām – dominēja limfocīti, tikai atsevišķos gadījumos novēroja variantus kā $L > E$ (limfocīti pārsvarā, eozinofīlu mazliet vairāk par plazmas šūnām).

Gļotādas limfoīdo audu hiperplāzija

Kuņģa un zarnu trakta limfoīdo audu (GALT) hiperplāzija dažādās grupās ievērojami atšķīrās. Biškrēsliņa ekstrakta grupu aitām – gan bolus (Bols 1 un Bols 2), gan granulu formu saņemušajām – tika konstatēts augstāks gļotādas limfoīdo audu hiperplāzijas rādītājs nekā abām kontroles grupām (**16. attēls**). Proti, vidējais GALT hiperplāzijas punktu skaits visās ekstrakta grupās bija būtiski lielāks, kamēr pozitīvās un negatīvās kontroles savā starpā bija līdzīgas (abas ar relatīvi zemākiem hiperplāzijas rādītājiem).

16. attēls – Gļotādas limfoīdo audu hiperplāzijas indekss eksperimentālajās grupās.



Šie rezultāti norāda uz iespējamu biškrēsliņa imūnstimulējošu iedarbību uz kuņģa-zarnu trakta limfoīdo audu sistēmu. Augstāka GALT aktivitāte biškrēsliņa grupu aitām kombinācijā ar nedaudz zemāku novēroto nematožu invāzijas līmeni (salīdzinot ar neārstēto kontroli) ļauj izvirzīt hipotēzi, ka biškrēsliņa pretparazitārā darbība *in vivo* varētu būt saistīta ar GALT stimulāciju. Citiem vārdiem, ekstrakts, iespējams, pastiprina lokālo imūnreakciju zarnu sienā, kas savukārt palīdz ierobežot parazītu invāzijas intensitāti.

Mezenterijālā limfmezgla izmaiņas

Visu grupu mezenterijālajos limfmezglos tika konstatēta limfoīdo audu hiperplāzija, galvenokārt izteikta kā folikulāra hiperplāzija (B-šūnu zonas palielināšanās). Šīs hiperplāzijas vidējā smaguma pakāpe grupās bija līdzīga un kvantitatīvi variēja tikai nedaudz (aptuveni 2,3–2,5 punktu robežās), kas atbilst vieglai līdz mērenai folikulārai hiperplāzijai. Daļai aitū (atsevišķi gadījumi gandrīz visās grupās) novērota arī parakortikālā hiperplāzija (T-šūnu zonas paplašināšanās). Tomēr parakortikālā komponenta hiperplāzija bija biežāk sastopama tieši biškrēsliņa ekstrakta grupu aitām – īpaši Bols 2 un granulu

grupās – salīdzinot ar kontrolēm. Šis atradums liecina, ka visās aitu grupās parazitārā invāzija izraisījusi imūnreakciju ar B-limfocītu aktivāciju (folikulu palielināšanos), bet biškrēsliņa ekstrakts varētu papildus stimulēt arī T-limfocītus, ko atspoguļo biežāk novērotā parakortikālā hiperplāzija bolus un granulu grupās. Kopumā mezenterālo limfmezglu izmaiņas norāda uz aktīvu imūnsistēmas darbību pret gremošanas traktā esošajiem antigēniem visās grupās, ar potenciāli intensīvāku T-šūnu atbildi biškrēsliņa saņēmušajām aitām.

Aizkuņģa dziedzeru izmaiņas

Aizkuņģa dziedzeru mikroskopiskās struktūras izmaiņas lielākoties netika novērotas. Nevienai no pētījumā iekļautajām aitām netika konstatētas nopietnas patoloģiskas pārmaiņas eksokrīnajā aizkuņģa dziedzerī. Tikai piecām aitām (5/30 jeb ~17%) histoloģiski redzams neliels līdz viegls periduktāls iekaisums – t.i., minimāls limfocītu infiltrāts ap dažu aizkuņģa dziedzeru izvadkanālu gļotādu. Šīs atrades sadalījās starp grupām: 3 no šīm 5 aitām piederēja biškrēsliņa ekstrakta grupām (Bols 1 un Bols 2), bet 2 aitas – negatīvajai kontrolei. Iekaisuma intensitāte visos gadījumos bija zema (1–2 punkti). Ņemot vērā, ka šādas periduktālas infiltrācijas bija nelielas un sporādiskas, tās visticamāk uzskatāmas par incidentālām (nejaušām) izmaiņām, kas nav tieši saistītas ar biškrēsliņa iedarbību vai konkrēto eksperimentālo apstākļu ietekmi.

Aknu un žultspūšļa izmaiņas

Aknu audos dažām aitām tika konstatēts neliels līdz viegls portālo apvidu iekaisums, kas galvenokārt izpaudās kā limfocītu vai limfoplazmacītu infiltrāts ap maziem žultsvadiņiem (periholangīts). Šāds hronisks portāls iekaisums nebija unikāls kādai vienai grupai – tas sastopams gan biškrēsliņa, gan kontroles grupu dzīvniekiem. Precīzāk, visām aitām no Bols 2 grupas novērots minimāls vai viegls periholangīts, tāpat šāda atrade konstatēta 2 aitām Bols 1 grupā un 2 aitām granulu grupā. Arī pozitīvās kontroles grupā 4 aitām un negatīvās kontroles grupā 5 aitām fiksēts līdzīga rakstura viegls periholangīts. Tā kā šādas izmaiņas tika novērotas arī abās kontroles grupās (t.sk. neārstētajās aitās), tās visticamāk atspoguļo fona līmeņa iekaisumu aknās, kas var būt saistīts ar citiem faktoriem (piemēram, parazitāru migrācijas stadijām vai citiem vides/agru dzīves apstākļiem), nevis ar pašu biškrēsliņa ekstraktu.

Žultspūšļa gļotādā histoloģiski daudzām aitām visās grupās redzams neliels līdz viegls hronisks iekaisums (limfocītu infiltrācija). Atsevišķos gadījumos negatīvajā kontroles grupā šis iekaisums bija izteiktāks un difūzs (aptver visu gļotādu), kamēr citās grupās – pārsvarā multifokāls (perēkļveida). Negatīvajai kontrolei kopumā raksturīga augstāka vidējā iekaisuma smaguma pakāpe žultspūslī salīdzinot ar citām grupām. Infiltrātā dominēja limfocīti, tomēr negatīvās kontroles aitām salīdzinoši biežāk piejaucās arī eozinofīlie leukocīti. Biškrēsliņa ekstrakta grupās žultspūšļa iekaisuma atrades nekādā ziņā nepārsniedza kontroles līmeni; tieši otrādi – to vidējā intensitāte drīzāk līdzinājās pozitīvās kontroles grupai un dažos gadījumos bija zemāka nekā negatīvajā kontrolē. Tādējādi var secināt, ka biškrēsliņa ekstrakts neizraisīja pastiprinātu žultspūšļa gļotādas iekaisumu. Visi novērotie aknu un žultspūšļa iekaisuma gadījumi bija viegli un hroniski, un to klātbūtne arī kontrolgrupās liecina, ka šīs izmaiņas pamatā ir *background* jeb fona atrade, nevis specifiska patoloģija, ko būtu izraisījusi kāda no eksperimentālajām iejaukšanās metodēm.

Interpretācija

Biškrēsliņa lapu ekstrakta ietekme uz nematožu invāziju aitū gremošanas traktā izpaudās kā parazītu skaita samazināšanās tendence, salīdzinot ar neārstētām aitām. Rezultāti rāda, ka nematožu slodze biškrēsliņa bolus un granulu grupās bija zemāka nekā negatīvajā kontrolē, lai gan nesasniedza tik zemu līmeni kā aitām, kas tika ārstētas ar standarta pretparazitāriem līdzekļiem. Tas nozīmē, ka biškrēsliņa ekstraktam varētu būt daļēja antihelmintiska efektivitāte – tas spēj samazināt, bet ne pilnībā novērst nematožu invāziju. Lai pārlicinātos, cik būtiska ir šī atšķirība, būtu jāveic statistiska analīze, taču tendence saskan ar hipotēzi par ekstrakta pretparazitāro aktivitāti. Tajā pašā laikā ekstrakta ietekme uz kokcīdijām netika novērota – kokcīdiju infekcijas biežums ekstraktu saņēmušajās grupās nebija mazāks par kontrolēm. Gluži pretēji, granulu grupā kokcīdijas tika atrastas biežāk nekā citās grupās, kas ļauj secināt, ka biškrēsliņš nav iedarbīgs pret zarnu kokcīdijām.

Neskatoties uz atšķirībām nematožu invāzijas intensitātē, gļotādas iekaisuma intensitāte starp grupām būtiski neašķīrās. Visām aitām tika konstatēts zināms hronisks iekaisuma šūnu infiltrāts gremošanas trakta gļotādā, neatkarīgi no tā, vai aita bija ar vai bez histoloģiski novērojamiem parazītiem. Tas liecina, ka parazītu klātbūtne nebija vienīgais iekaisumu noteicošais faktors – iespējams, pamata līmeņa imūnreakcija gremošanas traktā pastāvēja neatkarīgi no invāzijas, ko varētu uzturēt citi antigēni (piemēram, barības mikroorganismi vai zarnu mikrobioms). Biškrēsliņa ekstrakts, spriežot pēc rezultātiem, neizraisīja pastiprinātu iekaisumu: kopējie iekaisuma indeksi ekstrakta grupās nebija augstāki par kontroles grupām. Tas ir pozitīvi, jo liecina par ekstrakta nekaitīgumu gļotādai – tas nerada papildu iekaisuma reakciju vai audu bojājumu. Novērotās nelielās atšķirības (piemēram, nedaudz augstāks iekaisums glumeniekā granulu grupā) nebija statistiski nozīmīgas, tomēr norāda uz potenciālu lokālu kairinošu efektu, kas varētu būt saistīts ar granulu formu (iespējams, granulu daļiņas var mehāniski vai ķīmiski vairāk kairināt glumēnēka gļotādu). Tomēr pat šis efekts bija ļoti mērens. Savukārt bolus ievadīšana priekškuņģos neizraisīja būtisku lokālu kairinājumu – tas ir svarīgs praktisks secinājums, jo lielāka izmēra bolus preparātu ilgstoša atrašanās spureklī neradīja čūlas vai hronisku iekaisumu rētaudos un citos priekškuņģos.

Būtiska atradne biškrēsliņa grupu aitām bija ievērojami pastiprināta GALT hiperplāzija jeb vietējās zarnu imūnsistēmas aktivācija. Šis atradums dod pavedienus par iespējamo biškrēsliņa darbības mehānismu – ekstrakts, iespējams, stimulē zarnu gļotādas limfoidos audus, veicinot spēcīgāku lokālo imūnreakciju pret parazītiem. Rezultātā, lai arī ekstraktam var nebūt tieša parazītus nogalinoša iedarbība (vai arī tā ir nepilnīga), tas var palīdzēt organismam pašam cīnīties ar invāziju, mobilizējot imūnsistēmas resursus tieši invāzijas vietā. Novērotā augstāka T-limfocītu aktivācija mezenterālajos limfmezglos (biežāka parakortikālā hiperplāzija biškrēsliņa grupās) papildus apstiprina imūnstimulācijas hipotēzi. Šķiet, ka biškrēsliņš stimulē ne tikai B-šūnu atbildi (kas būtu sagaidāma pie jebkuras hroniskas antigēnu iedarbības), bet arī T-šūnu mediētu imunitāti, kas ir kritiska efektīvai pretparazītu aizsardzībai.

Svarīgi ir tas, ka netika novērotas būtiskas patoloģiskas izmaiņas citos orgānos, kas varētu radīt bažas par ekstrakta drošumu. Aizkuņģa dziedzeris lielākajai daļai dzīvnieku bija bez bojājumiem; nelielais periduktālais iekaisums dažām aitām, visticamāk, bija nejauša atradne un nevis biškrēsliņa izraisīts pankreatīts. Aknās un žultspūslī konstatētās vieglās iekaisuma reakcijas bija sastopamas arī kontroles aitām, tātad tās drīzāk uzskatāmas par fona parādību aitās ar hroniskām invāzijām vai citiem vides faktoriem. Biškrēsliņa grupu aitām nebija novērojams paaugstināts aknu vai žultspūšļa bojājums salīdzinot ar kontrolēm. Interesanti, ka negatīvās kontroles aitām žultspūslī bija pat difūzāks un smagāks

iekaisums nekā ārstētajām grupām, kas varētu nozīmēt, ka smaga parazitoze pati par sevi rada zināmu aknu/žultsceļu kairinājumu. Katrā ziņā biškrēsliņa ekstrakta lietošana nesaistījās ar toksisku ietekmi uz aknām.

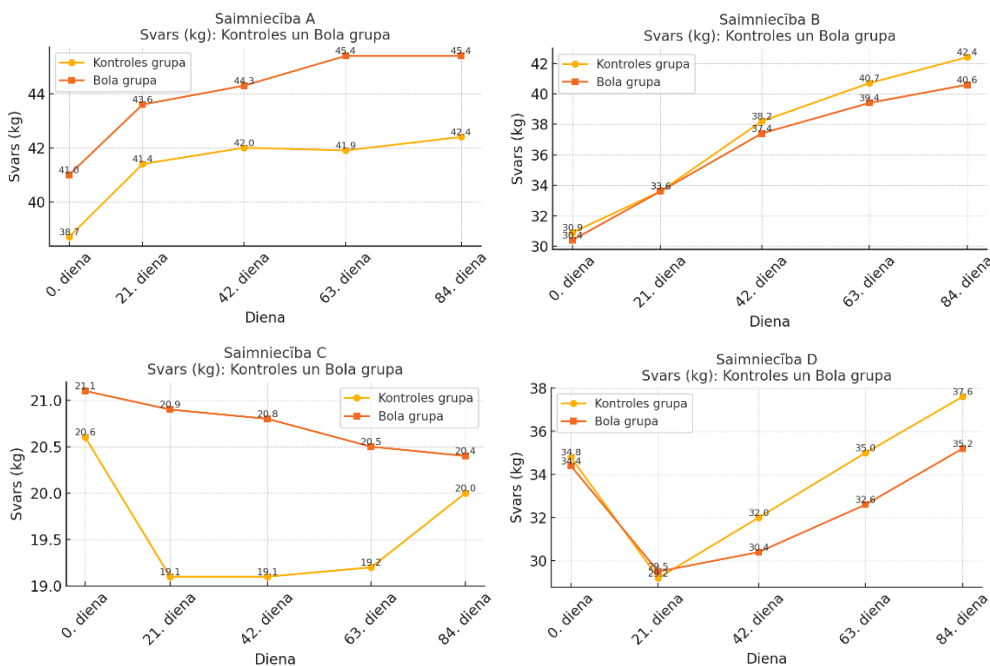
8.4. Lauka pētījuma fāze

8.4.1. Vispārīgie veselības rādītāji

Gan uzsākot lauka pētījumu, gan visa pētījuma laikā tika veiktas regulāras klīniskās izmeklēšanas procedūras, tai skaitā svara pieauguma kontrole (**Attēls 17**).

Saimniecībā A novēroja pakāpenisku svara pieaugumu abām pētījuma grupām, bet bola grupas dzīvnieki uzrāda straujāku un noturīgāku svara pieaugumu, sasniedzot ~45,4 kg. Kontroles grupā svars pieauga nedaudz lēnāk, ar nelielu svārstību septembrī. Šie rezultāti var būt saistīti ar efektīvāku spēkbarības piebarošanu un labu ganību kvalitāti, kā arī iespējamu šķirnes ietekmi — pieļaujams, ka izmantotas labāk augošas gaļas tipa aitas. Saimniecībā B sākuma svars bija ievērojami zemāks (ap 30–31 kg), tomēr bija vērojams straujš pieaugums līdz 42,4 kg kontroles grupā. Bola grupai pieaugums bija lēzenāks, bet līdzīgs. Atšķirībā no A saimniecības, šeit kontroles grupa pārsniedza bola grupas svaru beigās. Tas arī var norādīt uz šķirņu atšķirībām, piemēram, gaļas šķirnes aitas un barības izmantošanas efektivitāti. Saimniecībā C abu dzīvnieku grupu svara līknes bija relatīvi līdzīgas, ar nelielu lejupejošu tendenci (īpaši kontroles grupā). Dzīvniekiem sākuma svars bija ~21 kg, bet līdz 20.11. tas samazinājās. Tas norāda uz iespējamiem ierobežojumiem barības pieejamībā, sliktāku ganību zāli vai to, ka dzīvnieki var būt sasnieguši vecumu, kurā augšana palēninās. Saimniecībā D tika novērots ļoti dinamisks svara pieaugums, īpaši kontroles grupai, kas pieauga no ~30,9 kg līdz 42,4 kg. Bola grupai pieaugums bija nedaudz lēnāks. Salīdzinot ar pārējām saimniecībām, šeit redzams vislielākais svara lēciena — iespējams, to ietekmējusi intensīva barošana ar spēkbarību vai ļoti labvēlīgi apstākļi ganībās.

17. attēls. Svara pieaugums kontroles un bola grupām četrās saimniecībās.

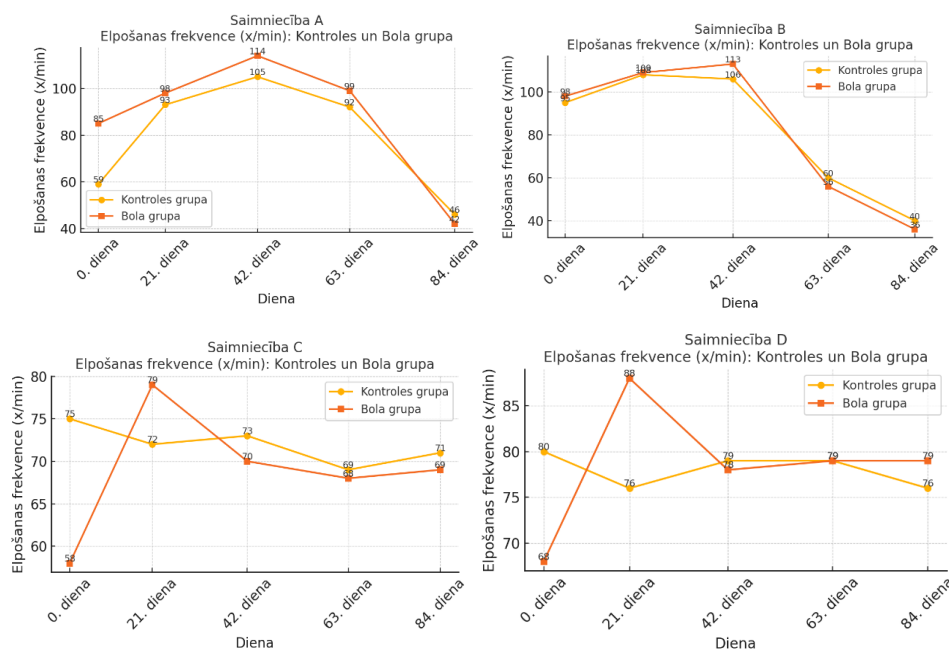


Svara pieaugums ir atkarīgs no vairākiem faktoriem, piemēram, aitu šķirnes – dažas šķirnes aug ātrāk, citas lēnāk. Noteicošs faktors ir dzīvnieka vecums. Vairums dzīvnieku bija no 6 mēnešu vecuma, kad pieauguma temps var sākt samazināties. Jāatzīmē ganību kvalitāte – nabadzīga zāle vasaras beigās var ierobežot pieaugumu un spēkbarības izbarošana – tās daudzums un sastāvs tieši ietekmē rezultātus. Šie faktori variēja starp saimniecībām.

Normāla elpošanas frekvence aitām miera stāvoklī ir aptuveni 15–30 elpas minūtē. Jebkura mērījumu pārsniegšana norāda uz fizioloģisku stresu, vides ietekmi, termoregulācijas grūtībām vai slimību simptomiem. Visiem mērījumiem novēroti ievērojami augstāki rādītāji, tāpēc ir svarīgi izvērtēt iespējamus iemeslus.

Saimniecībā A elpošanas frekvence sākotnējā izmeklēšanas reizē vidēji ar 59 x/min un sasniedz maksimumu 105x/min atkārtotā izmeklēšanas reizē, tad pakāpeniski samazinās līdz 46 x/min (**Attēls 18**). Saimniecībā B elpošanas frekvence aitām iekļaujas 95–113 x/min diapazonā, arī ievērojami pārsniedzot normu. Abām grupām vērojama līdzīga likne ar maksimālām vērtībām augustā-septembrī un strauju kritumu līdz novembrim. Saimniecībā C elpošanas frekvence aitām ir augsta visu periodu (92–114 x/min), bet samazinās līdz 42–46 reizēm minūtē oktobrī. Kopumā šie rādītāji ir ļoti augsti un pārsniedz normu ~3x. Saimniecībā D elpošanas frekvence aitām ir no 75–58 x/min (jūlijs–novembris), kas ir nedaudz zemāka nekā citās saimniecībās. Šeit rādītāji, lai gan virs normas, ir ievērojami tuvāk fizioloģiski pieļaujamam līmenim. Iespējamie ietekmējošie faktori ir augstas gaisa temperatūras vasaras vidū, kad elpošana pastiprinās, lai dzesētu ķermeni. Iespējams, dzīvnieki tika mērīti pēc fiziskas slodzes vai tiešos saules staros. Saspringti apstākļi, pārbīvētība vai stress no procedūrām varētu ietekmēt izmaiņas mērījumos.

18. attēls. Elpošanas frekvences izmaiņas pētījuma laikā lauka fāzē.

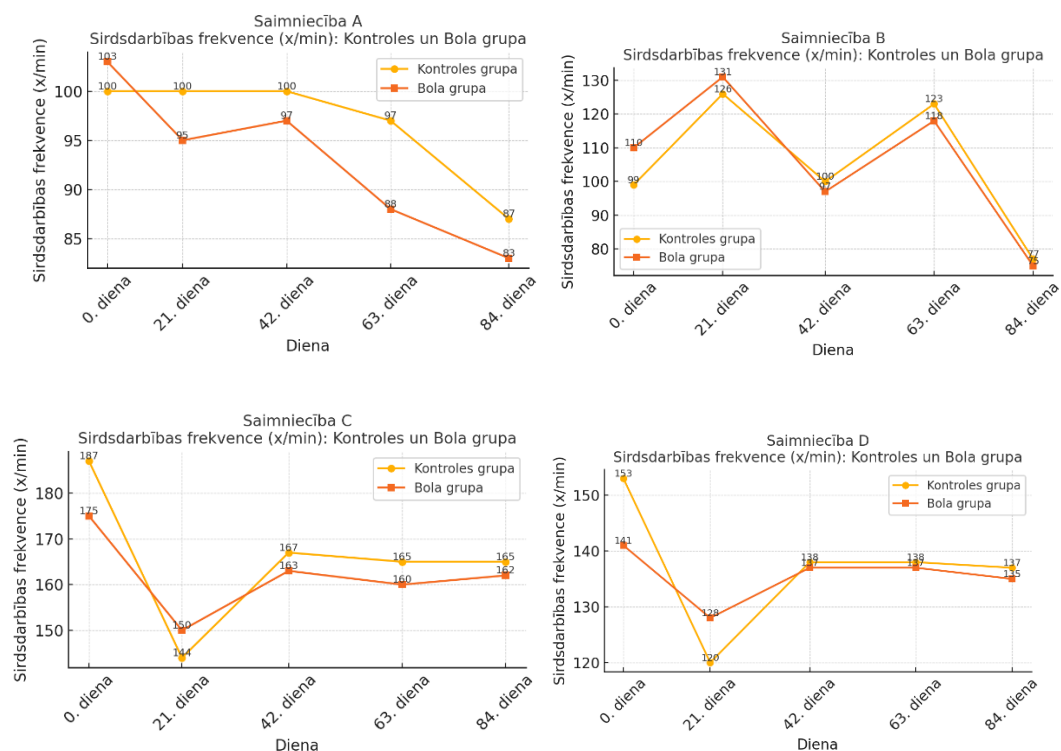


Normāla sirdsdarbības frekvence aitām miera stāvoklī ir aptuveni 60–80 reizes minūtē. Mērījumi, kas pārsniedz šo robežu, liecina par stresu, fizisku slodzi, vides ietekmi vai dažādām patoloģijām, kas saistītas ar infekcijas, invāzijas slimībām.

Saimniecībā A sirdsdarbības frekvence svārstās no 99 līdz 131 x/min, kas ir krietni virs normas. Visaugstākās frekvences redzamas 3.izmeklējuma reizē (bola grupa — 131x/min), pēc tam seko mērens kritums. Saimniecībā B frekvence svārstās starp 141–153 x/min (kontroles grupā pat virs 150 x/min). Rādītāji pārsniedz normu visā periodā un ir augsti. Iespējamie iemesli, kas visticamāk ir saistīti ar augstajām sirdsdarbības frekvencēm ir karstums jūlijā–augustā, stresa situācija mērījumu laikā (tveršana, pārvietošana). Saimniecībā C vērojams stabils samazinājums: no 103 uz 83 x/min (bola grupa), kas tuvojas normai, bet kontroles grupā saglabājas 87 līdz 100 x/min. Iespējamie faktori ir līdzīgi kā iepriekšējās saimniecībās, bet šajā saimniecībā vērojama neliela pozitīva dinamika, iespējams, dzīvnieki pielāgojas veiktajām manipulācijām, kā arī laikapstākļi izmeklējuma brīdī bija vēsāki un nebija jāizmeklē tiešos saules staros. Saimniecībā D ir novērojama ļoti augsta sirdsdarbība – 175–187 x/min, pēc tam stabilizējas ~160 x/min. Šajā saimniecībā novēro visaugstākos rādītājus (**Attēls 19**).

Iespējamie cēloņi varētu būt, ka mērījumi tika veikti nekavējoties pēc dzīvnieku ķeršanas, kā arī dzīvnieki pirms izmeklējuma atradās šaurā, pārbļīvētā nojumē, kā arī iespējama lielāka jutība uz vidi un cilvēku klātbūtni.

19. attēls Sirdsdarbības frekvences izmaiņas pētījuma laikā lauka fāzē.



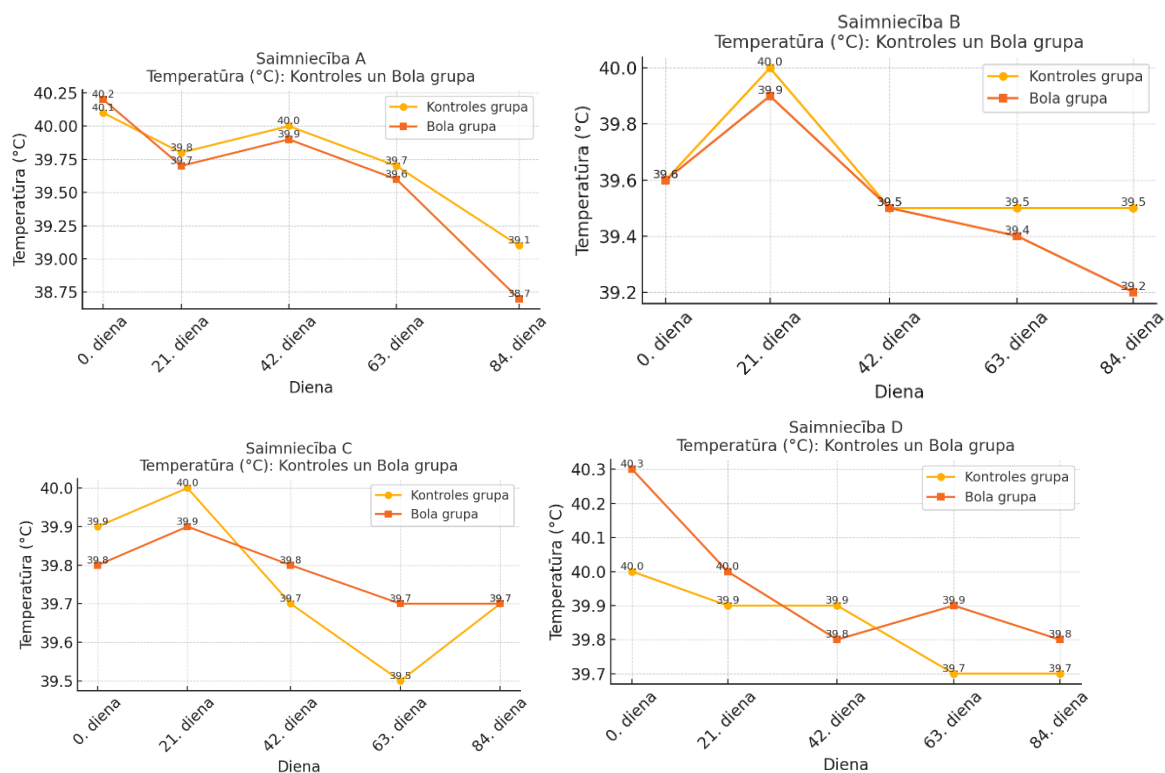
Par fizioloģiski normālu aitū ķermeņa temperatūru uzskata 38,5–39,5 °C. Vērtības virs šīs robežas norāda uz hipertermiju, ko var izraisīt, piem., karstuma stress, infekcijas (iekaisuma procesi), fiziska slodze, stresa reakcijas (noķeršana, pārvietošana) (**Attēls 20**).

A saimniecībā rektālā ķermeņa temperatūra aitām visā periodā ir virs normas (no 39,7 līdz 40,3 °C). Bola grupai sākotnēji augstāka temperatūra (40,3 °C), kas vēlāk normalizējas līdz ~39,8 °C. Iespējamie faktori varētu būt karstuma periods jūlija beigās – augsta gaisa temperatūra, dzīvnieki tika izmeklēti tūlīt pēc pārvietošanas, ķeršanas. Saimniecībā B sākumā temperatūra svārstījās robežās (39,6–40 °C), bet līdz rudenim tās pakāpeniski samazinās, iekļaujoties normas robežās. Bola grupai temperatūra zemāka nekā kontroles grupā no izmeklējumiem pētījuma beigās. Iespējamie cēloņi varētu būt labāka termoregulācija rudenī, kas var būt saistīts ar nedaudz vēsāku laiku, kā arī dzīvnieki pieraduši pie veiktajām manipulācijām. Saimniecībā C vērojama klasiskā hipertermijas dinamika — sākumā

~40,2–40,0 °C, rudenī nokrīt līdz 38,7–39,1 °C. Kontroles grupa novembrī iekļaujas normas robežās (39,1 °C), kā arī bola grupā vērojama normāla ķermeņa temperatūra (38,7 °C). Saimniecībā D visā periodā aitām novēro augstas rektālās ķermeņa temperatūras, arī pēdējā izmeklēšanas laikā, kaut citās saimniecībās temperatūras salīdzinoši kļūst zemākas. Viens no būtiskākajiem faktoriem augstām temperatūrām šajās saimniecībās ir dzīvnieku turēšana mazā nojumē, kur ir dzīvnieku pārbļīvētība, līdz ar to dzīvniekiem novēro paaugstinātus stresa apstākļus, kā arī to varēja novērot pie elpošanas un sirdsdarbības frekvenču mērījumiem.

Papildus visās saimniecībās aitām klīniskās izmeklēšanas laikā apsekoja gļotādu krāsu konjunktīvā, kura normā ir sārti bāla, kā arī novērtēja vai nav kādas izmaiņas fēcēs, piem., diareja un vai nenovēro kādas citas novirzes no normas klīniskajā stāvoklī. Visās saimniecībās izmeklējot gļotādas krāsu aitām, tās bija normas robežās vai atsevišķās reizēs sātākas nekā norma, kas ir arī izskaidrojams ar paaugstināto stresu dzīvniekiem un karsto vasaras periodu. Saimniecībā B augusta izmeklēšanas laikā aitām novēroja balas krāsas konjunktīvas, kā arī atsevišķām aitām tika konstatēta pažokles jeb submandibulārā tūska, kas liecina par augstu parazitāru invāziju dzīvniekiem. Balstoties uz klīnisko ainu un hematoloģiskajām atradnēm, tika pieņemts lēmums dzīvniekus attārpot.

20. attēls Ķermeņa temperatūras izmaiņas pētījuma laikā lauka fāzē.



8.4.2. Asins hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji

Lauka pētījuma daļā tika iesaistītas četras saimniecības. Katrā no šīm saimniecībām tika izveidotas divas grupas: eksperimentālā grupa, kurai intrarumiāli ievadīja, testējamo bolu, un kontroles grupa, kurai bols netika ievadīts. Katrā saimniecībā abas grupas visu vasaru tika turētas vienādos apstākļos. Sākot no jūlija, reizi mēnesī piecu mēnešu garumā tika ņemti asins paraugi, lai kontrolētu vispārējo veselības

stāvokli. Tika iegūti asins paraugi hematoloģiskajai izmeklēšanai, kā arī paraugi bioķīmisko rādītāju noteikšanai.

Eritrocītu daudzumu raksturojošie rādītāji, piemēram, hematokrīts, eritrocītu skaits un hemoglobīna koncentrācija, divās no pētījumā iesaistītajām saimniecībām (A un D) visa pētījuma garumā saglabājās normas intervālā (**Tabula 10 un 11**) vidēji bija 26,48% -35-41%. Savukārt pārējās divās saimniecībās atsevišķi no šiem rādītājiem bija samazināti (Tabulu Nr. 11 un 12). Piemēram, saimniecībā C hematokrīta līmenis bija pazemināts jau no paša pētījuma sākuma vidēji 22,64 % un saglabājās zems vidēji 24,93 % līdz pat pētījuma noslēgumam (**skatīt tabulā Nr 13.**). HTC vidējās vērtības šajā saimniecībā pētījumā iekļautajām aitām piecu mēnešu laikā svārstījās robežās no vidēji 22 % līdz 25 %. Turklāt šajā saimniecībā jūlija un augusta mēnešos tika novērots arī zem normas esoša hemoglobīna koncentrācija, aptuveni 8 g/dl.

Tabula 10. Hematoloģisko rādītāju kopsavilkums vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze pētījuma grupā “Ar bolu” un kontroles grupā “Kontrole” saimniecībā A.

			RBC (10 ¹² /l)	HCT (%)	HBG (g/dl)	WBC (10 ⁹ /l)	Eozinofīlie (10 ⁹ /l)	Monocīti (10 ⁹ /l)	Limfocīti (10 ⁹ /l)
Jūlijs	Ar bolu	VID	11,49	34,44	12,29	8,72	0,10	0,35	4,04
		St. Nov.	0,92	2,74	0,80	2,03	0,13	0,14	1,58
	Kontrole	VID	11,48	34,67	12,28	9,39	0,10	0,37	4,96
		St. Nov.	0,94	1,95	0,82	1,64	0,09	0,10	1,19
Augusts	Ar bolu	VID	10,572	31,87	11,26	8,49	0,2323	0,2154	3,1813
		St. Nov.	0,93	3,04	0,86	1,68	0,13	0,12	1,40
	Kontrole	VID	10,76	32,74	11,53	8,72	0,22	0,32	3,60
		St. Nov.	0,79	2,36	0,75	1,91	0,19	0,12	1,13
Septembris	Ar bolu	VID	9,96	30,68	10,77	7,64	0,26	0,21	2,83
		St. Nov.	0,98	3,08	0,94	2,36	0,19	0,14	1,52
	Kontrole	VID	10,02	30,66	10,78	8,54	0,22	0,42	3,40
		St. Nov.	0,68	2,13	0,77	1,91	0,24	0,28	1,09
Oktobris	Ar bolu	VID	9,17	27,47	10,54	7,90	0,12	0,25	3,42
		St. Nov.	0,81	2,96	1,00	1,79	0,09	0,13	1,18
	Kontrole	VID	9,02	27,29	10,35	8,29	0,17	0,18	4,02
		St. Nov.	0,77	3,18	1,11	1,94	0,19	0,09	1,79
Novembris	Ar bolu	VID	9,15	26,48	10,09	8,65	0,61	0,18	3,52
		St. Nov.	0,65	3,10	1,16	1,31	0,53	0,07	1,14
	Kontrole	VID	9,08	27,05	10,15	9,20	0,56	0,23	4,02
		St. Nov.	1,15	4,21	1,55	1,98	0,64	0,17	1,68
		Normas	6,3-14,6	26-46	9,1-16	4,1-12,1	0-4,6	0-0,5	1,3-9,1

Saimniecībā B eritrocītus raksturojošie rādītāji — eritrocītu skaits, hematokrīts un hemoglobīna līmenis — pētījuma sākumā gan eksperimentālajās, gan kontroles grupas aitām atradās normas robežās (**Tabula 12**). Tomēr augusta mēnesī šie rādītāji ievērojami samazinājās: eritrocītu skaits nokritās līdz vidēji 5,22 (10¹²/l), hematokrīts līdz vidēji 16,5% un hemoglobīna līmenis līdz vidēji 5,36 g/dl, kas tika saistīts ar izteikti intensīvu parazitārās invāzijas uzliesmojumu. Tādēļ abām grupām tika veikta

medikamentoza pretparazitārā apstrāde. Pēc iejaukšanās, sākot ar septembri un turpmākajos mēnešos (oktobrī un novembrī), rādītāji atgriezās normas robežās attiecīgi— eritrocītu skaits vidēji 10,17 – 10,89 ($10^{12}/l$), hematokrīts vidēji 29,50 – 33,37 % un hemoglobīns 11,07 -12,43 (g/dl) un bija līdzīgi abās pētījuma grupās grupās.

Apkopojot visu saimniecību hematokrīta rezultātus var secināt kā ganību perioda vidusdaļā no augusta līdz oktobrim vērojama tendence hematokrītam samazināties un pēc tam vēlā rudenī novembrī normalizēties (**Tabula 12**). Šie rezultāti skaidrojami un saistāmi ar ganību invāzijas pakāpes izmaiņām. Pavasarī tā ir zema un, vasarā ganoties ganībās, parazitārais slogs pieaug un, rudenī samazinoties ārējai gaisa temperatūrai, ganību invāzijas intensitāte samazinās, jo zemā gaisa temperatūra negatīvi ietekmē parazītu dzīves ciklu un samazinās parazītu slogs uz dzīvniekiem.

11. Tabula. Hematoloģisko rādītāju kopsavilkums vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze pētījuma grupā “Ar bolu” un kontroles grupā “Kontrole” saimniecībā B.

			RBC ($10^{12}/l$)	HCT (%)	HBG (g/dl)	WBC ($10^9/l$)	Eozinofīlie ($10^9/l$)	Monocīti ($10^9/l$)	Limfocīti ($10^9/l$)
Jūlijs	Ar bolu	VID	10,28	32,11	11,00	8,23	0,15	0,49	4,05
		St. Nov.	0,57	2,16	0,69	2,55	0,10	0,22	1,28
	Kontrole	VID	10,36	32,71	11,29	7,78	0,14	0,62	4,12
		St. Nov.	0,60	2,46	0,70	2,24	0,12	0,31	1,34
Augusts	Ar bolu	VID	5,22	16,15	5,39	5,70	0,11	0,24	2,83
		St. Nov.	1,15	3,29	1,11	0,84	0,08	0,12	0,77
	Kontrole	VID	5,76	17,24	5,96	5,54	0,06	0,22	2,87
		St. Nov.	1,52	4,60	1,59	1,42	0,07	0,15	0,63
Septembris	Ar bolu	VID	9,76	28,65	10,52	9,19	0,67	0,44	4,32
		St. Nov.	0,93	2,29	0,70	2,50	0,64	0,18	1,42
	Kontrole	VID	10,04	28,75	10,84	7,22	0,38	0,33	3,54
		St. Nov.	1,07	3,28	1,36	1,43	0,31	0,17	0,89
Oktobris	Ar bolu	VID	10,17	29,50	11,07	7,86	0,34	0,46	4,60
		St. Nov.	0,88	1,63	0,56	1,72	0,27	0,16	1,26
	Kontrole	VID	10,18	30,03	11,38	8,52	0,31	0,44	4,54
		St. Nov.	1,30	2,82	1,17	2,47	0,25	0,18	1,97
Novembris	Ar bolu	VID	10,32	30,79	11,42	7,22	0,14	0,36	3,55
		St. Nov.	1,20	2,39	1,03	1,52	0,11	0,14	1,02
	Kontrole	VID	10,89	33,37	12,43	8,10	0,12	0,68	3,87
		St. Nov.	1,15	2,56	1,02	2,18	0,18	1,23	1,01
		Normas	6,3-14,6	26-46	9,1-16	4,1-12,1	0-4,6	0-0,5	1,3-9,1

11.Tabula. Hematoloģisko rādītāju kopsavilkums vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze pētījuma grupā “Ar bolu” un kontroles grupā “Kontrole” saimniecībā C.

			RBC (1012/l)	HCT (%)	HBG (g/dl)	WBC (109/l)	Eozinofīlie (109/l)	Monocīti (109/l)	Limfocīti (109/l)
Jūlijs	Ar bolu	VID	9,09	26,20	9,37	7,48	0,07	0,20	4,04
		st dev	1,65	4,01	1,59	2,17	0,07	0,11	1,77
	Kontrole	VID	7,58	22,64	8,09	7,98	0,17	0,23	4,01
		st dev	1,49	5,24	1,71	1,36	0,27	0,13	0,73
Augusts	Ar bolu	VID	8,66	24,21	8,69	9,87	0,14	0,26	4,19
		st dev	2,29	7,02	2,56	1,93	0,13	0,14	1,49
	Kontrole	VID	8,15	24,32	8,60	9,75	0,27	0,33	2,83
		st dev	2,00	6,22	2,23	2,10	0,39	0,27	1,46
Septembris	Ar bolu	VID	8,88	23,48	9,22	8,98	0,15	0,20	4,32
		st dev	2,07	6,96	2,80	2,21	0,22	0,10	1,16
	Kontrole	VID	8,41	24,21	9,31	8,57	0,26	0,22	4,10
		st dev	1,26	3,60	1,37	1,11	0,18	0,10	0,42
Oktobris	Ar bolu	VID	9,65	24,38	9,67	9,95	0,12	0,39	4,88
		st dev	2,15	7,48	2,87	2,14	0,08	0,30	1,84
	Kontrole	VID	9,01	24,60	9,53	9,37	0,44	0,23	4,38
		st dev	1,53	4,98	1,74	3,26	0,43	0,14	1,78
Novembris	Ar bolu	VID	10,16	24,42	10,08	8,24	0,08	0,27	4,65
		st dev	1,76	6,52	2,56	2,01	0,11	0,16	1,79
	Kontrole	VID	9,55	24,93	10,07	8,12	0,17	0,24	3,58
		st dev	0,82	4,85	1,62	3,00	0,22	0,21	2,10
	Normas	Normas	6,3-14,6	26-46	9,1-16	4,1-12,1	0-4,6	0-0,5	1,3-9,1

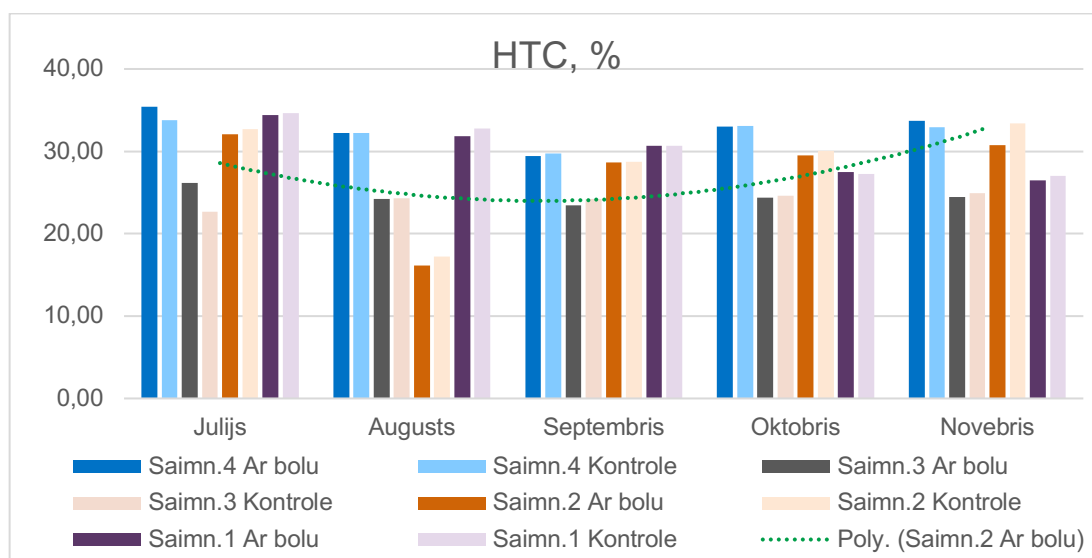
Hematoloģiskās izmeklēšanas laikā noteikti balto asins šūnu rādītāji, kas atspoguļo iespējamu iekaisuma procesu — kopējais leukocītu skaits (WBC), eozinofīlo leukocītu skaits, kā arī monocītu un limfocītu skaits. Visa pētījuma garumā visās iesaistītajās saimniecībās gan eksperimentālajā, gan kontroles grupā minētie iekaisuma rādītāji saglabājās normas robežās. Šie rezultāti liecina, ka testētajam bolam nav negatīvas ietekmes uz organisma iekaisuma rādītājiem un tas nerada iekaisuma reakcijas dzīvnieku organismā.

Tabula 10. Hematoloģisko rādītāju kopsavilkums vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze pētījuma grupā “Ar bolu” un kontroles grupā “Kontrole” saimniecībā D.

			RBC (10 ¹² /l)	HCT (%)	HBG (g/dl)	WBC (10 ⁹ /l)	Eozinofīlie (10 ⁹ /l)	Monocīti (10 ⁹ /l)	Limfocīti (10 ⁹ /l)
Jūlijs	Ar bolu	VID	11,13	35,41	12,19	8,31	0,25	0,25	5,09
		St. Nov.	0,85	2,67	0,78	1,50	0,22	0,11	1,25
	Kontrole	VID	10,62	33,81	11,69	7,60	0,29	0,22	4,64
		St. Nov.	0,70	2,57	0,71	1,42	0,28	0,13	1,21
Augusts	Ar bolu	VID	10,33	32,21	11,15	6,94	0,18	0,15	3,92
		St. Nov.	0,68	2,12	0,69	1,02	0,15	0,09	0,68
	Kontrole	VID	10,26	32,24	11,17	7,42	0,25	0,23	4,06
		St. Nov.	0,58	1,85	0,60	1,71	0,22	0,09	0,97
Septembris	Ar bolu	VID	9,79	29,43	11,22	7,63	0,17	0,29	3,89
		St. Nov.	0,80	2,16	0,77	1,08	0,15	0,16	0,51
	Kontrole	VID	9,85	29,77	11,43	7,80	0,16	0,32	4,46
		St. Nov.	0,60	2,05	0,71	1,28	0,11	0,12	1,40
Oktobris	Ar bolu	VID	10,84	32,97	12,53	7,94	0,15	0,20	4,09
		St. Nov.	1,02	2,87	1,00	0,98	0,11	0,12	0,84
	Kontrole	VID	10,77	33,06	12,40	8,21	0,16	0,23	4,81
		St. Nov.	0,45	1,72	0,50	1,54	0,17	0,17	1,01
Novembris	Ar bolu	VID	11,35	33,69	13,01	7,89	0,15	0,23	4,24
		St. Nov.	0,82	2,30	0,93	1,41	0,13	0,12	1,42
	Kontrole	VID	11,06	32,91	12,80	7,64	0,11	0,13	4,40
		St. Nov.	0,39	1,04	0,43	1,66	0,11	0,09	1,23
		Normas	6,3-14,6	26-46	9,1-16	4,1-12,1	0-4,6	0-0,5	1,3-9,1

“Hematoloģisko rādītāju vidējās vērtības $\pm$ standartnovirze pētījuma grupā “Ar bolu” un kontroles grupā “Kontrole” saimniecībā A -D” (Attēls 21).

Attēls 21. Hematokrīta līmeņa vizuāls attēlojums pētījuma saimniecību abās pētījuma grupās pa mēnešiem.



Analizējot asins seruma bioķīmiskos rādītājus, nevienā no pētījumā iesaistītajām saimniecībām, ne eksperimentālajā, ne kontroles grupā, netika novērotas izteiktas novirzes no normas intervāliem. Lielākā daļa bioķīmisko rādītāju saglabājās normas robežās visa pētījuma garumā. Tomēr ir jāizceļ atsevišķas izmaiņas. Piemēram, vairākās saimniecībās kopējā proteīna līmenis bija tuvu normas apakšējai robežai vai zem tās. Šo novērojumu varētu skaidrot gan ar iespējamu parazitārās invāzijas klātbūtni, gan ar nepietiekamu ganību kvalitāti un zemu proteīnu saturošo augu īpatsvaru zemenī. Vēl vienā no saimniecībām tika konstatēts pazemināts nātrija līmenis serumā, kas novērots abās grupās. Tas norāda uz iespējamu nepietiekamu sāls pieejamību dzīvnieku ikdienas barības devā. Visās saimniecībās tika novērots nedaudz virs normas esošs gammaglutamiltransferāzes (GGT) līmenis, taču tas bija līdzīgs starp visām grupām un saimniecībām, kā arī saglabājās nemainīgs visā piecu mēnešu pētījuma periodā. Nelielo GGT paaugstinājumu iespējams saistīt ar barības uzņemšanu, un tas joprojām var tikt uzskatīts par normas robežās esošu rādītāju.

Seruma bioķīmisko rādītāju izmaiņas netiek tieši saistītas ar testējamā bola iedarbību. Tās, visticamāk, izskaidrojamas ar ēdināšanas īpatnībām, parazitārās slodzes atšķirībām, vides apstākļiem, kā arī iespējamiem stresa faktoriem.

8.4.3. Parazitoloģiskie rezultāti

Koproloģisko paraugu izmeklēšana tika veikta ar MacMaster metodi, kā rezultātā tika iegūts rezultāts par parazitisko olu/oocistu skaitu 1 g/fekālijū. Vēlāk iegūtie rezultāti tika izmantoti, lai aprēķinātu olu/oocistu skaita samazināšanos (%) – FECRT / FOCRT (**Tabula 14**).

Rezultātu interpretācija: ja, veicot olu/oocistu skaita samazināšanas testu, rezultāts ir 95% un vairāk, tad tas nozīmē, ka izmantotais līdzeklis (šajā gadījumā *T.vulgare* lapu liofilizāts) ir efektīvs. Ja rezultāts ir mazāk par 95% - efekts ir neliels vai tā nav.

Visās saimniecībās tika diagnosticētas gremošanas strongilīdu (*Trichostrongylidae*), *Eimeria* spp., *Strongyloides* spp. invāzijas. Savukārt *Moniezia* spp. invāzijas – saimniecībās A,B,C; *Trichuris* spp. – A,C,D un *Capillaria* spp. tikai C saimniecībā.

Galvenais pētījuma mērķis bija noskaidrot *T.vulgare* lapu liofilizāta bolu iedarbību uz gremošanas sistēmas strongilīdiem. Olu samazināšanās testa rezultāti attēloti tabula Nr.1. Divās saimniecībās (A,B) efektu nenovēro, savukārt D saimniecībā efektivitāte ir minimāls. Saimniecībā C salīdzinot ar citām – efektivitāte ir augstāka, bet nesasniedz nepieciešamo līmeni (vismaz 95%), lai apgalvotu, ka līdzeklis ir efektīvs un var aizstāt sintētiskās attārpošanas zāles.

Tabula Nr.14. Olu samazināšanas testa (FECRT) rezultāti.

Gremošanas strongilīdi				
Saimniecības	A	B	C	D
Bolu grupa (FECR %)	0	0	63,9	9
Kontroles grupa (FECR %)	0	0	47,7	31,5

Tā kā efektivitāte gremošanas strongilīdu invāziju gadījumā netika novērota, nolēmām izpētīt *T.vulgare* lapu liofilizāta efektivitāti uz *Eimeria* spp. (**Tabula 15**).

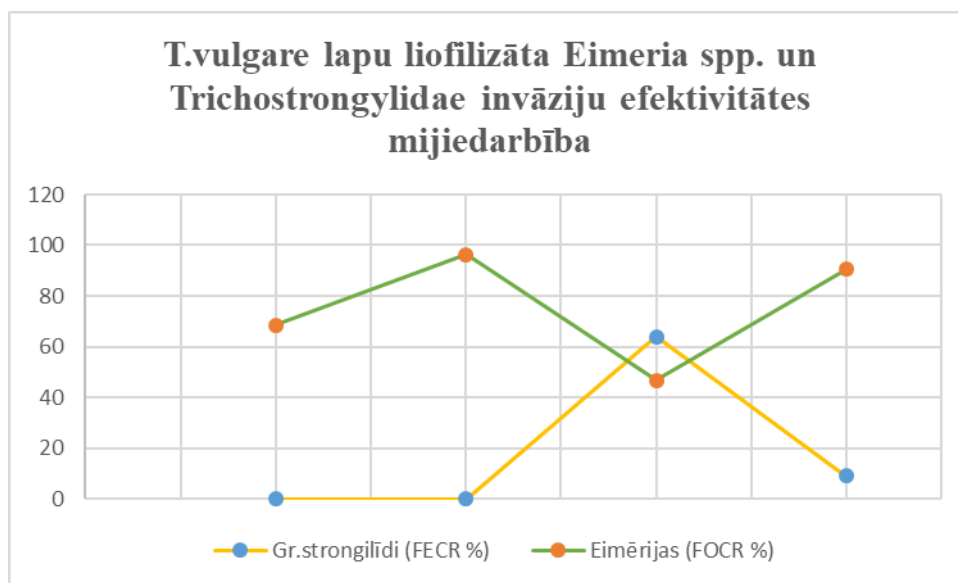
Tabula Nr.15 Oocistu samazināšanās testa (FOCRT) rezultāti

Eimērijas				
Saimniecības	A	B	C	D
Bolu grupa (FOCR %)	68,6	96,2	46,6	90,4
Kontroles grupa (FOCR %)	64,5	96,9	74,5	69,7

Visaugstākā efektivitāte un augstākie FOCR rezultāti tika novēroti divās saimniecībās – B (96,2%) un D (90,4%). Pārējām divām saimniecībām - A,C efektivitāte ir krietni zemāka. Ņemot vērā rezultātus, var secināt, ka *T.vulgare* lapu liofilizāta boliem ir augstāka iedarbība uz *Eimeria* spp. invāzijām nekā uz gremošanas strongilīdu invāzijām.

Pētījuma laikā novērojām savstarpējo korelāciju starp *Eimeria* spp. un gremošanas strongilīdu invāzijām (**Attēls 22**). Saimniecībās, kurās nekonstatē līdzekļa efektivitāti pret gremošanas strongilīdiem (A,B,D), novēro augstu efektivitāti pret *Eimeria* spp. Savukārt saimniecībā C – novēro augstāku efektivitāti pret gremošanas strongilīdiem nekā *Eimeria* spp.

Attēls Nr. 22. *T.vulgare* lapu liofilizāta *Eimeria* spp. un *Trichostrongylidae* infāciju efektivitātes mijiedarbība.



Apkopojot rezultātus var secināt, ka šīs koncentrācijas *T.vulgare* lapu liofilizāts uzrāda zemas efektivitātes rādītājus gremošanas strongilīdu invāziju gadījumā. Ir nepieciešams veikt papildus, līdzīgus pētījumus, kuros tiktu, pētīti citas koncentrācijas, eksperimenta laiks.

8.4.4. Bakterioloģiskie rezultāti

Lauka pētījuma daļā visās saimniecībās aitām tika ņemti bakterioloģiskie paraugi pētījumu uzsākot un atkārtoti katru mēnesi līdz pētījuma beigām. Kopumā būtiskas atradnes netika novērotas. Klostrīdiju konstatēšana bija zema un netika novērotas nekādas korelācijas ar projekta laiku vai individuālām dzīvnieka īpatnībām. Pamatā klostrīdijas tika konstatētas pētījuma beigās, kas vairāk liecina par sezonālās īpatnībām.

9. PUBLICITĀTE.

Projekta laikā tika veikta plaša projekta un iegūto datu publicitātes pasākumi:

1. Populārzinātniska publicitāte mēdijos, sociālajos mēdijos, interneta vietnēs:
 - 1.1.08.09.2022. LBTU mājas lapa. Latvijas tradicionālā ārstniecības auga biškrēsliņa lapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāro kontroli.
(<https://www.lbtu.lv/lv/projekti/apstiprinatie-projekti/2022/latvijas-tradicionala-arstniecibas-auga-biskreslina-lapu>) **Pielikums 3.**
 - 1.2.13/09/2022, LBTU mājas lapa. Meklē risinājumus parazītu ierobežošanai aitu ganāmpulkos
(<https://www.lbtu.lv/lv/raksts/2022-09-13/mekle-risinajumus-parazitu-ierobezosana-aitu-ganampulkos>) **Pielikums 4.**
 - 1.3.15.09.2022. Lauku tīkls. Meklē risinājumus parazītu ierobežošanai aitu ganāmpulkos
(<https://laukutikls.lv/nozares/lauku-telpa/raksti/mekle-risinajumus-parazitu-ierobezosana-aitu-ganampulkos>) **Pielikums 5.**
 - 1.4. Televīzijas sižets “TV-soli priekšā” 12.12.2023
https://xtv.lv/rigatv24/video/3X7Q4ArKNAm-12_12_2023_soli_prieksa
 - 1.5.29.07.2024, Lopkopība.eu. Latvijas tradicionālā ārstniecības auga biškrēsliņlapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāro kontroli
(<https://www.lopkopiba.eu/post/latvijas-tradicionala-arstniecibas-auga-biskreslinlapu-ekstrakta-zalu-formu-izstrade-un-ta-ietekme>) **Pielikums 6.**
 - 1.6.25.03.2024. LZP mājas lapa. Biškrēsliņa ekstraktu saturošs līdzeklis ar pretparazitāru ietekmi aitām:
(<https://lza.lv/images/nodalas/04-Lauks-mez/2024/LZA%20Biskreslinu%20boli.pptx%20Dace%20RSU.pdf>) **Pielikums 7.**
 - 1.7.16.08.2024 Lopkopība.eu. Biškrēsliņš aitu gremošanas kanāla mikrobioma un pretparazitārai kontrolei
(<https://www.lopkopiba.eu/post/biskreslins-aitu-gremosanas-kanala-mikrobioma-un-pretparazitarai-kontrolei>) **Pielikums 8.**
 - 1.8.10.07.2024. Lopkopība.eu. Latvijas tradicionālā ārstniecības auga biškrēsliņa lapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāro kontroli **Pielikums 9.**
 - 1.9. Augusts 2024. Žurnāls Saimnieks LV. Nr.7(241), 108.;110.lpp. ISSN 1691-1598. “Biškrēsliņš aitu gremošanas kanāla mikrobioma un pretparazitārai kontrolei”. **Pielikums 10.**
 - 1.10. 20.05.2025. Seminārs vetārstiem, aitkopjiem, studentiem un citiem interesentiem.
(<https://www.lopkopiba.eu/post/seminars-vetarstiem-aitkopjiem-studentiem>) **Pielikums 11.**
 - 1.11. 26.06.2025. Lopkopība.eu . Notikusi projekta “Latvijas tradicionālā ārstniecības auga biškrēsliņa lapu ekstrakta zāļu formu izstrāde un tā ietekme uz aitu gremošanas kanāla mikrobiomu un pretparazitāru kontroli”
(<https://www.lopkopiba.eu/post/notikusi-projekta-nosleguma-lauka-diena-saimnieciba-mikaitas>) **Pielikums 12.**

2. Anonīmi recenzētas, Q1-Q2 Zinātniskās publikācijas, kas indeksētas *Scopus/Web of science* datu bāzēs :

- 2.1.Šukele R, Lauberte L, Kovalcuka L, Logviss K, Bārzdiņa A, Brangule A, Horváth ZM, Bandere D. Chemical Profiling and Antioxidant Activity of *Tanacetum vulgare* L. Wild-Growing in Latvia. *Plants* (Basel). 2023 May 12;12(10):1968. doi: **10.3390/plants12101968**. PMID: 37653885; PMCID: PMC10221018.
- 2.2.Teterovska R, Sile I, Paulausks A, Kovalcuka L, Koka R, Mauriņa B, Bandere D. The Antioxidant Activity of Wild-Growing Plants Containing Phenolic Compounds in Latvia. *Plants* (Basel). 2023 Dec 8;12(24):4108. doi: **10.3390/plants12244108**. PMID: 38140435; PMCID: PMC10748313.
- 2.3.Aīda Vanaga, Dace Keidāne, Alīna Kļaviņa, Ivars Lūsis, Aija Mālniece, Dace Bandere, Renāte Teterovska, Ance Bārzdiņa, Oxana Brante, Konstantins Logviss, Oskars Radziņš, and Līga Kovaļčuka "In vivo Antiparasitic Evaluation of *Tanacetum vulgare* Lyophilizate Delivered via Intraruminal Bolus and Granules for Gastrointestinal Nematode Control in Sheep (publikācija apstiprināta, **Pielikums 13**).
(sagatavošas procesā vēl 3 publikācijas)

3. Posteru vai mutisko prezentāciju uzstāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

- 3.1. 09.02.2024. Rīga, **Latvija**, Inovatīva veterinārā zāļu forma, izmantojot karstas kausēšanas ekstrūzijas metodi. Pretparazitārā fitolīdzekļa izstrāde ar biškrēsliņa (*Tanacetum vulgare*) ekstraktu (mutiska prezentācija) **Pielikums 14**.
- 3.2. 26.-30.08.2024 Vroclava, **Polija**, Current Parasitology Multi-Disciplinarity EMOP XIV (Polish Parasitological Society and the European Federation of Parasitologists) Antiparasitic effect of a tansy (*Tanacetum vulgare* L.) extract containing intraruminal bolus and pellets against gastrointestinal nematodes (*Trichostrongylidae*) in sheep in-vivo (postera prezentācija) **Pielikums 15**.]
- 3.3. 26.-30.08.2024 Vroclava, **Polija**, Current Parasitology Multi-Disciplinarity EMOP XIV (Polish Parasitological Society and the European Federation of Parasitologists) Anticoccidial effect of *Tanacetum vulgare* extract lyophilizate in naturally infected lambs with *Eimeria* spp. (postera prezentācija) **Pielikums 16**.
- 3.4. 22.-23.11.2024 Jelgava, **Latvija**, Veterinārmedicīnas zinātnes aktualitātes 2024 (LBTU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvijas Veterinārārstu biedrība, Latvijas Veterināro zāļu lieltirgotavu asociācija) Biškrēsliņa liofilizātu saturošas jaunas zāļu formas izpēte (mutiskā prezentācija) **Pielikums 17**.
- 3.5. 4.-5.06.2025 Cluj-Napoca, **Rumānija**, ECSRHM conference 2025 (European College of Small Ruminant Health Management) Field-based antiparasitic activity of an intraruminal bolus containing tansy (*Tanacetum vulgare* L.) extract against *Trichostrongylidae* in sheep (postera prezentācija) **Pielikums 18**.
- 3.6. 4.-5.06.2025 Cluj-Napoca, **Rumānija**, ECSRHM conference 2025 (European College of Small Ruminant Health Management) Characterization of the fecal

microbiome of sheep after administration of *Tanacetum vulgare* L. extract (postera prezentācija) **Pielikums 19.**

3.7.4.-5.06.2025 Cluj-Napoca, **Rumānija**, ECSRHM conference 2025 (European College of Small Ruminant Health Management) Anticoccidial activity of intraruminal bolus containing *Tanacetum vulgare* L. extract against *Eimeria* spp. in lambs under field conditions (postera prezentācija) **Pielikums 20.**

3.8.12-13.06.2025. Rīga, **Latvija**, 47. Ziemeļvalstu veterināro patologu simpozījs. Safety and efficacy study for use of *Tanacetum vulgare* in sheep as a potential anthelmintic medication: histological assessment of digestive system (postera prezentācija) **Pielikums 21.**

4. Noslēguma semināri:

4.1.28.05.2025 Online seminārs, Zoom platforma, izmantojot SIA "Veterinārmedicīnas izglītības centra" platformu.

https://docs.google.com/document/d/1fGkTDD_Vy-yfEXh7lc0uHlnBbHxmNtkSiHlfnOQ79CE/edit?tab=t.0.

Reģistrēti dalībnieki: 220

4.2.19.06.2025 Lauka demonstrējumu seminārs SIA "Mikaitas" aitu fermā, sadarbībā ar ZS "Ceļmalas".

Reģistrēti dalībnieki: 42

5. Saņemtie apbalvojumi

Latvijas Zinātņu akadēmijas prezidenta Atzinības raksts par 2023. gada zinātnes sasniegumu "Latvijā izstrādāts biškrēsliņa ekstraktu saturošs līdzeklis ar pretparazītāru ietekmi aitām" **Pielikums 22.**

https://www.lza.lv/images/nodalas/04-Lauks-mez/2024/LMZN%20atskaite%20par%20strategijas%20uzdevumu%20izpildi_2023.pdf

10. PĒTĪJUMA SASNIEGTIE MĒRĶI

1. RSU FF sagatavots inovatīvs, kontrolētas izdales 3D printēts intraruminālais bols.
2. RSU FF sagatavots, pārbaudīts biškrēsliņa liofilizāts, iepildīts bolā un pārbaudīta tā šķīdība māklīgajā kuņģī.
3. LBTU VMF veikti *in-vitro* pētījumi par biškrēsliņa liofilizāta pretparazitāro ietekmi.
4. LBTU VMF veikti *in-vivo* izmēģinājumi aitām, ievadīti jaunizveidotie boli aitām eksperimentālos apstākļos un lauka apstākļos.
5. SIA “Mikaitas” un ZS “Ceļmalas” izaudzētas, sagatavotas 30 aitas eksperimentāliem apstākļiem. Iegūti parazitārie paraugi *in-vitro* pētījuma fāzei.
6. Partneru saimniecībās, nodrošināta dzīvnieku ieguve (sagatavotas 20 aitas katrā), audzēšana, kopšana, uzraudzība, analīžu veikšana, sagatavotas pētījuma grupas, kontrolēta uzraudzīta lauka pētījuma daļa. Nodrošināti apstākļi pētījuma veikšanai.
7. Partneru saimniecībās iegūti parazitārie paraugi *in-vitro* pētījuma fāzei.
8. Sagatavotas un publicētas:
 - i. 3 zinātniskas publikācijas,
 - ii. 11 publicitātes raksti,
 - iii. 8 presentācijas zinātniskajās konferencēs
 - iv. 2 semināri aitikopjiem, audzētājiem, veterinārārstiem
9. Iegūts Zinātņu akadēmijas apbalvojums.

12. SECINĀJUMI

1. **Bolusa tehnoloģija ar *Tanacetum vulgare* ekstraktu** ir daudzsološs risinājums ilgstošai aitū aizsardzībai pret parazītiem, apvienojot dabiskas vielas un kontrolētas izdalīšanās zāļu formu.
2. ***In-vitro* testos *Tanacetum vulgare* ekstrakts** uzrādīja ļoti augstu efektivitāti pret nematodēm (EHT >98%) visās koncentrācijās, tostarp arī zemākajās.
3. ***In-vivo* testos** biškrēsliņa ekstrakts būtiski neietekmēja aitū klīniskos, hematoloģiskos vai bioķīmiskos rādītājus, norādot uz tā drošumu.
4. Visefektīvākais **invāzijas samazinājums** tika novērots levamizola grupā, kam sekoja B bolu grupā – līdz 14. dienai parazītu olu skaits būtiski samazinājās, bet 42. dienā īslaicīgi pieauga, iespējams, kāpuru attīstības dēļ, tātad ekstrakts **samazināja nematožu invāzijas intensitāti**, taču tas bija mazāk efektīvs nekā standarta pretparazītārie līdzekļi, norādot uz daļēju antihelmintisku iedarbību.
5. **Antibiogrammas rezultāti** uzrādīja nelielu *E. coli* rezistences samazinājumu – trīs dzīvniekiem novērota vidēja jutība pret ciprofloksacīnu un cefepimu.
6. **In-vivo eksperimentā, pret kokcīdijām** (*Eimeria* spp.) biškrēsliņa ekstrakts iedarbību neuzrādīja – oocistu skaits nemainījās salīdzinājumā ar kontrolgrupām.
7. **Kuņģa-zarnu trakta gļotādu iekaisums** bija līdzīgs visās grupās; ekstrakts neizraisīja papildu bojājumus. Nelielas iekaisuma atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. Aitām, kas saņēma ekstraktu (īpaši bolusā), **novērota izteikta GALT hiperplāzija**, kas liecina par lokālu imunitātes aktivizēšanu un iespējamu aizsardzības stiprināšanu pret parazītiem.
8. **Patoloģiskas izmaiņas aknās, aizkuņģa dziedzerī u.c. netika novērotas** – konstatētās minimālās izmaiņas bija nesaistītas ar ārstēšanu, un toksicitātes pazīmes neparādījās.
9. **Lauka pētījumos** asins bioķīmiskie rādītāji saglabājās normas robežās visās saimniecībās.
10. **Bolus efektivitāte lauka apstākļos** bija nepietiekama – A, B un D saimniecībās efekts nebija novērojams vai minimāls, bet C saimniecībā tas bija augstāks, tomēr nesasniedza 95% efektivitāti.
11. T. vulgare bolus **uzrādīja augstāku iedarbību uz *Eimeria* spp. nekā uz nematodēm**, tomēr arī šeit efekts bija ierobežots.
12. **Kopumā pētījums apstiprina**, ka biškrēsliņa lapu ekstrakts var samazināt nematožu invāziju un stimulēt lokālo imunitāti bez būtiskām blakusparādībām. Tas var kalpot kā papildlīdzeklis parazītu kontrolei, taču, lai sasniegtu pilnvērtīgu efektu klīniskās saslimšanas gadījumā, nepieciešama devas, koncentrācijas vai kombinētas terapijas optimizācija turpmākajos pētījumos.

□

13. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Bártíková H., Podlíná R., Skálová L. (2016) Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144:2290-301.
2. Beynon S.A. (2012) Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, 113-124.
3. Boxall A.B.A., Fogg L.A., Blackwell P.A., Kay P., Pemberton E.J., Croxford A. (2004) Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 180, 1-91.
4. Cabaret J., Bouilhol M., Mage C. (2002) Managing helminths of ruminants in organic farming. *Veterinary Research*, 33(5), 625-640.
5. Castagna F., Piras C., Palma E., Musolino V., Lupia C., Bosco A., Rinaldi L., Cringoli G., Musella V., Britti D. (2021) Green Veterinary Pharmacology Applied to Parasite Control: Evaluation of *Punica granatum*, *Artemisia campestris*, *Salix caprea* Aqueous Macerates against Gastrointestinal Nematodes of Sheep. *Veterinary Sciences*, 8, 237, 1-14.
6. Charan, J., Kantharia, N. D. (2013) How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4 (4), 303-306.
7. Charlier J., van der Voort M., Kenyon F., Skuce P., Vercruysse J. (2014) Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*, 30:361-7
8. Dehuri M., Palai S., Mohanty B., Malangmei L. (2021) Anti-helminthic Activity of Plant Extracts against Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants - A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 15 (30), 117-127.
9. Domingues F.L., Giglioti R., Feitosa A.K., Fantatto R.R., Rabelo D.M., Oliveira S.C.G., Junior B.W., Chagas S.C.A. (2013) In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Ines sheep. *Veterinary Parasitology*, 197, 263-270.
10. Hudzicki J. (2009) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology (<https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>)
11. Iqbal Z. (2009) Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 325-329.
12. Kaplan M.R. (2013) Recommendations for control of gastrointestinal nematode parasites in small ruminants: These ain't your father's parasites. *The Bovine Practitioner*, 45 (2), 97-109.
13. Keidane, D., Klavina, A., Grasberga, M.G., Kovalcuka L. (2022) Parasitofauna and current status of anthelmintic resistance in Latvian sheep farms. *Veterinary World*, Vol.15(2), 414-418.
14. Kļaviņa, A., Keidāne, D., Šukele, R., Bandere, D., Kovaļčuka, L. (2021) Traditional Latvian herbal medicinal plants used to treat parasite infections of small ruminants: A review. *Veterinary World*, Vol.14(6), 1548-1558.
15. Kļaviņa A., Keidāne D., Ganola K., Kovaļčuka L. (2022) Ovicidal activity of ethanolic and acetone extracts of leaves and flowers of *Tanacetum vulgare* L. against

- gastrointestinal nematodes of sheep. 15th International Congress of Parasitology ICOPA 2022: abstracts book, Copenhagen, Denmark.
16. Kovaļčuka L., Keidāne D., Kļaviņa A., Grasberga M.B., Vekšins A. (2022) Most common inappropriate drug usage factors in anthelmintic treatment on sheep farms in Latvia. *Veterinary World*, 15(2), 244–251.
 17. Kupčinskis T., Stadaliene L., Šalomska A., Trusevičius P., Varady M., Petkevičius, S. (2016) Worm-control practices and prevalence of anthelmintic resistance using in vivo FECRTs on smallholder sheep farms in Lithuania. *Helminthology*, 53(1), 24-30.
 18. Leathwick D.M., Luo D. (2017) Managing anthelmintic resistance variability in the dose of drug reaching the target worms influences selection for resistance? *Veterinary Parasitology*, 243, 29-35.
 19. Mariani E., Canella V., Berlingeri A., Bielli A., Cattini L., Landini P.M., Kon E., Marcacci M., Di Matteo B., Filardo G. (2015) Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro. *BMC Microbiology*, 15:149, 1-13.
 20. Mavrot, F, Hertzberg, H., Torgeson P. (2015) Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*, 8, 557.
 21. Oliveira L.M.B., Baviacqua C.M.L., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Barros R.S., Rodrigues A.C.M., Camurca-Vasconcelos A.L.F., Morais S.M., Lima Y.C., Vieira L.S., Navarro A.M.C. (2009) Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 159, 55-59.
 22. Prichard K.R., Geary G.T. (2019) Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, Vol. 10, 69-83.
 23. Sargison, N., editor. (2009) *Sheep Flock Health*. Blackwell, Oxford. p.465.
 24. Teruel M., D'Ercole J., Catalano R. (2011) Evaluation of potential embryo toxicity of albendazole sulphoxide in CF1 mice. *BIOCELL*, 35(1), 29-33.
 25. Torres - Acosta J.F.J., Hoste H. (2008) Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminants Research*, 77, 159 - 173.
 26. Untersweg, F., Fernerl, V., Wiedermann, S., Göller, M., Hörl-Rannegger, M., Kaiser, W., Joachim, A., Rinaldi, L., Krücken, J. and Hinney, B. (2021) Multispecific resistance of sheep trichostrongylids in Austria. *Parasite*, 28, 50.
 27. Váradyová Z., Kišidayová S., Čobanová K., Grešáková L., Babják M., Königová A., Urda Dolinská M., Várady M. (2017) The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and hematological parameters of the lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, Vol. 151, 124-132
 28. Wood B.I., Amaral K.N., Bairden K., Duncan L.J., Kassai T., Jr. Malone B.J., Pankavich A.J., Reinecke K.R., Slocumbe O., Taylor M.S., Vercruysee J. (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, Vol.58, 3, 181-213.

13. PIELIKUMI