

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Katedra za Farmakologiju i toksikologiju



**Đorđe S. Marjanović**  
*Doktor veterinarske medicine*

**Ispitivanje mehanizma antinematodnog  
dejstva odabranih monoterpenoidnih i  
diterpenoidnih aktivnih sastojaka esencijalnih  
biljnih ulja**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019**

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE

Katedra za Farmakologiju i toksikologiju



**Đorđe S. Marjanović**  
*Doktor veterinarske medicine*

**Ispitivanje mehanizma antinematodnog  
dejstva odabranih monoterpenoidnih i  
diterpenoidnih aktivnih sastojaka  
esencijalnih biljnih ulja**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019**



**Dorđe S. Marjanović**  
*Doctor of veterinary  
medicine*

**Investigation of the antinematodal mechanism of  
action of selected monoterpenoid and  
diterpenoids active ingredients from plant  
essential oils**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

**Mentor:**

dr Saša M. Trailović, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Komisija za odbranu:**

dr Saša M. Trailović, redovni profesor  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Mirjana Milovanović, vanredni profesor  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Zoran Todorović, redovni profesor  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Mesto i datum odbrane:**

**Beograd, \_\_\_\_\_**

## *Zahvalnica*

*Za pruženu šansu za rad u Farmakologiji želim da izrazim najiskreniju zahvalnost svom mentoru prof. dr Saši M. Trailoviću bez koga ne bih kročio u svet nauke, koji me je prihvatio na svoje istraživanje i projekat kojim rukovodi. Za sve što sam naučio u svom istraživačkom i laboratorijskom radu zahvalnost dugujem upravo njemu. Takođe, želim da izrazim posebnu zahvalnost i prof. dr Mirjani Milovanović koja mi je svojim znanjem, iskustvom i korisnim savetima pomogla u savladavanju veština rada u laboratoriji. Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Zoranu Todoroviću na pomoći u toku realizacije ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, svom ocu Slobodanu, majci Zorici i sestri Ani koji su uvek bili uz mene, iskreno verovali u mene, i bez kojih ne bih uspeo bilo šta da uradim u svom životu.*

*Hvala svim dragim prijateljima, kolegama i profesorima, koji su me podržali i koji su bili tu za mene kad god je trebalo.*

*Najiskrenije,*

*Đorđe S. Marjanović*

## **Ispitivanje mehanizma antinematodnog dejstva odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja**

### **Kratak sadržaj**

U ovoj doktorskoj disertaciji provereni su i analizirani mehanizmi kojima pojedini aktivni sastojci esencijalnih biljnih ulja deluju na neuromišićni preparat *A. suum*. Ispitan je mehanizam antinematodnog dejstva odabranih biljnih mono i diterpenoida na neuromišićnom preparatu nematode i dejstvo na različite podtipove nikotinskog receptora (L, N i B tip). Pored toga ispitan je uticaj i interakcija terpenoidnih aktivnih sastojaka biljnih ulja na GABA receptor parazitske nematode. Takođe, testirana je njihova interakcija sa antinematodnim lekom iz grupe aminoacidonitrila (monepantel). Proverena je selektivnost dejstva karvakrola, karveola i mentola na neuromišićnim preparatima sisara (izolovana dijafragma i ileum pacova) i ispitano je dejstvo karvakrola na neuromišićni sistem sisara (Rota-rod test na pacovima). Ispitan je i uticaj timola i karvakrola na preživljavanje i faringealno pumpanje nematode *Caenorhabditis elegans* kao i dozna i vremenska zavisnost ovog efekta.

Ključne reči: karvakrol, karveol, mentol, monepantel, *A. suum*, *Caenorhabditis elegans*, rota rod test, pirantel, morantel, befinijum

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija i toksikologija

UDK broj: 619:615.03:665.3

### **Investigation of the antinematodal mechanism of action of selected monoterpenoid and diterpenoids active ingredients from plant essential oils.**

#### **Summary**

In this doctoral dissertation are analyzed and identified the mechanisms of action of some active ingredients of essential plant oils that act on the neuromuscular

preparation of *A. suum*. Antinematodal mechanism of action is investigated for some selected mono and diterpenoids and the effects on the various subtypes of nicotinic receptor (L, N, and B type) are compared. In addition, the influence and interaction of terpenoid active ingredients of plant oils with the GABA receptor of parasitic nematodes was studied. Also, their interaction with antinematodal drug from the group of aminoacetonitrile (monepantel) was tested. Selectivity of action is checked for carvacrol, menthol and carveol on the mammalian neuromuscular preparations (isolated rat diaphragm and ileum). Furthermore we investigated the effect of carvacrol on the mammalian neuromuscular system (Rota-rod test in rats). In order to analyze the dose and time dependency of antinematodal action of thymol and carvacrol we tested the survival and pharyngeal pumping of nematode *Caenorhabditis elegans* in presence these terpenoids.

Keywords: carvacrol, carveol, menthol, monepantel, *A. suum*, *Caenorhabditis elegans*, Rota rod test, pyrantel, morantel, bephenium

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific discipline: Pharmacology and toxicology

UDC number: 619:615.03:665.3

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Pregled literature.....	5
3.	Ciljevi i zadaci .....	40
4.	Materijal i metode.....	42
5.	Rezultati.....	53
	5.1. Ispitivanje potencijalnog farmakološkog dejstva odabranih biljnih mono i diterpenoida na kontraktilnu sposobnost i određivanje dozne zavisnosti efekta na neuromišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i> .....	53
	5.2. Ispitivanje dejstva tiramina na izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom.....	78
	5.3. Ispitivanje dejstva monepantela (derivat aminoacidonitrila) i njegova interakcija sa karvakrolom na neuromišićnom preparatu <i>A.suum</i> .....	81
	5.4. Ispitivanje dejstva karveola na neuromišićnom preparatu <i>A.suum</i> .....	88
	5.5. Ispitivanje dejstva mentola na neuromišićnom preparatu <i>A.suum</i> .....	90
	5.6. Ispitivanje stepena preživljavanja adultnih oblika <i>C.elegans</i> pod uticajem timola i karvakrola.....	95
	5.7. Ispitivanje uticaja karvakrola, karveola, mentola i monepantela na kontrakcije dijafragme pacova metodom električne poljne stimulacije (EFS).....	96
	5.8. Ispitivanje efekta karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova.....	99
	5.9. Ispitivanje dejstva karvakrola na motoronu koordinaciju pacova izvođenjem Rota-rod testa.....	103
6.	Diskusija.....	106
7.	Zaključci.....	130
8.	Literatura.....	136



## **1. Uvod**

Po definiciji paraziti su živi organizmi koja žive na račun drugih živih bića. Bolesti prouzrokovane nematodama koje parazitiraju kod ljudi i životinja dovode do značajnih zdravstvenih problema a nekada ishod tih infekcija može biti smrt ukoliko su kombinovane sa nekim drugim oboljenjima. Nematode ili valjkasti crvi su jedni od najraznovrsnijih oblika živih bića ako posmatramo životinjske rodove i vrste. Do sada je u literaturi opisano preko 28 000 nematoda, od kojih je više od 16 000 parazitskog načina života (Hugot i sar., 2001). Parazitske nematode životinja značajno utiču na njihovo zdravstveno stanje, dobrobit i proizvodne rezultate pa stoga izazivaju ozbiljne ekonomske gubitke (Paterson i Barber, 2007). Možemo reći da su parazitske infekcije nematodama učestale u oblastima gde postoje nezadovoljavajući sanitarni i ekonomski uslovi života koji doprinose razvoju ovih oboljenja.

Smatra se da je neuromišićni sistem parazitskih nematoda glavno mesto delovanja mnogih ako ne i većine poznatih do sada opisanih antihelmintika kojima pokušavamo da sprečimo i preveniramo posledice ovih infekcija. Najčešće korišćeni antinematodni lekovi u humanoj i veterinarskoj medicini su holinergički agonisti: imidoazotiazoli (levamizol), tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel), kvaternerni/tercijarni amini (befinijum i tribendimidin), piridini (metiridin), derivati aminoacetonitrila (AAD, monepantel). Navedene grupe lekova dovode do spastične paralize nematode tako što selektivno otvaraju jonske kanale acetilholinskog receptora na sinapsama motoneurona i interneurona, ili na somatskim mišićnim ćelijama. Rezultat je otvaranje Na<sup>+</sup> jonskog kanala i depolarizacija, praćena jakom kontrakcijom mišićnih struktura (Holden-Dye i sar., 2013).

Druga velika grupa antinematodnih lekova su avermektini. Avermektini reaguju sa GABA receptorom (koji je verovatno sličan GABA<sub>A</sub> receptoru sisara), i glutamat zavisnim hloridnim kanalom koji se nalazi samo na ždreću kod nematoda. Ova interakcija dovodi do povećanja propustljivosti postsinaptičke membrane za hloridne jone, izazivajući hiperpolarizaciju ćelijske membrane i mišićnu relaksaciju ili atoničnu paralizu i smrt parazita (Holden-Dye i Walker, 2014; Wolstenholme, 2004; Puttachary i sar., 2013).

*Ascaris suum* (najveći valjkasti crv) je najvažniji gastrointestinalni parazit kod svinja, i skoro idealni eksperimentalni model za ispitivanje neurotransmitera i delovanja antihelmintika kod nematoda. U poređenju sa sisarskim neuromišićnim sistemom, nematode pokazuju značajne anatomske i fiziološke razlike. Somatska mišićna ćelija *Ascaris suum* razlikuje se u strukturi u odnosu na kičmenjake. Mišićne ćelije ovog parazita sastavljene su od tri različita regiona: vlaknastog regiona, mišićne vreće ili stomaka i regiona ruke. Vlaknasti region sadrži aktin i miozin i to je kontraktilni deo ćelije. Aktin i miozin su raspoređeni u preklapajuće redove koji proizvode pruge, kao kod skeletnog mišića sisara. Međutim, pruge u mišića nematoda nisu postavljene poprečno u odnosu na dugu osu mišića. Umesto toga, mišić je ukoso postavljen što mu omogućava ekstenziju sa brzim kontrakcijama. Vrećasti region u ćeliji sadrži jedro i obogaćen je sa glikogenom i mitohondrijama. On se ponaša kao energetski depo mišićne ćelije (Martin i sar., 2003). Postoji i dokaz da mišićna vreća omogućava podršku. U intaktnom parazitu, vreća je naborana unutar creva. Mišićna ruka je veza upravljena od mišićne vreće prema nervnoj vrpici. Za razliku od sisara gde se nervni aksoni pružaju od kičmene moždine do mišića, mišićne ćelije nematoda šalju produžetke ka nervnoj vrpici što je veoma bitna anatomska fiziološka razlika. Ova pojava nije potpuno razjašnjena, pogotovu ako znamo da svaka pojedinačna mišićna ćelija ima jednu ili više ruka koje se produžavaju od mišićne vreće prema nervnoj vrpici u hipodermisu. Na svom kraju, svaka mišićna ruka se grana u procesu udruživanja sa ostalim rukama formirajući sincicijum, ili funkcionalnu mrežu oko nervne vrpce. Nervni sistem *A.suum* je kao i kod drugih nematoda stabilan i relativno uprošćen. Utvrđeno je da poseduje oko 300 neurona (senzitivnih i motornih) koji su uglavnom koncentrisani u glavenom i repnom regionu tela parazita. Cirkumfaringealni nervni prsten je lokalizovan u glavenom regionu u okolini ždrela. Smatra se da je to oblik primitivnog mozga, koji počinje sa dorzalne, lateralne i ventralne nervne vrpce i pruža se dužinom tela nematode sve do repa. Mišićne ćelije se inervišu sa dorzalne i ventralne nervne vrpce, dok je lateralna nervna vrpca zadužena za inervaciju ekskretornog kanala. Najveća od ove tri nervne vrpce je ventralna (Martin i sar., 2003). Između motoneurona i ventralne nervne vrpce smešteni su interneuroni. Acetilholin (ACh) je neurotransmiter na ekscitatornim sinapsama, dok je GABA neurotransmiter na inhibitornim sinapsama između motoneurona i interneurona. Interneuroni nematoda mogu biti evolucijski

povezani sa sisarskim Renshaw ćelijama, i potencijalno su veoma interesantni kao mesto za delovanje lekova (Trailović i Varagić, 2007). Pored receptora na nervno-mišićnim sinapsama, dokazano je da GABA i nikotinski receptor postoje i ekstrasinaptički i da su smešteni u vrećastom delu mišićne ćelije *A. suum* (Martin, 1982; Martin i sar., 2003).

Klasična antiparazitska terapija zasnovana na konvencionalnim i postojećim opisanim lekovima je suočena sa nekoliko značajnih izazova. Izveštaji u vezi sa rezistencijom različitih parazitskih nematoda na antiparazitske lekove su učestali, dok problem sa povećanjem doza lekova nosi sa sobom produženu toksičnost. Posebno važna činjenica vezana za upotrebu većine antiparazitskih lekova je dug period karence, što predstavlja važan problem kako za veterinare i tako i za uzgajivače farmskih životinja. Nabrojali smo samo najvažnije razloge koji su naveli istraživače da pokušaju da se okrenu alternativnim lekovima na biljnoj bazi umesto konvencionalnih hemijskih antiparazitskih lekova.

Literaturni podaci ukazuju na to da biljke proizvode etarska ulja kao organski proizvod sekundarnog metabolizma. Eterična ulja (ili njihovi aktivni principi) su bezbedni za upotrebu i potencijalno su atraktivna alternativa aktuelnim antiparazitskim lekovima. U literaturi se navodi da biljna eterična ulja pokazuju insekticidnu i nematocidnu aktivnost protiv jednog broja insekata i nematoda (Ellis i Baxendale, 1997; Enan, 2005; Camurca-Vasconcelos i sar, 2007; Barros i sar, 2009.). Postoje istorijski dokazi sa početka dvadesetog veka, da se timol kao aktivna komponenta iz majčine dušice koristio u lečenju askarijaze i ankilostomijaze kod ljudi (Kaplan i sar., 2014). Danas se sve više pažnje posvećuje konceptu biljne funkcionalne hrane protiv infekcija endoparazitima, koja može da zameni ili da potencira efekat klasične terapije antihelminticima. Ova specijalna hrana može da sadrži esencijalna biljna ulja ili njihove aktivne sastojke, omogućavajući korišćenje funkcionalne hrane protiv parazitskih nematoda.

Posebno smo zainteresovani za karvakrol, aktivni sastojak eteričnih ulja majčine dušice i origana. Hierro i saradnici (2004) su objavili da karvakrol može da deluje *in vitro* na L3 larve *Anisakis simplex* u koncentraciji od 12.50 µg/ml. Slični rezultati su objavljeni od strane Abdel-Rahman i saradnika (2013), ali ovaj put je opisan

antinematodni efekat karvakrola na modelu slobodno živeće nematode *Caenorhabditis elegans*.

## **2. Pregled literature**

### **2.1. Antiparazitski efekat aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja**

Bolesti prouzrokovane parazitskim nematodama veoma su značajan zdravstveni problem kako u humanoj tako i u veterinarskoj medicini. Smatra se da su upravo valjkasti crvi najrazličitiji ukoliko posmatramo sve vrste životinja. Do sada je opisano preko 28 000 vrsta nematoda od kojih su više od 16 000 parazitske vrste (Hugot i sar., 2001). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (2018), više od 1,5 milijarde ljudi, ili 24% svetske populacije, inficirano je barem jednom vrstom crevnih parazita, koje uglavnom uključuju valjkaste crve *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura* i pantljičare (*Necator americanus* i *Ancylostoma duodenale*). Parazitske nematode dovode do ozbiljnih poremećaja zdravstvenog statusa, visokih ekonomskih gubitaka u stočarstvu, a neretko su i teške zoonoze, odnosno predstavljaju direktnu opasnost po zdravlje ljudi (Paterson i Barber, 2007). Savremena antiparazitska farmakoterapija je suočena sa nekoliko važnih izazova. Sve veći broj izveštaja odnosi se na rezistenciju parazitskih nematoda prema klasičnim antiparazitskim lekovima, dok povećanje primenjivih doza ima za posledicu ispoljavanje njihove toksičnosti. Posebno važna za veterinarsku medicinu je činjenica da većina antiparazitskih lekova zahteva dug period karence posle primene kod životinja čija su tkiva namenjena za ishranu ljudi (Martin i sar., 2004). Navedeni su samo najvažniji razlozi koji su istraživanja usmerili prema potencijalnoj primeni biljnih proizvoda, umesto konvencionalnih sintetskih antiparazitskih lekova. Biljke stvaraju esencijalna ili eterična ulja kao organske produkte sekundarnog metabolizma. Pretpostavlja se da su esencijalna ulja (odnosno njihovi aktivni principi) na osnovu (antimikrobnih, antiparazitskih i dr.) farmakoloških karakteristika potencijalno najozbiljniji alternativni lekovi i biocidi. Njihovi aktivni principi su sposobni da efikasno i bezbedno zamene klasične antimikrobne i antiparazitske lekove i biocide. Aktivni principi esencijalnih biljnih ulja podeljeni su u dve grupe zavisno od prekursora primarnog metabolizma iz koga nastaju i različitog metaboličkog puta: a) terpenoidi i b) fenilpropanoidi. Uloga sekundarnih biljnih metabolita je da štite biljke od predatora, patogena i kompetitorskih vrsta. Imaju ulogu i

u adaptaciji na određene abiotičke činioce ili služe kao „biljni feromoni“ za privlačenje polinatora i odbijanje štetnih insekata (Abdel-Rahman i sar., 2013). Dokazano je da se etarska ulja stvaraju u različitim delovima biljaka, a uskladišteni su u sekretornim ćelijama, šupljinama, kanalima, ćelijama epiderma ili u žlezdanim trihomama biljaka. Zastupljenost u biljkama zavisi pre svega, od klimatskih i sezonskih uslova, geografskih područja, vremena žetve (branja), metoda ekstrakcije, ali i od faze rasta biljke (Barros i sar., 2009). Medicinsko dejstvo biljaka karakteristika je kojom se odlikuju određene vrste, a nosioci tog dejstva su njihovi sekundarni metaboliti sa izraženim specifičnim farmakološkim efektima. Sekundarni metaboliti, među kojima su etarska ulja, imaju brojna farmakološka delovanja uključujući antiinflamatorno, antibakterijsko, antioksidativno, anestetičko i antidepresivno. Mnogi produkti sekundarnog metabolizma se odlikuju baktericidnim, repelentnim ili toksičnim svojstvima. Procenjuje se da oko 40% lekova u humanoj medicini vodi poreklo od sekundarnih metabolita biljaka, obuhvatajući prirodne ili hemijski modifikovane supstance. Od davnina je poznato da etarska ulja imaju antiseptičku i antibakterijsku moć i već se vekovima koriste kao prirodni antimikrobni agensi. Do sada je opisano da se etarska ulja koriste u farmaceutskoj industriji i kozmetici u proizvodnji pojedinih preparata. Našla su svoju primenu u fitoterapiji i aromaterapiji u lečenju, prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja ljudi. Veoma uspešno se koriste kod lečenja infekcija respiratornih puteva, kožnih oboljenja, jačanja imuniteta i oslobađanja od stresa. Esencijalna ulja se mogu upotrebljavati na različite načine, tako su npr. prisutna kao sastojak preparata kupki, inhalacija, preparata za direktno nanošenje na određeni deo tela, masaže ili mirisnog oplemenjivanja prostora.

Sa hemijskog aspekta sekundarni metaboliti biljaka su uglavnom lako isparljive hidrofobne, kompleksne prirodne smeše ugljovodonika, alkohola, karbonilnih jedinjenja, merkaptana i drugih smeša alifatične i/ili aromatične strukture. Jedna od hemijskih odlika etarskih ulja i aktivnih komponenti jeste da se ne rastvaraju u vodi nego u apsolutnom etanolu, hloroformu, etru, masnim uljima i drugim organskim rastvaračima. Hemijski sastav etarskih ulja zavisi takođe od mnogih činilaca kao što su ekogeografski lokalitet, količina padavina, broj sunčanih dana i dužina svetlosnog perioda, sastav i osobine zemljišta, pa čak i doba dana kada je obavljena berba biljaka. Glavni sastojci etarskih ulja su terpenoidi, fenilpropanoidi, steroidi i alkaloidi (Hierro i

sar., 2004). Terpenoidi ili terpeni privlače najveću pažnju u odnosu na farmakološka svojstva koja poseduju i ujedno predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka. Na osnovu broja ugljenikovih atoma osnovnog skeleta, prirodni terpenoidi su podeljeni na seskviterpenoide, monoterpenoide, diterpenoide, triterpenoide, tetraterpenoide i politerpenoide (Zhang i Demain, 2005). U odnosu na antiparazitska svojstva posebno se izdvajaju monoterpenoidi karvakrol, karveol, mentol, timol, alfa-pinen, *p*-cimen kao i cinamaldehyd fenilpropanoid. U literaturi se mogu naći podaci da biljna etarska ulja poseduju insekticidna i nematocidna svojstva (Ellis i Bakendale 1997; Enan 2005; Camurca-Vasconcelos i sar. 2007; Barros i sar. 2009). Postoje i istorijski dokazi da je početkom dvadesetog veka, timol - glavna komponenta etarskog ulja majčine dušice (*Thimus vulgaris L.*), korišćen za lečenje askaridoze i ankilostomijaze ljudi (Kaplan i sar., 2014). Upravo zbog varijacija u koncentracijama aktivnih sastojaka u etarskim biljnim uljima koje smo prethodno opisali, istraživanja se danas uglavnom sprovode sa prečišćenim aktivnim principima. Ovakav pristup omogućava precizno doziranje i kontinuitet u ispitivanjima. Abdel-Rahman i sar. (2003) su ispitali potencijalni nematocidni efekat trideset četiri fitoterpenoide na modelu slobodnoživeće nematode *Caenorhabditis elegans*. Nematocidna aktivnost testiranih jedinjenja pri koncentracijama od 50 µg/ml pokazala je brojne razlike u njihovim dejstvima. Neki su ispoljili slabe a drugi umerene i jake efekte. Terpenoidi koji su ispoljili 50 % ili viši mortalitet *C. elegans*, dalje su testirani u pet različitih koncentracija kako bi bila određena srednja letalna koncentracija (LC<sub>50</sub>). Među najefikasnijim terpenoidima bili su karvakrol (3 µg/ml), timol, nerolidol, α-terpinene, geraniol, citronelol, farnezol, limonen, pseudoionon i eugenol (30 µg/ml). Ova jedinjenja pokazala su dozno-zavisni nematocidni efekat. Rezultati su ukazali da pojedini terpenoidi mogu biti potencijalni prirodni nematocidi i da zaslužuju dalja proučavanja kao botanički antiparaziti za kontrolu biljnih i životinjskih parazitskih nematoda. Različiti prirodni monoterpeni (geraniol, citronelol, citral, karvakrol, cinamaldehyd i eugenol) su proučavani *in vitro* protiv L3 larvi nematode *Anisakis simplex* SL. Primenjivane su tri koncentracije 12.50, 6.25 i 3.12 µg/ml za svaki od testiranih monoterpena. Praćeno je prosečno vreme preživljavanja larvi, određena je vrednost koncentracije za preživljavanje 50% i maksimalno preživljavanje posle 4, 8, 24 i 48 sati ekspozicije. Svi testirani monoterpenoidi, osim eugenola, bili su aktivni u najvišoj primenjenoj koncentraciji

(12.50 µg/ml) (Hierro i sar. 2004). Aktivni sastojci etarskih ulja su efikasni i protiv nematoda koje napadaju korenje biljaka. Nematocidna aktivnost etarskih ulja izdvojenih iz 27 začina i aromatičnih biljaka ispitana je *in vitro*. Dvanaest, od dvadeset sedam eteričnih ulja u koncentraciji od 1000 µl/l, imobilisalo je više od 80% juvenilnih nematoda *Meloidogine javanica*. U ovoj koncentraciji, većina etarskih ulja takođe inhibira produkciju jaja *Meloidogine javanica*. Nematocidna efikasnost je testirana i za glavne sastojke ispitivanih eteričnih ulja. Karvakrol, t-anetol, timol i (+) - karvon imobilisuju juvenilne oblike i njihov razvoj iz jaja pri koncentraciji >125 µl/l *in vitro*. Većina ovih komponenti pomešana u peščanom zemljištu u koncentracijama od 75 mg/kg i 150 mg/kg smanjuje oštećenja korena sadnica krastavca izazvane nematodama (Oka i sar., 2000). Cimet (*Cinnamomum verum*) poseduje brojna dokazana farmakološka svojstva, pored antimikrobnih i antiinflamatornih sve češće se spominju i antinematodna dejstva. Ekstrakti kore cimeta ispoljavaju *in vitro* antihelmintička svojstva protiv velike nematode svinja *Ascaris suum*. Ovaj ekstrakt sadrži visoke koncentracije proantocijanidina i trans-cinamaldehida, međutim dokazano je da većina potentnosti ekstrakta protiv *A. suum* potiče od cinamaldehida. U testu inhibicije migracije larvi (L3), koje su infektivni razvojni stadijum parazita, inkubacija u ekstraktu cimeta pri koncentracijama između 125 µg/ml i 1000 µg/ml rezultira u 100% inhibicije pokretljivosti (Williams i sar., 2015). Danas se sve više pažnje posvećuje funkcionalnoj hrani/hranivima protiv endoparazitskih infekcija koja sadrže biljne aktivne principe, a koja bi mogla da zameni ili potencira efekte klasične antihelmintičke terapije (Kaplan i sar., 2014). Kontrolisana studija je izvedena u cilju procene efikasnosti dve mikroinkapsulirane mešavine esencijalnih ulja: TTN1013 (alfa-pinen, linalil acetat, p-cimene i timol oktanoat) i TTN1014 (alfa-pinen, linalil acetat, p-cimene i timol acetat). Četiri grupe (n=16) prasadi ženskog pola, starosti 21-24 dana svakodnevno su tretirani sa 0.5 ili 1.0 mg/kg TTN1013 i 1.0 mg/kg TTN1014 u želatinoznim kapsulama ili 1.0 mg/kg u sendvič kolačima tokom 14 nedelja ogleđa. Počevši od trećeg dana nakon početka tretmana, prasadi su svakodnevno p.o. aplikovana jaja *A. suum* tokom četiri nedelje. Četrnaest nedelja kasnije životinje su žrtvovane, obavljen je partomorfološki pregled i kontrolisano je prisustvo askarisa. TTN1013 je aplikovan svakodnevno u dozi od 1.0 mg/kg ispoljio je statistički značajno smanjenje ukupnog broja askarisa (76.8 %), ženki askarisa (75.5 %) i broja jaja (68.6 %) u odnosu na kontrolu grupu. Smanjenje



ukupnog broja askarisa, broja ženki i broja jaja nije bilo signifikantno smanjeno posle tretmana sa TTN1014, kao i ni posle primene TTN1013 u dozi od 0.5 mg/kg (Kaplan i sar., 2014).

Za razliku od relativno brojnih podataka o antinematodnim dejstvima aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja, istraživanja njihovih mehanizmima dejstva gotovo da i nema. S obzirom da su pojedini sastojci esencijalnih biljnih ulja potencijalno veoma potentni nematocidi i da poseduju međusobna sinergistička ali i antagonistička svojstva, ova činjenica je malo razumljiva. Jedna od retkih studija opisuje *in vitro* istraživanja na dve nematode *Caenorhabditis elegans* i *Ascaris suum*. Studija je imala za cilj analizu nematocidnog dejstva tri monoterpenoida (timola, karvakrola i p-cimena). Rezultati su pokazali da timol i karvakrol ispoljavaju veću efikasnost od p-cimena. Koncentracija timola i karvakrola od 0.67 mM izazvala je mortalitet od 99% i 100%, dok je 0.75 mM p-cimena izazvalo svega 16% uginuća tretiranih glista (Williams i sar., 2015). Interesantno, mebendazol u koncentraciji od 0.68 mM izazvao je mortalitet od svega 10%. U daljem delu studije autori su ispitali interakciju karvakrola i timola sa tiraminskim receptorima nematoda (TyrR), čija je ekspresija izvršena na HEK293 ćelijama sisara. Transfekcija HEK293 ćelija izvršena je sekvencom TyrR (ser-2) *C. elegans*. Pokazalo se da timol i karvakrol stupaju u interakciju sa TyrR tokom desenzitacije SER-2 u testu mobilizacije  $Ca^{2+}$  posle aktivacije tiramina, kao i tokom translokacije SER-2 sa membrane u citoplazmu tokom testa internalizacije receptora. Studija je pokazala da bi nematocidna aktivnost timola i karvakrola mogla biti posredovana kroz TyrR, pri čemu ova dva jedinjenja mogu da utiču na nishodnu signalnu kaskadu regulacije receptora (Lei i sar., 2010). Međutim, teško je farmakološki dokazati ovu pretpostavku. TyrR nematoda je kuplovan na hloridni kanal i njegova funkcija je otvaranje jonskog kanala, posledica je ulazak jona hlora u ćeliju, hiperpolarizaciju membrane i inhibicija kretanja nematode. Radi se o jonotropnom receptoru/kanalu, što nije uobičajno za dokazane biogene amine kao neurotransmitere/neuromodule. Kod slobodnoživuće nematode *C. elegans* ovakvi receptori regulišu kretanje i pokrete vrata neophodne kod hranjenja same nematode (Pirri i sar., 2009). Neka od ispitivanja nisu potvrdila pretpostavke iz prethodne studije. Elektrofiziološkom "current clamp" metodom dokazano je da aplikacija karvakrola na mišićnu ćeliju *A. suum* ne izaziva hiperpolarizaciju, nema promena potencijala

membrane niti promena njene provodljivosti, ali je signifikantno inhibisana depolarizacija izazvana acetilholinom (ACh). Ovo je ukazalo na verovatnu direktnu blokadu nikotinskog receptora. I u ispitivanjima uticaja karvakrola na kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum* pokazalo se da nema relaksacije posle njegove aplikacije (što bi sledilo iz hiperpolarizacije membrane), ali je karvakrol signifikantno blokirao kontrakcije koje izaziva ACh. S obzirom da je pored promene srednje efektivne koncentracije ACh ( $EC_{50}$ ) (pomeranje dozno-zavisne krive u desno), signifikantno smanjen maksimalni odgovor ( $E_{max}$ ), možemo konstatovati da se radi o nekompetitivnom antagonizmu koji prema ACh ispoljava karvakrol. Kako je u pitanju blokada nikotinskog receptora nekompetitivnim mehanizmom verovatno se radi o potpuno novom mestu vezivanja antagoniste na receptoru ili jonskom kanalu (Trailović i sar., 2015). Navedeni podaci iz literature potpuno opravdavaju detaljnija ispitivanja mehanizma antinematodnog dejstva mono i diterpenoidnih aktivnih sastojaka biljnih ulja koji očigledno predstavljaju potencijalno potpuno novu klasu antihelminatika.

Najbitniji preduslov za primenu novih supstanci jeste njihova selektivna toksičnost. To podrazumeva da toksično delovanje leka na organizam parazita, prolazi bez značajnijeg štetnog delovanja na sam organizam domaćina. Selektivna toksičnost konvencionalnih antinematodnih lekova zasniva se na razlikama u fiziologiji domaćina i parazita, specifičnostima enzimskih procesa, kao i karakteristikama farmakoloških receptora, koji su glavno ciljno mesto dejstva leka. Ove razlike rezultat su filogenetske udaljenosti domaćina i parazita. O vrstama neželjenih i toksičnih dejstava odabranih postojećih i potencijalno novih antinematodnih lekova koji oni ispoljavaju na životinjama, ukratko će biti reči u narednom delu, u okviru svake odabrane grupe supstanci i lekova.

Međutim, pored toksičnosti, veoma važan problem vezan za primenu postojećih i potencijalno novih antinematodnih lekova predstavlja i rezistencija. Pojam rezistencija parazita nameće potrebu za primenom viših doza lekova, a to onda dovodi do veće pojave toksičnih efekata na životinjama. Sa pravom se iz svih navedenih razloga traga za potencijalno novim antiparazitskim supstancama koje će imati manje neželjenih dejstava bez pojave rezistencije od strane parazita, a koji će biti efikasni u niskim dozama bez pojave rezidua lekova u proizvodima od životinja koji se koriste za ishranu ljudi. Prirodni proizvodi su osnova sofisticiranih tradicionalnih terapija pojedinih

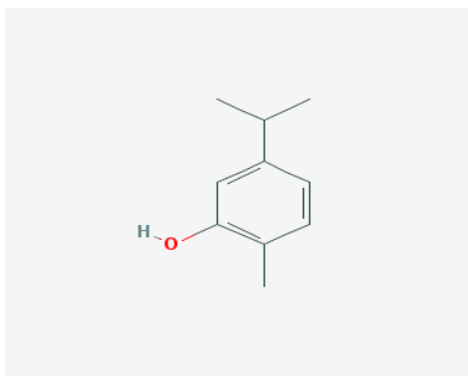
oboljenja i oni počinju da imaju ključnu ulogu u modernom zdravstvu. Antihelmintici poreklom iz biljaka bi trebalo da smanje potrebu za upotrebom hemijski formulisanih preparata i ublaže pritisak na upotrebu ograničenih dostupnih grupa antihelmintika (Choudhary i sar., 2018).

## 2.2. Karvakrol, aktivni sastojak esencijalnog ulja origana i timijana

Već smo napomenuli da tokom svog životnog veka u okviru fizioloških procesa, biljke stvaraju esencijalna ili eterična ulja kao organske produkte sekundarnog metabolizma. Pretpostavka je da su karvakrol i njemu slični metaboliti, kao deo esencijalnih ulja (odnosno njihovi aktivni principi), su na osnovu farmakoloških karakteristika (antimikrobnih, antiparazitskih i dr.) potencijalno najozbiljniji alternativni lekovi i biocidi. Analiza etarskog ulja podrazumeva odvajanje sastavnih aktivnih komponenata, njihovu identifikaciju i karakterizaciju upotrebom različitih hemijskih metoda. U etarskim uljima može se ustanoviti veliki broj pojedinačnih jedinjenja u različitim koncentracijama, kao i njihova vrlo različita hemijska svojstva. Etarsko ulje se uglavnom sastoji od dve do tri glavne komponente, koje su zastupljene u relativno visokoj koncentraciji od 20 do 70%, dok se ostale komponente nalaze u tragovima. Ove glavne komponente određuju biološke i farmakološke osobine samog etarskog ulja, kao na primer karvakrol i timol kod ulja timijana i origana (Zdravković, 2016). Aktivne komponente etarskih ulja dele se na dve grupe različitog hemijskog sastava. Komponente etarskih ulja se odlikuju relativno malom molekularnom masom. Prva grupa je sastavljena od terpena i terpenoida, a druga od aromatičnog i/ili alifatičnog dela. Prema hemijskoj strukturi timol i karvakrol predstavljaju izomere monoterpena koji sadrže fenolnu grupu, Glavne aktivne komponente etarskog ulja origana, *Origanum vulgare*, su karvakrol (2-metil-5-(1-metiletil)fenol) i timol (2-izopropil-5-metilfenol) koji predstavljaju 30 % odnosno 27 % ulja. Prema podacima iz literature koncentracija karvakrola u oranovom ulju može da bude i značajno viša i do 68 %.

Karvakrol je organsko jedinjenje, koje sadrži 10 atoma ugljenika i ima molekulsku masu od 150.2 g/mol. On je bezbojna do žuta, viskozna tečnost. Praktično

je nerastvorljiv u vodi, a dobro je rastvorljiv u etanolu, etru i sumpornoj kiselini. Hemijska struktura ovog jedinjenja prikazana je na slici 1 (Carvacrol - Pubchem).



**Slika 1.** Hemijska struktura karvakrola.

Karvakrol ( $C_{10}H_{14}O$ ) je monoterpenoidni fenol karakterističnog mirisa na origano. Karvakrol je prisutan u etarskom ulju *Origanum vulgare* (origano), ulju majčine dušice i ulju divljeg bergama. Etarsko ulje majčine dušice sadrži između 5 i 75% karvakrola. Karvakrol inhibira rast nekoliko bakterijskih sojeva, npr. *Escherichia coli* i *Bacillus cereus*. Za njega se smatra da u antibakterijskom dejstvu primarno remeti energetski metabolizam bakterijske ćelije. Redukcijom sinteze ATP i povećanjem njegove hidrolize, karvakrol brzo smanjuje bakterijske depoe ATP. Između ostalog, nedostatak ATP dovodi i do smanjenja funkcije natrijum-kalijumove pumpe ( $Na^+/K^+ATP$ -aza), koja učestvuje u održavanju konstantnog transmembranskog potencijala ćelijske membrane. Ova konstantna vrednost je neophodna za selektivnu propustljivost ćelijske membrane. Redukcija transmembranskog potencijala nastala delovanjem karvakrola na opisan način, ima za posledicu povećanje permeabiliteta ćelijske membrane bakterije. Karvakrol (1 mM) smanjuje intracelularni pH bakterije sa 7.1 na 5.8. Ista koncentracija karvakrola (1 mM), u kratkom vremenskom periodu (5 minuta), takođe smanjuje i sadržaj ćelijskih proteina (sa 12 mmola/mg na 0,99 mmola/mg) posredstvom kalijuma bakterijske ćelije. Kalijum ( $K^+$ ) ima važnu ulogu u aktivaciji citoplazmatskih enzima, održavanju osmotskog pritiska i regulaciji citoplazmatske pH vrednosti. Gubitak  $K^+$ , pouzdan je znak oštećenja ćelijske membrane bakterije i njenog brzog propadanja (Baser, 2008).

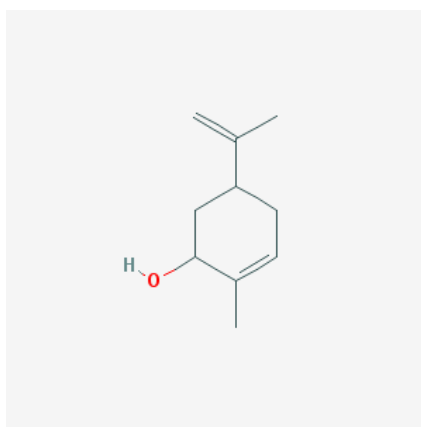
Vrednost srednje letalne koncentracije (LD<sub>50</sub>) karvakrola za pacova nakon oralnog unošenja iznosi 810 mg/kg telesne mase. Za miševe ove vrednosti nakon intravenske aplikacije iznose 80 mg/kg, dok se subkutanom administracijom ova vrednost povećava na 680 mg/kg. Nakon intraperitonealne aplikacije karvakrola kod miševa vrednosti LD<sub>50</sub> iznose 73,3 mg/kg telesne mase. Akutna toksičnost karvakrola nakon perkutane aplikacije karvakrola kod kunića iznosi 2700 mg/kg. U različitim testovima nije dokazana kancerogenost, genotoksičnost i teratogenost karvakrola.

Niska toksičnost karvakrola zajedno sa prijatnim ukusom i mirisom sugeriše njegovu upotrebu kao dodatak hrani u sprečavanja bakterijske kontaminacije. Karvakrol je moćan aktivator jonskih kanala TRPV3 i TRPA receptora (Zhang i Demain, 2005). Kod pacova, karvakrol se brzo metaboliše i izlučuje. Glavni metabolički put je esterifikacija fenolne grupe sa sumpornom kiselinom i glukuronskom kiselinom. Drugi manji put razgradnje je oksidacija terminalnih metil grupa sa primarnih alkohola. Nakon 24 sata, samo veoma male količine karvakrola ili njegovih metabolita mogu se naći u urinu, što ukazuje na skoro potpuno izlučivanje u roku od jednog dana (Abdel Rahman i sar., 2013). Hierro i sar. (2004) su objavili da karvakrol može da deluje in vitro na L3 larve *Anisakis simplex* u koncentraciji od 12.50 µg/ml. Slični rezultati su objavljeni od strane Abdel-Rahman i sar. (2013), ali ovaj put je opisan antinematodni efekat karvakrola na modelu slobodnoživeće neparazitske nematode *Caenorhabditis elegans*. Karvakrol u mikromolarnim koncentracijama veoma značajno inhibira kontrakcije mišića parazita *A. suum*-a izazvane sa ACh (Trailović i sar., 2015). Sa druge strane, karvakrol veoma značajno potencira inhibitorno dejstvo GABA i piperazina kod kontrakcija mišića izazvanih ACh. Inhibitorni efekat na kontrakcije može biti objašnjenje za antinematodni potencijal karvakrola. Štaviše, inhibicija depolarizacije izazvane ACh i smanjenje provodljivosti direktno ukazuju na interakciju sa nikotinskim acetilholinskim receptorom (nAChR) kod *A. suum* (Trailović i sar., 2015).

### 2.3. Karveol, aktivni sastojak esencijalnog ulja nane i kima

Za karveol se u literaturi navodi da je po svom hemijskom sastavu prirodni monociklični monoterpenoid. Predstavnik je i jedan od glavnih sastojaka etarskog ulja nane (*Mentha piperita*) u obliku cis (-) karveola. Pored prisustva u etaskom ulju mente,

istraživanja su pokazala da se karveol nalazi i u etarskom ulju kima (*Carum carvi*). Određene koncentracije karveola prisutne su u ulju od grejpfruta (*Citrus paradisi*), mandarina (*Citrus reticulata*), bobici crne ribizle (*Ribes nigrum*), celeru (*Apium graveoleus*), crnom čaju (*Camellia sinensis*) i mirođiji (*Anethum graveolens*) (Lozon i sar., 2016). Ovo jedinjenje pripada klasi organskih jedinjenja poznatih kao metil monoterpenoidi. Po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama karveol je prozirna bezbojna tečnost, rastvorljiva u ulju i etanolu, nerastvorljiva u vodi. Karveol (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) je monoterpenoid, male molekulske mase od 152.237 g/mol. Hemijska struktura ovog molekula prikazana je na slici 2 (Carveol - Pubchem).



Slika 2. Hemijska struktura karveola

Radi se o supstanci karakterističnog mirisa i ukusa koji podseća na mentu i aromu kima. Koristi se kao aromatični miris u kozmetici i kao pojačivač ukusa u prehrambenoj industriji. Istraživanja ovog monoterpenoida su pokazala da se može koristiti u hemoprevenciji kancerogeneze mlečne žlezde (sprečava rak dojke). Kao predstavnik cikličkih monoterpena karveol ispoljava antinociceptivni efekat, lokalno anestetski i antiinflamatorni efekat. Efekti cikličnog monoterpena karveola ispitani su na funkcionalnim svojstvima klonirane  $\alpha 7$  subjedinice ljudskog nikotinskog receptora eksprimovanog na očitima žabe *Xenopus laevis*. Karveol je inhibirao aktivnost  $\alpha 7$  subjedinice nikotinskog receptora i ispoljio najveći efekat na dejstvo acetilholina sa srednjom efektivnom koncentracijom (EC<sub>50</sub>) od 8.3 $\mu$ M. Inhibicija koju je izazvao karveol bila je nezavisna od potencijala membrane i nije bilo moguće neutralisati je

povećanjem koncentracije acetilholina. U skladu sa funkcionalnim eksperimentima, dalje studije su pokazale da ciklični monoterpeni poput karveola mogu da interaguju sa alostričnim mestom koje se nalazi u transmembranskom domenu  $\alpha 7$  sujednice nAChR (Lozon i sar., 2016). Rađene su studije o akaricidnom dejstvu karveola protiv kućnih grinja iz roda *Dermatophagoides farinae* i *Dermatophagoides pteronissinus*. Zadatak ove studije bio je da se proceni akaricidna aktivnost karveola sa ciljem da se zameni benzil benzoat kao sintetički akaricid. Na osnovu vrednosti LD<sub>50</sub>, kontaktna toksičnost za benzil benzoat iznosila (7.33 i 6.01  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a za karveol je bila niža i iznosila je (6.00 i 5.80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Rezultati fumigantne toksičnosti u biološkom testu pokazali su da je karveol bio efikasniji od benzil benzoata (Yang i sar., 2014).

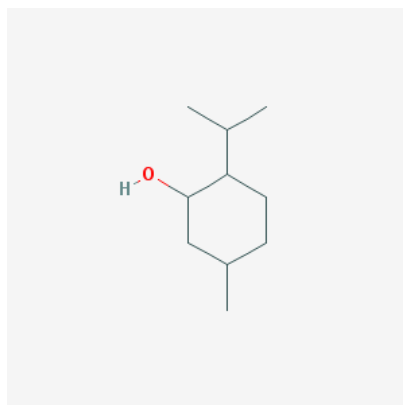
Dostupni podaci ukazuju da je najverovatniji put metabolizma karveola u organizmu konjugacija sa glukuronskom kiselinom a zatim ekskrecija, dok je manje prisutan put oksidacije bočnog lanca uz pomoć konjugacije. U svakom slučaju, smatra se da se na kraju metabolizma karveola stvaraju netoksični metaboliti.

U testovima akutne toksičnosti karveola na pacovima nakon peroralne aplikacije, vrednosti LD<sub>50</sub> su iznosile 3 g/kg T.M. Akutna dermalna toksičnost LD<sub>50</sub> kod zečeva iznosila je 5 g/kg telesne mase. U testovima nije dokazano da postoji kancerogenost i genotoksičnost. U testovima aplikacije na zdravu i oštećenu kožu, karveol u 4 % rastvoru petroleja nije pokazao iritacije u toku 48 sati. Zbog svojih poznatih bezbednih efekata karveol je od strane Američke agencije za hranu i lekove odobren kao aditiv za ljudsku upotrebu 1965. godine. Evropska agencija za hranu 1970. godine je stavila karveol na listu aditiva za hranu bezbednih za svakodnevnu upotrebu u ishrani ljudi.

#### **2.4. Mentol, aktivni sastojak esencijalnog ulja nane**

Mentol je veoma dobro poznato jedinjenje široj javnosti. Mentol je monoterpenoid (5-metil-2-propan-2-ilcikloheksan-1-ol), organsko jedinjenje prirodnog ili sintetskog porekla. Prirodni mentol se nalazi kao sastojak u visokom procentu u etarskom ulju nane (*Mentha piperita*) sa karakterističnim ukusom i mirisom. U literaturi su davno opisana svojstva mentola kao lokalnog anestetika kao i pozitivna analgetska

dejstva arome mentola na kožu i sluznice (Patel i sar., 2007). Hemijska struktura mentola prikazana je na slici 3 (Menthol - Pubchem).



**Slika 3.** Hemijska struktura mentola

Mentol ( $C_{10}H_{20}O$ ) je po svom fizičko-hemijskom sastavu beli kristalni prah, prijatnog ukusa i mirisa, molekulske mase 156.269 g/mol. U supstanci se najčešće može nabaviti kao kristalni rastvor, kristali ili granule, ukusa i mirisa nane (O'Neil, 2013). Veoma dobro se rastvara u etanolu, hloroformu, etru i glacijalnoj sirćetnoj kiselini, dok se slabije rastvara u vodi.

Monoterpenoid mentol je organsko jedinjenje dobijeno iz biljke nane kao ulje mente ili je sintetički napravljeno sa karakterističnim mirisom i svojstvima lokalnog anestetika. Prirodni mentol postoji kao jedan čist stereoizomer (1R, 2S, 5R). Poznato je da se mentol uveliko koristi kao prirodni proizvod u kozmetičkoj industriji, kao agens za aromatizovanje, ili kao intermedijer u proizvodnji drugih jedinjenja. Različiti ekstrakti iz lista nane sadrže mentol kao glavni aktivni sastojak, koji su se u prošlosti koristili kao tradicionalni lekovi za niz bolesti, uključujući infekcije, nesanice, sindrom iritabilnog creva, kao i repelent za insekte. Danas je njegova upotreba u dermatologiji sveprisutna, gde je često deo preparata za lokalnu primenu kao antipruritik, antiseptik, analgetik i kao deo formulacija za hlađenje (Farco i Grundman, 2013). Uprkos širokoj upotrebi, tek nedavno je otkriven mehanizam kojim mentol izaziva isti osećaj hlađenja kao i niska temperatura, otkrićem receptora TRPM8. Mentol je aktivni sastojak u mnogim poznatim analgeticima koji izazivaju osećaj hlađenja delujući na receptor



prolaznog potencijala melastatin 8 (TRPM8) (Peier i sar., 2002). Zbog svoje široke upotrebe u aktuelnim proizvodima, važno je razumeti kako mentol prodire kroz kožu i utiče na protok krvi i rad čulnih receptora. Mentol gel izaziva vazodilataciju malih krvnih sudova lokalizovanih u koži (Craighead i Alexander, 2016). Mentol deluje na TRPM8 receptore pomoću brzog povećanja intracelularnog kalcijuma i mobilisanja unošenja kalcijuma kroz kanale, indukujući hladjenje na mestu aplikacije. Biološke aktivnosti mentol ispoljava i kroz citotoksične efekte u ćelijama raka, indukuje smanjenje rasta malignih ćelija, a dovodi i do sinergetske aktivacije GABA receptora i natrijumovih jonskih kanala prouzrokujući analgeziju (Farco i Grundman, 2013). Iz studija rađenim o metabolizmu izomera mentola (L-, D, L+) može se zaključiti da se mentol dobro apsorbuje oralnim putem. Apsorpcija preko kože je dosta sporija nego oralna apsorpcija.

*Mentha piperita* poznatija kao pepermint, ima komponente sa lekovitim dejstvima u svim delovima biljaka, uključujući lišće i cvetove. Vidal i saradnici (2007) su pokazali da mentol ispoljava toksične efekte na trofozoite parazita *Giardia lamblia*. Dejani i saradnici (2014) su objavili da 100 mg/kg mentola ispoljava antiparazitske i imunomodulatorne aktivnosti protiv eksperimentalne infekcije parazitom *Shistosoma mansoni*.

Podaci o akutnoj toksičnosti mentola pokazuju da je kod eksperimentalnih životinja bilo niske akutne toksičnosti nakon oralnog unošenja, parenteralno i preko kože. Neke od blagih promena izazvanih mentolom su se mogle videti na jetri i bubrezima nakon oralne aplikacije. Udisanje mentola može da proizvede blage promene na respiratornom sistemu. Nema dokaza o kancerogenosti ovog jedinjenja kod pacova i miševa ili teratogenih efekata kod miševa, pacova, zečeva i hrčaka. Takođe, testovi nisu identifikovali nikakav genotoksični potencijal mentola. Sa druge strane, pokazano je da mentol u visokim koncentracijama dovodio do blage senzitivizacije kože kod čoveka. Aplikovan intraokularno dovodio je iritacije sluznice rožnjače kod kunića samo ukoliko su primenjene veoma visoke doze.

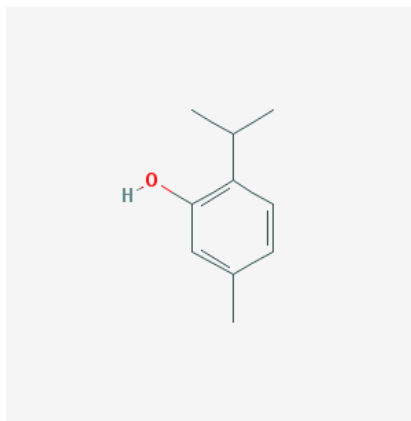
Opisano je da LD<sub>50</sub> za pacove nakon oralne aplikacije iznosi 2.9 g/kg telesne mase. Nakon intramuskularne aplikacije LD<sub>50</sub> je iznosio 10 g/kg. Kod mačaka posle oralne aplikacije LD<sub>50</sub> je 1.5 g/kg, kod je miševa nakon subkutane aplikacije 1.4 g/kg telesne mase. Kod pacova tretiranih intraperitonealno LD<sub>50</sub> je 750 mg/kg. U literaturi

nalazimo i da je kod kunića nakon intradermalnog nanošenja mentol ispoljio vrednosti LD<sub>50</sub> veće od 5 g/kg. Takođe se navodi da je kod kunića LD<sub>50</sub> mentola nakon intraperitonealne aplikacije bila 2 g/kg telesne mase.

## 2.5. Timol, aktivni sastojak esencijalnog ulja timijana

Kao što smo već ranije objasnili, aktivni sastojci etarskih ulja nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka. Kao glavni aktivni princip iz etarskog ulja timijana *Thymus vulgaris* (pitoma majčina dušica) ističe se timol. Timol se pojavljuje u obliku bezbojnih velikih kristala, mirisa na timijan, aromatičnog i ljutog ukusa. Zagrevanjem se topi i sublimuje. U vodi se ne rastvara, a lako se rastvara u etanolu, hloroformu, masnim kiselinama i etarskim uljima. Rastvara se i u bazama (NaOH) gradeći fenolat. Pored timola u etarskom ulju timijana pominje se i karvakrol, koji predstavlja njegov izomer. Iako su timol i karvakrol izomeri koji imaju identične sve hemijske parametre, osim male razlike u lipofilnosti, pokazuju različitu hemijsku reaktivnost. To je posledica položaja izopropil grupe u odnosu na hidroksilnu grupu. Kod timola izopropil grupa se nalazi u orto položaju, jače odbija elektrone od metil grupe i ugljenik za koji je vezana hidroksilna grupa ima manju potrebu da privlači elektrone. Takođe su jači sterni efekti izopropil grupe u odnosu na metil grupu i sve to čini hidroksilnu grupu manje reaktivnom (Slika 4). Na osnovu iznešenog može se konstatovati da je karvakrol reaktivniji od timola. Klinička studija Edwin i sar. (2006) je pokazala značaj hidroksilne grupe na aktivnost karvakrola. Efekat hidroksilne grupe nije mogao biti upoređen u odnosu na p-cimen zbog različitih fizičko-hemijskih osobina ova dva jedinjenja, pa se u ovom ispitivanju koristio 2-amino-p-cimen koji je analogan karvakrolu (slična hidrofobnost i strukturne karakteristike, slična antimikrobna aktivnost na bakterijske membrane, koja pokazuje da za aktivnost karvakrola nije neophodna sama po sebi hidroksilna grupa). Studija je pokazala da karvakrol ima 3 puta veću aktivnost u odnosu na 2-amino-p-cimen-a, što navodi na zaključak da hidroksilna grupa pojačava antimikrobno dejstvo karvakrola.

Timol je formiran u obliku bezbojnih kristala, često i u obliku krupnog belog praha. Na slici 4 prikazana je hemijska struktura timola (Thymol-Pubchem).



**Slika 4.** Hemijska struktura timola

Molekulska masa timola iznosi 150.22 g/mol. Kao fenol po svom sastavu, timol je dobijen iz majčine dušice i drugih isparljivih ulja. Danas se uveliko koristi kao stabilizator farmaceutskih preparata. Hemijski gledano timol je monoterpenski fenolni derivat cimena, a na tržištu se nalazi kao hidrid *p*-cimena. Koristi se kao pesticid (insekticid, fungicid, rodenticid), takođe se koristi u parfimerijskoj industriji, kao konzervans i kao antioksidans. U SAD uključen je od strane FDA (Food and Drug Administration) kao supstanca koja poseduje antibakterijska i antifungalna svojstva, a odobren je i kao ekscipijens. Kod ljudi, s obzirom na široku primenu, dovodi do primarne iritacije kože i senzibilizacije kože samo u retkim slučajevima. Smatra se da timol dovodi do blage lokalne iritacije nakon duže primene na jednom mestu aplikacije.

Posle akutne oralne primene timol nije štetan ali je kod kunića korozivan za kožu i oči. Pacovi izloženi subhroničnim dozama primenom u hrani u periodu od 19 nedelja tolerišu timol u nivou od 10000 ppm. Timol nije povećavao učestalost spontanih tumora pluća kod miševa. Nakon jednokratne aplikacije timola u literaturi su opisane sledeće srednje letalne doze za laboratorijske životinje (LD<sub>50</sub> pacova nakon oralnog unošenja 980 mg/kg telesne mase; LD<sub>50</sub> miševa nakon oralnog unošenja 640 do 1800 mg/kg telesne mase; LD<sub>50</sub> pacova nakon dermalne primene >2 g/kg telesne mase). Ukoliko analiziramo vrednosti LD<sub>50</sub>, možemo zaključiti da je timol bezbedan za potencijalnu primenu u terapiji pojedinih oboljenja ljudi i životinja.

## 2.6. Morfologija i fiziologija nematoda na primeru parazita *A.suum* i slobodnoživeće nematode *Caenorhabditis elegans*

*Ascaris suum*, takođe poznat kao velika svinjska glista, parazitska je nematoda koja izaziva oboljenje Askarijaza svinja. Ova nematoda je prisutna i rasprostranjena širom sveta. Ženke ovog parazita rastu i do 40 cm u dužinu. Životni ciklus može biti direktni ili indirektni. Svinja se inficira tako što proguta jaje askarisa u kome se nalazi larva u stadijumu L2. Larve potom migriraju iz creva u jetru, presvlače se u L3 oblik, a potom migriraju u pluća. Zatim životinja iskašlja larve iskašljavaju i može da ih ponovo proguta. Na kraju ciklusa migracije u crevima razvijaju se adultni oblici ovog parazita. Mužjaci su dužine oko 15-31 cm i 2-4 mm širine. Zadnji deo tela je zakrivljen prema ventralnoj strani. Ženke su veće od mužjaka, dimenzije su 20-49 cm dužina i 3-6 mm širina. Ženke polažu 200.000 jaja dnevno, a njihova materice može da sadrži i do 27 miliona jaja. Na slici 5. prikazano je jaje *Ascaris suum*. Na slici 6. prikazan je adultni oblik *Ascaris suum*.

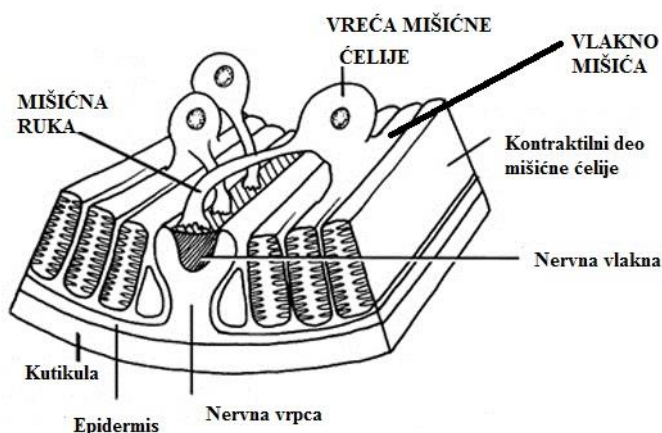


**Slika 5.** Jaje *Ascaris suum*-a



**Slika 6.** Adultni oblik *A. suum*

Smatra se da somatske mišićne ćelije *Ascaris suum*-a imaju drugačiju strukturu u poređenju sa istom vrstom ćelija kod kičmenjaka. Mišićne ćelije askarisa poseduju 3 različita regiona: vretenasti ili vlaknasti, vrećasti i region ručice (Ivanović, 2013). Na slici 7 prikazana je nervnomišićna struktura *A.suum* (<https://projects.ncsu.edu>).



**Slika 7.** Neuromišićna struktura *A. suum*

U literaturi se navodi da dorzalna grupa mišićnih ćelija inervaciju dobija od motornog aksona poreklom iz dorzalne nervne vrpce, a ventralna grupa mišića svoju inervaciju dobija od ventralne nervne vrpce.

Region vlakna ili vretena somatske mišićne ćelije u sebi sadrži strukture bogate aktinom i miozinom i to je kontraktilni deo ćelije. Smatra se da su aktin i miozin raspoređeni ukoso i longitudinalno što ćeliji omogućava veoma brze kontrakcije. Pored ova dva kontraktilna filameta u ovom delu se nalaze i druge filamentozne strukture čija je prevashodna uloga u kontrakciji parazita.

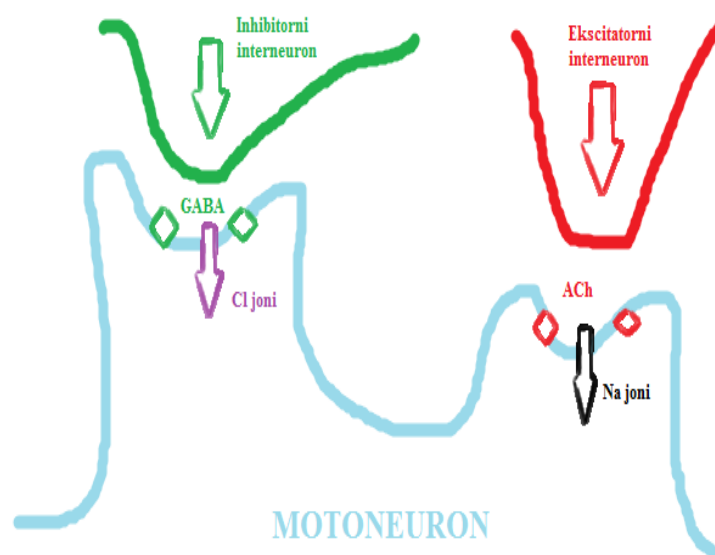
Region vreće somatske mišićne ćelije sadrži jedro i strukture zadužene za metabolizam ćelije. Tu se nalaze depoi energije u vidu glikogena. Smatra se da ovaj deo ćelije služi da pomaže aktivnost regiona vlakna i regiona ruke. Veličina regiona vreće somatske mišićne ćelije iznosi 150-250  $\mu\text{m}$ .

Region mišićne ruke predstavlja direktnu komunikaciju mišićne ćelije sa nervnom vrpcom. Za razliku od kičmenjaka gde aksoni idu iz nervnih struktura do mišićne ćelije i prave sinapse, ovde se iz mišićne strukture pruža izdanak u vidu ruke koji prihvata signale iz nervnog vlakna. U građi svake mišićne ćelije askarisa može se videti po nekoliko ruka koje je povezuju sa nervnom strukturom. Svaka od mišićnih ruka pravi komunikacije sa nevom. To omogućava odličnu povezanost između mišićnih

ćelija, sinhronizovano prenošenje električnih impulsa, a samim tim i dobro koordinisanu i veoma brzu mišićnu kontrakciju nematode.

Posebna mišićna struktura u glavenom regionu nematode predstavlja farinks adultne *A. suum*. Smatra se da je farinks veoma bitna struktura za život nematode, zato što u toku hranjenja pumpa sve hranjive materije u crevo. Farinks je dužine oko 1cm i lumen mu je zatvoren kada su mišićne ćelije relaksirane, dok njihova kontrakcija otvara lumen (Marr i sar., 2003).

Po svojoj građi nervni sistem nematode *A. suum* je vrpčast. Na telu parazita nalazi se dorzalna, lateralna i ventralna nervna vrpca. Svega 300 neurona koliko ih ima ova nematoda, raspoređeni su u regionu glave i jednim manjim delom u repu parazita. Sve mišićne ćelije dobijaju inervaciju od dorzalne i ventralne vrpce, dok je lateralna vrpca povezana sa ekskretornim kanalom. Između motoneurona i ventralne nervne vrpce nalaze se relejne ćelije ili interneuroni. Gama-amino-buterna kiselina (GABA) je neurotransmiter uključen u slanje inhibitornih impulsa iz interneurona u motoneurone. Smatra se da GABA otvara hloridne kanale na postsinaptičkoj membrani i omogućava ulazak jona hlora iz ekstracelularnog u intracelularni prostor, što ima za posledicu smanjenje rezistencije ćelijske membrane i hiperpolarizaciju postsinaptičke membrane (Trailović, 2001). Na slici 8 šematski je prikazana sinaptička struktura nematode *A. suum*.



**Slika 8.** Šematski prikaz sinaptičke strukture nematode *A. suum*.

U poslednje vreme pominju se potencijalno novi alternativni modeli koji se mogu koristiti za istraživanja antiparazitskog dejstva lekova. Posebnu pažnju privukao je jedan valjkasti crv pod nazivom *Caenorhabditis elegans*. Pomenuta nematoda spada u grupu valjkastih crva, sa glatkom kutikulom, nesegmentisan, dugog cilindričnog oblika tela zakrivljenog na krajevima. To je slobodnoživeća nematoda, potpuno bezopasna, neinfektivna, nepatogena i neparazitskog načina života. *C. elegans* je veoma malih dimenzija, raste do oko 1 mm u dužinu, živi u zemljištu koje ima mnogo vegetacije koja truli. Nalazi se u mnogim delovima sveta, preživljava hraneći se mikroorganizmima, kao što su truležne bakterije zemljišta. Opisano je da postoje dva polna oblika kod ove nematode: hermafrodit koji sam sebe oploduje i mužjaci. Odrasli organizam je cevaste građe, sadrži eksterijernu kutikulu, u sebi poseduje dve manje cevi, ždrelnu i crevnu, kao i reproduktivni sistem. Najveći deo obima životinje zauzimaju organi reproduktivnog sistema. Od 959 somatskih ćelija koliko ih hermafrodit poseduje, njih oko 300 su neuroni. Adultni mužjaci imaju ukupno 1031 somatsku ćeliju. Nervne strukture obuhvataju sistem čulnih organa u glavi koji posreduju u odgovoru na miris, temperaturu i dodir. Mada *C. elegans* nema oči, može neznatno da reaguje na svetlost. Ostale nervne strukture čine prednji nervni prsten sa ventralnom nervnom vrpcom koja se pruža duž tela. Postoji i dosta manja dorzalna nervna vrpca. U telu ove nematode nalazi se ukupno 81 mišićna ćelija. Kretanje *C. elegans* se odvija pomoću četiri uždužne grupe mišića koje su uparene sub-dorzalno i sub-ventralno. Alternativno savijanje i opuštanje generiše dorzalni-trbušni talas koji se prostire duž tela, čineći koordinisane pokrete životinje. Celokupan razvoj i funkcija ovog organizma kodirana je sa 17800 različitih gena koji kodiraju 20470 proteina.

Veoma važnu funkciju u životu ove nematode ima farinks. To je mišićni organ u glavenom regionu, na poprečnom preseku trouglastog oblika. Funkcija mu je da melje hranu, pumpa i transportuje direktno u creva. Geni koji kontrolišu razvoj i funkciju nematodnih tkiva su "konzervisani" u evoluciji još od zajedničkog pretka. Iako postoje jasne i bitne razlike u ljudskom i nematodnom razvoju, naučnici mogu da proučavaju razvojne mehanizme kod *C. elegans* i da razumeju osnovne mehanizme koji takođe postoje kod ljudi i životinja. Ovo je izuzetno važno, jer su mnogi genetički eksperimenti nemogući kod ljudi, dok su veoma duga i skupa istraživanja na miševima i drugim kičmenjacima. Sa druge strane *C. elegans* je lako kultivisati u laboratoriji. Na

temperaturi od 20°C ima kratak (4 dana) generacijski interval. Istraživanja na *C. elegans* su relevantna za mnoge bolesti poput kancera, neurodegenerativnih oboljenja (npr. Alchajmerova bolest), neurorazvojnih invaliditeta i sindroma, mišićne distrofije, starenja i mnogih drugih. Zbog svega navedenog ova nematoda se pokazala kao odličan alternativni model u biomedicinskim istraživanjima generalno. Konkretno u ovoj disertaciji *C. elegans* je korišćen da bi se ispitao potencijalni antinematodni efekat karvakrola i timola. Na slici 9 prikazan je adultni oblik *C. elegans* koji se uzgaja u laboratoriji Katedre za Farmakologiju i toksikologiju.



**Slika 9.** Adultni *Caenorhabditis elegans*

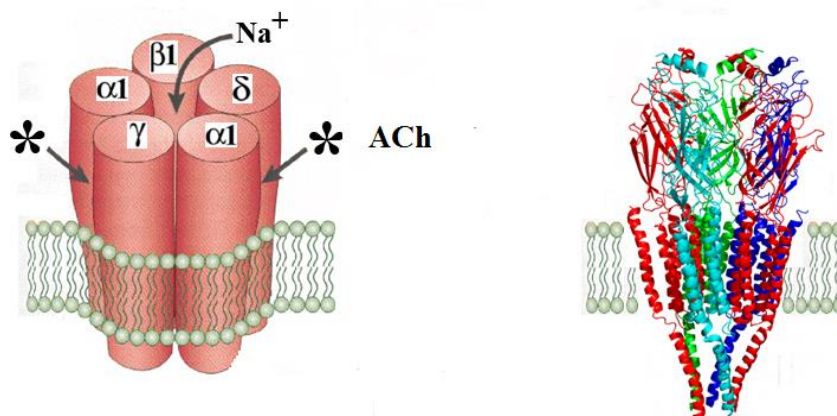
Tokom poslednjih decenija slobodnoživeća nematoda *Caenorhabditis elegans* dala je mogućnost da se primenom molekularnih genetičkih tehnika ispituju mehanizmi delovanja antihelmintika i drugih nematocidnih supstanci (Holden-Dye i Walker, 2014). Rađene su studije gde je ispitivan efekat albendazola na održivost, morfologiju i ultrastrukturu različitih životnih faza *Caenorhabditis elegans*. Svetlosnom i elektronskom mikroskopijom analize su pokazale oštećenje organizma odraslih i larvenih oblika ove nematode. Opisana studija je potvrdila značaj *C. elegans* kao skrining sistema za jedinjenja sa potencijalnom antihelmintičkom aktivnošću i pokazala efekte albendazola na njene različite životne faze razvoja (Sant'anna i sar., 2013).



## 2.7. Struktura holinergičkih i GABA receptora sisara i nematoda

### 2.7.1. Holinergički receptori sisara

Kada govorimo o holinergičkom receptoru sisara, najčešće se navodi podatak da je on integralni transmembranski protein za koji se vezuje neurotransmiter acetilholin (ACh). Njegov tipičan predstavnik je **nikotinski receptor** koji predstavlja jonski kanal koje otvara ligand (ligand-zavisni jonski kanali). Ovaj receptor se sastoji se iz ukupno 5 subjedinica ( $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), simetrično postavljenih oko centralne pore, sa molekulskom masom od 290 kD. Mesto vezivanja agonista se nalazi u ekstracelularnom domenu blizu N-terminusa. Kada se agonista veže, sve prisutne podjedinice podležu konformacionoj promeni i kanal se otvara. Na slici 10 prikazana je struktura nikotinskog acetilholinskog receptora ([www.intechopen.com/nicotinic acetylcholine receptor](http://www.intechopen.com/nicotinic-acetylcholine-receptor)).



**Slika 10.** Struktura nikotinskog acetilholinskog receptora

Kod sisara, postoji 16 različitih nAChR subjedinica: devet različitih  $\alpha$ -subjedinica ( $\alpha 1-7$ ,  $\alpha 9$  i  $\alpha 10$ ), četiri  $\beta$ -subjedinice ( $\beta 1-4$ ), kao i  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  subjedinice. Pet od ovih subjedinica se kombinuju da formiraju mišićne nAChR podtipove ( $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$  and  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ ) koje se nalaze u neuromuskularnih sinapsama, a ostatak ( $\alpha 2-\alpha 10$ ,  $\beta 2-\beta 4$ ) za okupljanje u brojnim homomernim (ima isključivo  $\alpha$ -subjedinice) ili heteromernim (ima nivo  $\alpha$  - i  $\beta$ -subjedinice) neuronskim nAChR podtipovima (Albuquerque i sar., 2009). Smatra se da različiti homomerni i heteromerni receptori imaju različite farmakološke karakteristike (Robertson i sar., 2007). Združeni različiti pentameri formiraju složenu strukturu različitih nAChR podtipova sa različitim farmakološkim i biofizičkim

svojstvima. Raznolikost se dodatno povećava kada je uključeno više  $\alpha$  ili  $\beta$  subjedinica u istom pentameru (npr.  $\alpha 6\alpha 5\beta 3$  ili  $\alpha 6\beta 2\beta 3$ ) (Hurst i sar., 2013). U principu, svaka subjedinica jednog nAChR se može podeliti na dva dela: ekstracelularni vezujući domen (EVD) savijen u jezgra  $\beta$ -sendviča je i transmembranski kanalski domen (TKD) koji se sastoji od četiri  $\alpha$ -spiralnih membranskih segmenata (M1-M4). Svaka eukariotska nAChR subjedinica sadrži i intracelularni domen (ICD) se sastoji od približno 100 aminokiselina definisanih kao M3-M4 petlje (Kabbani i sar., 2013).

U literaturi je opisano da kod kičmenjaka postoje dva glavna tipa nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR). Predstavnici su neuromišićni i neuronski tip. **Neuronski tip** nikotinskog acetilholinskog receptora nalazi se u CNS i svim autonomnim ganglijama. **Neuromišićni tip** receptora se nalazi na neuromišićnim sinapsama skeletne muskulature. Na postsinaptičkoj mišićnoj membrani identifikovana su tri podtipa nAChR: fetalni mišićni –  $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ , adultni mišićni –  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$  i neuronski –  $\alpha 7$  podtip nAChR (Trailović i sar., 2011).

Pored klasičnog mišićnog tipa nAChR koji sadrži  $\alpha 1$  subjedinicu, neuromišićna sinapsa sadrži presinaptički i  $\alpha 2\beta 3$  neuronski tip nAChR. Ovaj tip receptora je odgovoran za pojačano oslobađanje ACh (autoreceptori). To u stvari znači da ACh aktivacijom ovih autoreceptora može pojačati svoje sopstveno oslobađanje (presinaptička modulacija). Odsustvo ovog efekta tokom neuromišićne blokade (pojava se označava se kao tetanično slabljenje - „*tetanic fade*“), smatra se da nastaje kao posledica inhibicije navedenog presinaptičkog autoreceptora na nervnom završetku (Trailović i sar., 2011).

U vezi sa prethodno opisanim strukturama, mehanizam mišićne kontrakcije objašnjava se na sledeći način. Naime, acetilholin difunduje preko sinapsi i vezuje se za nikotinske acetilholinske receptore na neuromišićnoj sinapsi. Aktivacija nikotinskog receptora otvara brze natrijumske kanale, dovodeći do ulaska  $\text{Na}^+$  jona, i sporog izlaska jona kalijuma. Kao rezultat toga, mišićna membrana menja polaritet čiji napon brzo raste iz potencijala mirovanja membrane koji iznosi  $-90\text{mV}$  do nivoa visokog potencijala od  $+75\text{mV}$ , nakon ulaska jona natrijuma. Potencijal membrane postaje hiperpolarizovan, a zatim dolazi do sporog izlaska jona kalijuma da bi se potencijal membrane vratio na potencijal mirovanja. Ovaj talas jonskih struja stvara akcioni potencijal koji se širi iz postsinaptičke membrane u svim pravcima. Acetilholin se u

sinaptičkoj pukotini razgrađuje dejstvom enzima. U prisustvu funkcionalne acetilholinesteraze molekul acetilholina se razgrađuje veoma brzo. Funkcija ovog enzima je upravo da ograniči koncentraciju acetilholina u sinaptičkoj pukotini i vreme njegovog prisustva na postsinaptičkoj mišićnoj membrani, i tako spreči produženo delovanje neurotransmitera na nikotinskim receptorima. Pod određenim uslovima i sam acetilholin može da izazove nervnomišićnu blokadu. Opisana je pojava kada je acetilholin na motornoj ploči prisutan u veoma visokoj koncentraciji (ACh aplikovan spolja u višim koncentracijama od fizioloških, dovodi do inhibicije acetilholinesteraze). Fenomen koji se pritom javlja naziva se “blokada depolarizacijom” i do nje dolazi usled produžene depolarizacije postsinaptičke mišićne membrane, kada acetilholin u višku blokira dalju kontrakciju.

### **2.7.2. Specifičnosti holinergičkog receptora nematoda**

Nematode su najniži evolutivni red u životinjskom carstvu koje kao neurotransmiter koriste ACh (Colquhoun i sar., 1991). Kod njih se proces prenošenja signala i procesa mišićne kontrakcije odvija upravo preko ovog neurotransmitera. Na somatskim mišićnim ćelijama nematoda nalazi se nikotinski acetilholinski receptor i njegova glavna funkcija je u kretanju parazita. Nikotinski acetilholinski receptor nematoda je najčešće opisivani kao ciljno mesto delovanja holinergičkih antinematodnih lekova. U istraživanjima nikotinskog receptora nematoda pokazano je da je sličan neuronskom tipu nikotinskog acetilholinskog receptora kod kičmenjaka jer je neosetljiv na blokadu  $\alpha$ -bungarotoksinom. To ukazuje da mišićni nAChR nematoda ispoljava farmakološke i biofizičke sličnosti sa neuronskim tipom nAChR kičmenjaka. Međutim, iako postoje sličnosti, bitna razlika je u tome što se selektivni terapijski efekat postojećih antinematodnih lekova koji deluju kao agonisti nikotinskog receptora, zasniva na farmakološkim razlikama između ovih receptora. Postojeći antiparazitici koji deluju kao agonisti nikotinskog receptora (npr. pirantel, morantel, befinijum), svoje dejstvo ispoljavaju preko nikotinskog acetilholinskog receptora dovodeći do spastičke paralize, bez razlaganja od strane acetilholinesteraze. Ovi lekovi dovode do depolarizacije mišićne ćelije otvaranjem neselektivnih katjonskih kanala, dovodeći do pojave spazma mišića i smrti parazita.

Kao što smo već pomenuli, smatra se da je nikotinski receptor nematoda sličniji neuronskom tipu nikotinskog receptora kičmenjaka. Komparativno su ispitivane razlike između pojedinih nematoda. Tako su kod *Ascaris suum* dokazana tri podtipa nAChR na membrani mišićne ćelije: L-tip (preferira levamizol i pirantel kao agonistu), N-tip (preferira nikotin i oksantel kao agonistu) i B-tip (preferira befinijum kao agonistu) (Robertson i sar., 2007). Ovi lekovi posledično otvaraju i različite tipove jonskih kanala, koji se razlikuju osim po farmakološkim (različiti agonisti) i po biofizičkim karakteristikama (različita kinetika otvaranja). Levamizol aktivira L-tip kanala, ali u manjoj meri otvara i N i B-tip jonskih kanala. Befinijum pre svega otvara B-tip kanala, ali i L-tip, dok na N-tip ne deluje. Antihelmintici koji deluju kao agonisti nikotinskog receptora, pokazuju selektivnost za različite tipove nikotinskog receptora. Selektivnost za pojedine tipove nikotinskih receptora prisutna je i kod antagonista nikotinskog receptora (paraherkvamid i 2-deoksi-paraherkvamid).

Rađena su istraživanja sa proteinskim tirozin-kinazama, koja su pokazala da postreceptorska modifikacija može promeniti odgovor na lek i može učestvovati kao faktor u razvoju rezistencije. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da rezistencija na levamizol ne zahteva ultimativno i promenu aminokiselina na mestu vezivanja leka za receptor, već da može uključivati i regulaciju aktivnosti receptora kroz promene stanja njegove fosforilizacije (Trailović i sar., 2002).

Napominjemo da pored nikotinskog acetilholinskog receptora nematode poseduju i muskarinski holinergički receptor. On je po tipu metabotropni G-protein kuplovani receptor. Iako se razlikuje od sisarskih muskarinskih receptora, nematodni muskarinski receptor je osetljiv na klasične muskarinske antagoniste, kao što su atropin i 4-DAMP. Još uvek se ispituje njihova uloga u nervnomišićnom sistemu parazitskih nematoda.

### 2.7.3. Struktura GABA receptora nematoda

Evolutivno gledano, smatra se da je GABA kao neurotransmitter starija od acetilholina. U literaturi se navodi da se kod nekih pljosnatih crva evolutivno prvi put pojavljuje primitivni centralni nervni sistem, gde molekul GABA ima inhibitorni efekat

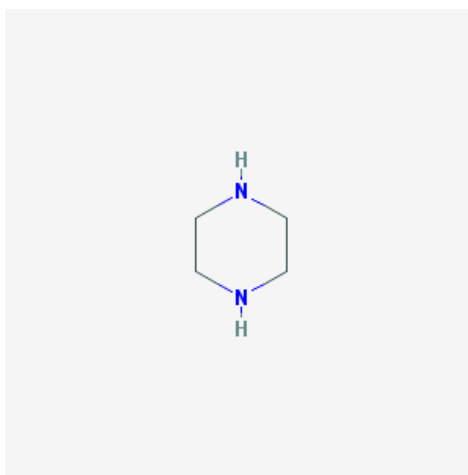
u pogledu neurotransmisije. Kod nematoda GABA predstavlja glavni inhibitorni neurotransmiter (Holden-Dye i Walker, 2014).

Do sada je kod sisara opisano tri tipa GABA receptora: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> i GABA<sub>C</sub> receptor. GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>C</sub> receptori su hloridni jonski kanali, dok je GABA<sub>B</sub> po tipu metabotropni (*G-protein-kuplovani*) receptor. Iako GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>C</sub> receptori pripadaju istoj vrsti (ligand-zavisni jonski kanali; "*ligand-gated ion channels*"), između njih postoje farmakološke, molekularne i funkcionalne razlike.

Komparativno gledano za razliku od vertebrata, gde GABA primarno deluje u sinapsama CNS, kod invertebrata ona deluje na nervno-mišićnoj sinapsi. Kod nematoda, GABA deluje na relaksaciju telesne muskulature, otvaranjem hloridnih kanala. Smatra se da se GABA receptori invertebrata ne uklapaju u klasifikaciju sisarskih GABA receptora (GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub>), ali je ipak većina njih slična sisarskom GABA<sub>A</sub> tipu receptora (Trailović i sar., 2011). Još od otkrića ovih supstanci, smatra se da su svi makrolidni antinematodni lekovi agonisti GABA receptora. Pored toga oni pojačavaju endogeno oslobađanje ove inhibitorne aminokiseline, kao i njeno vezivanje za GABA receptore. Pored efekta preko GABA receptora, u novije vreme otkriveno je da deluju i kao agonisti glutamat-zavisnog hloridnog kanala. Ovakvo dejstvo avermektina i milbemicina prouzrokuje snažnu i produženu hiperpolarizaciju parazitskih neurona i posledičnu inhibiciju neurotransmisije. Selektivna toksičnost ovih supstanci proističe iz činjenice da ne prolaze kroz krvno-moždanu barijeru sisara, te zbog toga ne ispoljavaju efekte u CNS-u domaćina (Trailović, 2001). Kod *A. suum*, ivermektin se pod određenim okolnostima ponaša kao nekompetitivni antagonist nAChR (negativna alosterična modulacija), odnosno nekompetitivno antagonizuje acetilholinsku depolarizaciju i mišićnu kontrakciju askarisa. Najpoznatiji agonista GABA receptora kod nematoda svakako je piperazin.

Piperazin je početkom 20-og veka je prvobitno bio korišćen u terapiji gihta kod ljudi, zbog svoje poznate osobine da rastvara mokraćnu kiselinu. Njegova antihelmintička aktivnost ostala je nepoznata sve do 1950. godine. Nakon otkrića njegovog antihelmintskog dejstva sintetisani su brojni derivati, u vidu različitih soli piperazina (citrata, adipata). Sintetisani derivati piperazina ispoljili su aktivnost protiv gastrointestinalnih nematoda nekih vrsta domaćih životinja. Kao lek koji je registrovan za upotrebu u veterini, možemo reći da je piperazin dobro poznati antihelmintik koji se

koristi u terapiji askaridoze svinja i živine. Takođe, može se primenjivati u terapiji helmintoznih infekcija kod pasa, mačaka i konja. Po svom hemijskom sastavu je bezbojni kristal u obliku ljuspica, dobro rastvorljiv u vodi i etanolu. Njegova hemijska formula je  $C_4H_{10}N_2 \cdot 6H_2O$ , a molekulska masa 194,2 g/mol. Hemijska strukturna formula piperazina prikazana je na slici 11. (Piperazin - Pubchem).



**Slika 11.** Hemijska strukturna formula piperazina

Kao lek u terapiji helmintoznih infekcija dostupan je na tržištu u obliku nekoliko vrsta soli: citrat, adipat, fosfat, heksahidrat i dihidrohlorid. Ispitivanjima je pokazano da svaka od navedenih soli sadrži različite količine piperazina (baze): citrat (35%), adipat (37%), fosfat (42%), heksahidrat (44%), hlorid (48%), dihidrohlorid (50-53%) (Plumb, 2002). Nakon peroralne aplikacije, piperazin se brzo resorbuje iz prednjih partija digestivnog sistema. Kod prasadi, kojima je  $^{14}C$ -piperazin-dihidrohlorid aplikovan peroralno u dozi od 300 mg/kg ( što je ekvivalentno 154,5 mg/kg telesne mase piperazin baze), maksimalna koncentracija u plazmi ( $C_{max}$ ) od 22,75  $\mu g/ml$  zabeležena je 1 sat od administracije leka. Kod kokošaka nosilja, kojima je primenjena ista doza  $^{14}C$ -piperazin-dihidrohlorida (300 mg/kg – što je ekvivalentno 154,5 mg/kg telesne mase piperazin baze), pik plazma koncentracija ( $C_{max}$ ) od 26,72  $\mu g/ml$  zabeležena je takođe 1 sat od primene leka (EMEA, 1999). Ako posmatramo toksičnost ovog jedinjenja, piperazin se smatra lekom sa širokim granicama sigurnosti. Akutna peroralna  $LD_{50}$  piperazin-adipata kod miševa iznosi 11,4 g/kg. Smatra se da kod mačaka, znaci toksičnog dejstva piperazina javljaju 24 sata posle peroralno unete toksične doze. Znaci

trovanja ovim lekom podrazumevaju povraćanje, slabost, dispnoju, fascikulaciju mišića ušne školjke, depresiju, dehidraciju, nistagmus, usporeni pupilarni refleks (EMEA, 1999; Adams, 2001). U literaturi je opisano da je akutna peroralna letalna doza LD<sub>50</sub> piperazina za miševe 11,4 g/kg telesne mase (Copp i sar., 1958). Piperazin je kako je do sada opisano potentni agonista GABA receptora. Kod kičmenjaka GABA kao inhibitorni neurotransmitter poseduje aktivnost u CNS-u, dok se kod nematoda efekat ispoljava na sinapsama neuromišićnog aparata. Zbog navedenih činjenica, smatra se da se farmakološke osobine GABA receptora kičmenjaka i nematoda veoma razlikuju (Trailović i sar., 2010; Trailović i sar., 2015).

## **2.8. Antinematodni lekovi**

Antinematodni lekovi (antihelmintici) predstavljaju grupu lekova koji deluju nematocidno, odnosno ubijaju nematode ili nematostatski, onesposobljavaju i parališu nematode, posle čega one bivaju izbačene iz organizma domaćina peristaltičkim pokretima creva ili kontrakcijom glatke muskulature respiratornih puteva. Na osnovu hemijske strukture, antinematodni lekovi su podeljeni u nekoliko grupa: Prosta heterociklična jedinjenja (fenotiazin, piperazin i njegovi derivati), benzimidazoli (albendazol, mebendazol, fenbendazol), imidazotiazoli (levamizol, tetramizol, febantel), tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel), organofosfatna jedinjenja (dihlorvos, kumafos, trihlorfon), makrociklični laktone (avermektini i mibemicini) i derivati aminoacetonitrila (monepantel).

U ovom radu posebnu pažnju ćemo posvetiti grupi tetrahidropirimidina, kvaternim amonijumovim solima i aminoacetonitrilima čije smo supstance u našem istraživanju koristili da bismo objasnili mehanizme delovanja potencijalno novih supstanci poreklom iz esencijalnih biljnih ulja.

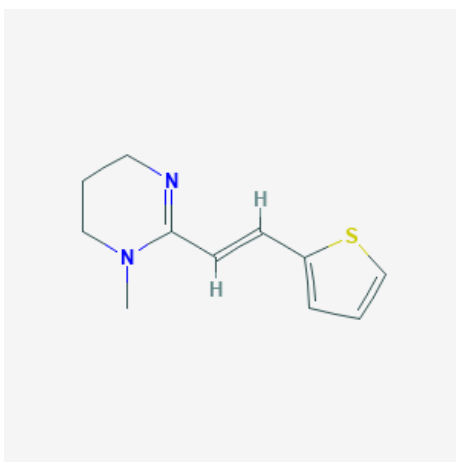
### **2.8.1. Tetrahidropirimidini i kvaternerne amonijumove soli**

U grupu lekova pod nazivom tetrahidropirimidini ubrajamo pirantel, morantel i oksantel. Po svom mehanizmu dejstva tetrahidropirimidini pripadaju holinomimetičkim

antihelminticima koji deluju kao ligandi nikotinskog acetilholinskog receptora nematoda (Gokbulut i sar., 2001; Holden-Dye i Walker, 2014 ).

### Pirantel

Kao predstavnik grupacije lekova pod nazivom tetrahidropirimidini, pirantel je po prvi put u kliničku praksu uveden davne 1966. godine, primarno u terapiji protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca i koza. Nedugo zatim počela je njegova primena u lečenju helmintoznih infekcija kod goveda, svinja, konja, a na kraju i kod pasa. Poznato je da je Američka uprava za hranu i lekove (*US Food and Drug Administration – FDA*) odobrila je primenu pirantela kod svinja, pasa i konja (Bjørn i sar., 1996).. Sa aspekta kliničke sigurnosti upotrebe, soli pirantela ne ispoljavaju toksične efekte kod životinja do prekoračenja preporučene terapijske doze i do sedam puta (*International Pharmacopoeia*, 2011). Akutna peroralna LD<sub>50</sub> pirantel-tartarata za miševe iznosi 175 mg/kg, dok je za pacove 170 mg/kg. Kod pasa, akutna peroralna LD<sub>50</sub> pirantel-tartarata je 690 mg/kg telesne mase (Hu i sar., 2009). Pirantel je prilično bezbedan za primenu kod konja i ponija svih uzrasta. Goveda tretirana sa pirantel-tartaratom u dozi od 200 mg/kg dolazi do pojave teške ataksije praćene zamorom. U literaturi je zabeleženo da u kliničkoj praksi životinje bolje podnose pirantel-pamoat od pirantel-tartarata (Adams, 2001; Katzung i sar., 2011). Na tržištu se pirantel nalazi u obliku dve soli: tartarata i pamoata (označava se još i kao embonat). Hemijska formula pirantela je C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>S, a molekulska masa iznosi 206.307 g/mol. Strukturna formula pirantela prikazana je na slici 12. (Pirantel - Pubchem).



Slika 12. Hemijska struktura pirantela



Navodi se da je pirantel-pamoat (embonat) žuti kristalni prašak, rastvorljiv u dimetil-sulfoksidu i gotovo nerastvorljiv u vodi. Hemijskim ispitivanjima pokazano je da je pirantel-tartarat rastvorljiv u vodi. Pomenute dve soli pirantela imaju i poprilično različite farmakokinetičke osobine, a samim tim i različitu toksičnost za domaćina. Literaturni podaci pokazuju da se pirantel-pamoat (embonat) slabo resorbuje iz digestivnog sistema i kao nepromenjen eliminiše se iz organizma putem fecesa. So pod nazivom pirantel-tartarat, koja je rastvorljiva u vodi, posle peroralne primene resorbuje se brzo iz creva monogastričnih životinja (Adams, 2001; Katzung i sar., 2011).

Kod pasa, nakon jednokratno peroralno primenjenog pirantel-pamoata (embonat) u dozi od 10 mg/kg, maksimalna koncentracija leka u krvnoj plazmi ( $C_{max}$ ) iznosila je 311,8 ng/ml, a postignuta je za 1,5 sat od primene leka (International Pharmacopoeia, 2011; Katzung i sar., 2011).

U ispitivanjima kod svinja određivani su i maksimalna koncentracija leka u krvnoj plazmi ( $C_{max}$ ) i vreme za koje se ta maksimalna koncentracija postiže ( $t_{max}$ ).

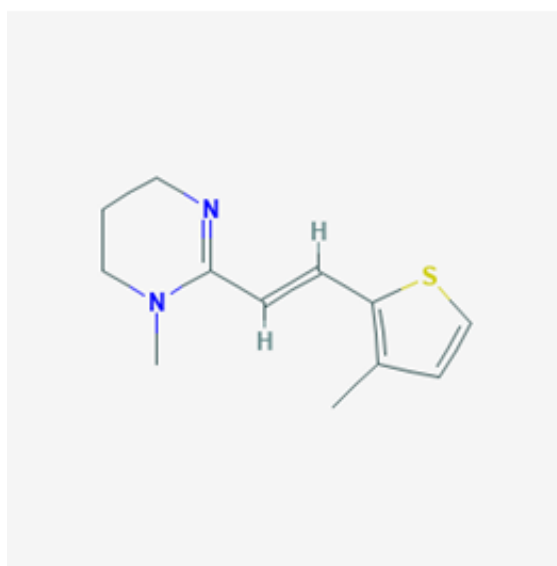
Pirantel citrat i pirantel pamoat primenjeni su jednokratno peroralno, u dozi od: 22,0 mg/kg (pirantel-citrat) i 32,84mg/kg (pirantel-pamoat). Dobijene su sledeće vrednosti: Za pirantel-citrat  $C_{max}$  je iznosila  $1,92 \pm 0,44$   $\mu\text{g/ml}$  i postignuta je za  $1,51 \pm 0,45$  sati ( $t_{max}$ ), dok je za pirantel-pamoat  $C_{max}$  iznosila  $0,23 \pm 0,06$   $\mu\text{g/ml}$  i postignuta je za  $3,26 \pm 0,64$  sata ( $t_{max}$ ) (Bjørn i sar., 1996).

### **Morantel**

Smatra se da ovo jedinjenje pripada grupi tetrahidropirimidinskih antihelmintika. Razlikuje se od svog srodnika pirantela zato što poseduje dodatak metil grupe na tiofenskom prstenu. Namenjen je za lečenje infekcija izazvanih nematodama i pantljičarama. Morantel i njegove soli se ne koriste u humanoj medicini. Kod goveda u laktaciji i izvan laktacije daje se u obliku morantel tartarata u formi sporo razgrađivih bolusa (11,8 g morantel baze po životinji) ili kao pojedinačna oralna doza od 6 do 7.5 mg morantel baze / kg telesne mase i kod svinja u jednoj dozi koja je ekvivalent 7,5 mg baze / kg telesne mase (Rickard i sar., 1989). Kod ovaca se za lečenje infekcija pantljičara i valjkastih glista aplikuje u obliku morantel citrata koja se aplikuje u jednoj dozi, koja je ekvivalentna 5 do 6 mg morantel baze / kg. Literaturni podaci pokazuju da morantel deluje kao potentni agonista nikotinskog acetilholinskog receptora na

mišićnim ćelijama nematoda (Vercruysse i sar., 1992; Qian i sar., 2006; International Pharmacopoeia, 2011). Aktivacija acetilholinskog receptora indukuje produženu spastičnu paralizu parazita i njegovo izbacivanje iz tela domaćina.

Morantel ( $C_{12}H_{16}N_2S$ ) je po svom hemijskom sastavu kristalne strukture, molekulske mase 220,3 g/mol. Hemijska strukturna formula prikazana je na slici 13. (Morantel - Pubchem)



Slika 13. Hemijska struktura morantela

Delimično je rastvorljiv u etanolu i vodi, najbolje u metanolu, a praktično nerastvorljiv u benzenu i etil acetatu. Na tržištu se nalazi u obliku dve soli. Morantel citrata i morantel tartarata. Morantel citrat je svetlo-žuti kristalni prašak, specifičnog mirisa, delimično rastvorljiv u vodi. Morantel tartarat je svetlo žuti prašak, nešto bolje rastvorljiv u vodi, a najbolje u metanolu.

Kod miševa se nakon oralne aplikacije morantel-citrata u dozi koja je ekvivalentna 50 mg baze/kg i nakon oralne aplikacije morantel tartarata u dozi koja je ekvivalentna 6 mg morantela baze/kg, u proseku se izlučuje oko 27 % preko urina za 24 sata.

Kod goveda nakon oralne aplikacije morantel tartarata u dozi koja je ekvivalentna 6 mg morantel baze/ kg, manje od 20 % se izlučuje urinom za 96 sati a preostali deo se izlučuje fecesom (69 %).

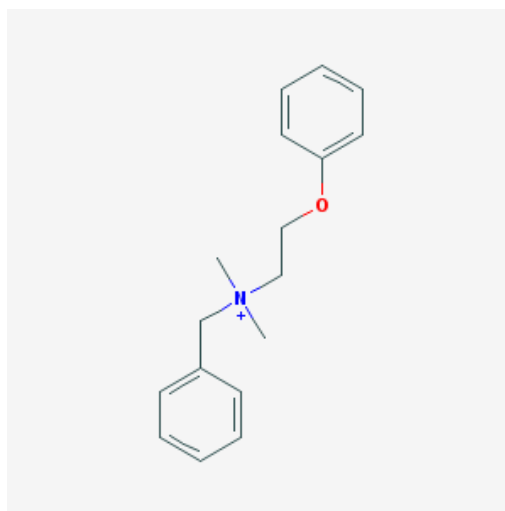
Vrednosti LD<sub>50</sub> nakon oralne aplikacije morantel tartarata, ekvivalentne su 179-260 i 551-586 mg morantela baze/kg telesne mase kod miševa i pacova. Za morantel citrat, vrednosti LD<sub>50</sub> nakon oralne aplikacije iznose 125 mg morantela baze / kg kod miševa. Morantel tartarat se dobro podnosi kod oralne aplikacije kod goveda i ovaca u dozama 6.5 puta većim od preporučene, pa čak i 28 puta većim od srednje terapijske doze. Morantel se intenzivno metaboliše in vivo. Nakon 24 časa ukupni ostaci sadrže oko 50 % polarnih i farmakološki neaktivnih metabolita nakon cepanja prstena i konjugacije sa glutationom. Simptomi trovanja podrazumevaju respiratorne smetnje, hipotermija, ataksija, tremori i konvulzije.

### **Befinijum**

Befinijum kao jedinjenje spada u grupu kvarternernih amonijumovih soli koje su visoko jonizovane. Sintetskog je porekla. Spada u grupu holinergičkih agonista (Adams, 2001). Početkom pedesetih godina prošlog veka uveden je u kliničku praksu za lečenje gastrointestinalnih infekcija nematoda kod životinja i ljudi. Primećeno je da je njegova aktivnost jače izražena prema nematodama koje parazitiraju na sluznici creva, nego prema onim nematodama koje parazitiraju u crevnoj šupljini bez kontakta sa sluznicom.

Njegova aktivnost bila je jače izražena protiv nematoda koje parazitiraju zakačene za mukoza creva, u poređenju sa nematodama koje parazitiraju slobodne u lumenu creva. U tretmanu parazita kod životinja daje se per os jednokratno 20-25 mg/kg kod težih infekcija parazitima doza se povećava na 50 mg/kg (Adams, 2001).

Befinijum je po hemijskoj strukturi kristalni prašak, u nijansi žute do zelenkasto-žute boje, bez mirisa. Istraživanja su pokazala da je nerastvorljiv u vodi, etru i benzenu, a rastvorljiv u etanolu i metanolu. Njegova hemijska formula je C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>, a molekulska masa 443,50 g/mol. Na tržištu se može naći u formi befinijum hlorida i befinijum hidroksinaftoata. Strukturna formula befinijuma prikazana je na slici 14. (Befinijum - Pubchem).



**Slika 14.** Hemijska struktura befinijuma.

Befinijum se slabo resorbuje iz digestivnog sistema. Posедуje veoma visoke LD<sub>50</sub> nakon per os aplikacije. Kod miševa LD<sub>50</sub> za intraperitonealni način aplikacije iznosi 72 mg/kg, a za peroralni način aplikacije 1000 mg/kg. Ispitivanjem na primatima ustanovljeno je da peroralna doza od 317 mg/kg befinijum-hlorida ili 500mg/kg befinijuma u obliku hidroksinaftoata, aplikovanih u toku 25 dana ne dovode do signifikantnih promena u različitim tkivima (Burrows, 1958). Nakon intravenske aplikacije, toksični efekti leka dolaze do izražaja. Naime, dolazi do pojave kratkotrajnog pada krvnog pritiska. Kod pasa i mačaka zabeleženi su podrhtavanje, nauzeja, povraćanje, neretko i dijareja sa bolom u abdomenu. Kod nekih tretiranih životinja dolazilo je do pojave vrtoglavice. Intenzivna midrijaza zabeležena je kod mačaka. Dejstvo dejstva befinijuma na CNS ukazuju na centralni emetički efekat kod pasa, kao i respiratorna insuficijencija, koja može biti uzrok smrti kod trovanja (Burrows., 1958). Zbog pojave ovih toksičnih efekata befinijum nije registrovan za upotrebu u SAD, dok se u nekim zemljama Azije i dalje koristi za lečenje parazitskih infekcija. Smatra se da befinijum dovodi do mišićne kontrakcije preko posebnog podtipa nikotinskog receptora (B podtip) (Martin i sar., 1998). Ovaj podtip nikotinskih receptora parazitskih nematoda označava upravo po befinijumu (B podtip). U novije vreme radi se na tome da se upotpuni istraživanje na molekularnom nivou o načinu vezivanja befinijuma za

nikotinski receptor i da se objasni struktura i distribucija B podtipa nikotinskog receptora u samim parazitima.

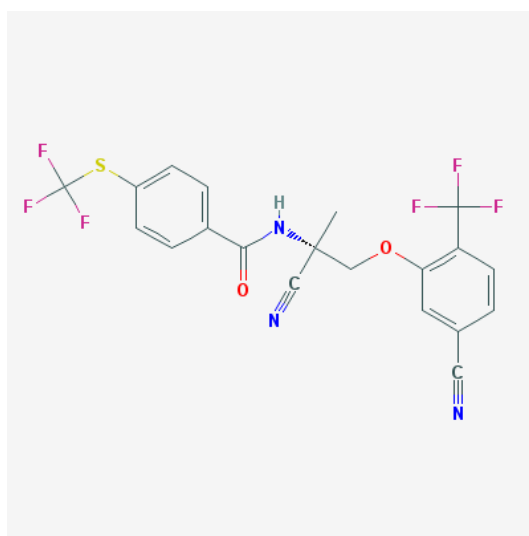
### 2.8.2. Aminoacetonitrili (monepantel)

Kada govorimo o aminoacetonitrilima moramo spomenuti da se u literaturi navodi da je prošlo više od 30 godina od uvođenja novih lekova koji su se mogli koristiti za lečenje infekcija izazvanih parazitskim nematodama. Nakon otkrića ovih supstanci, smatralo se da se da će ova jedinjenja popuniti prazninu zbog toga što je puno vremena prošlo od otkrića nekog novog antinematodnog leka koji bi se mogao koristiti za lečenje parazitskih infekcija pre svega životinja. Aminoacetonitrilni derivati (AAD) sa svojim predstavnikom monepantelom predstavljaju jednu od najnovijih klasa antihelmintika za koje se smatra na osnovu istraživanja proizvođača da deluju kao alosterični modulatori. U studijama koje su rađene smatra se da monepantel deluje kao antagonista nikotinskog receptora (Abongwa i sar., 2018).

Aminoacetonitrili su klasa jedinjenja veoma male molekulske mase, koji se relativno lako dobijaju alkilacijom fenola hloroacetonom (Kaminsky i sar., 2008). Do sada je sintetisano preko 600 jedinjenja sa različitim ariloksi ili aroil grupama u aminoacetonitrilnom jezgru. Istraživanja pokazuju da postoji visoka efikasnost aminoacetonitrila u terapiji parazitskih infekcija kod malih preživara. Rezultati efikasnosti aminoacetonitrila pokazuju da oni efikasno eliminišu četvrti larveni stadijum (L4) *Haemoncus contortus* kod ovaca i *Cooperia oncophora* kod krava, već posle jednokratne primene doze od 20 mg/kg telesne mase (Sales i Love, 2016). Kod istovremene infekcije ovaca sa L4 stadijumom 5 najčešćih vrsta nematoda, efikasnost AAD je bila 100%-tna, dok se efikasnost protiv odraslih nematoda: *Nematodirus spathiger*, *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* i *T. colubriformis* kretala između 90 i 100%. AAD su aktivni protiv parazitskih nematoda i imali su efekat na kretanje, rast i vitalnost slobodnoživeće nematode *C. elegans*. Smatra se da izazivaju spazam tela zida mišića dovodeći do paralize, spazmične kontrakcije prednjeg dela farinksa i smrti parazita (Kaminsky i sar., 2008). Farmakokinetičke osobine monepantela i njegovog sulfon metabolita, ispitane su kod ovaca nakon intravenske i oralne aplikacije. Sulfon

metabolit se brzo formira i dominira nad monepantelom 4 h nakon aplikacije, bez obzira na način primene. Ukupna bioraspoloživost monepantela bila je 31 %, ali je pokazano da približno ista količina monepantel sulfona proizvedena bez obzira na koji način je monepantel aplikovan. Monepantel sulfon je glavni hemijski entitet prisutan kod ovaca u krvi. Generalno, ovi farmakokinetički podaci pomažu u evaluaciji monepantela kao oralnog anthelmintika ovaca (Karadzovska i sar., 2009).

Smatra se da je monepantel ( $C_{20}H_{13}F_6N_3O_2S$ ) supstanca sintetskog porekla, molekulske mase 493,393 g/mol. Loše se rastvara i etanolu i vodi, ali se zato veoma dobro rastvara u DMSO. Nakon rastvaranja u vodi dobija se gusta žućkasta suspenzija sa dve faze koja u sebi sadrži bele praškaste čestice. Na slici 15. prikazana je hemijska struktura ovog jedinjenja (Monepantel - Pubchem).



Slika 15. Hemijska struktura monepantela

Kao predstavnik ove grupe lekova on je prvi lek koji je odobren za kliničku upotrebu u veterinarskoj medicini za lečenje parazitskih infekcija (EMA, 2016; Abongwa i sar., 2017). U testovima dejstva protiv parazita kojima su veštački inficirani miševi i pacovi monepantel je pokazao odličnu aktivnost protiv adultnih *A. ceilanicum* ( $EC_{50} = 1,7$  mg / ml), umereni efekat na *T. Muris* L3 ( $EC_{50} = 78,7$  ug / mL), dok nije primećen nikakav efekat na *A. ceilanicum* L3, adultne *T. Muris*, i obe forme *N. americanus*. *Trichuris muris*, *S. Ratti* i *A. suum* nisu bili pogođeni tretmanom sa

monepantelom in vivo (nakon doze od 600 mg / kg, 32 mg / kg i 600 mg / kg telesne mase) (Tritten i sar., 2011).

Sprovedeni su testovi na ovcama sa sumnjom da postoji rezistencija *Haemonchus contortus* prema monepantelu u testu smanjenja broja fekalno izlučenih jaja parazita. Pokazalo su da je efikasnost tretmana sa monepantelom bila 0 %, odnosno da je identifikacijom koprokulturnim pregledom prisustva larvi hemonhusa pre i posle tretmana bila 100 % (Van den Brom i sar., 2015). Ova i još neke studije potvrđuju, da se na terenu pojavljuje rezistencija *H. contortus* prema monepantelu. Rezistencija parazita na monepantel takođe je prijavljena na Novom Zelandu. U tim izveštajima monepantel nije uspevao da kontroliše infekcije izazvane sa *Teladorsagia circumcincta* i *Trichostrongylus colubriformis* kod koza. Na Novom Zelandu monepantel je licenciran i pušten na tržište 2009. godine, a prvi slučajevi rezistencije parazita prema ovom leku prijavljeni su četiri godine kasnije, slično onome što se sada dogodilo u Urugvaju gde je monepantel licenciran 2010. godine a rezistencija je prijavljena 2014. godine (Mederos i sar., 2014). Zaključak je da su se pomenuti paraziti vrlo brzo adaptirali i stvorili rezistenciju prema ovom antiparazitiku. U toku su razne studije koje se bave upravo ovom problematikom koja se javlja kod monepanela i njegove primene u lečenju parazitskih infekcija pre svega ovaca.

U istraživanjima, aminoacetonitrili su ispoljili nisku toksičnost kod glodara i preživara. Peroralna LD<sub>50</sub> derivata aminoacetonitrila kod pacova iznosi preko 2 g/kg telesne mase. Ispitivanja podnošljivosti različitih AAD, takođe su pokazala da se radi o jedinjenjima koja sisari dobro podnose. Posle oralne primene, monepantel se brzo resorbuje u krvotok i brzo metaboliše do monepantel sulfona koji ima sličnu efikasnost kao osnovno jedinjenje. Monepantel i njegovi metaboliti nisu toksični za životnu sredinu i njene komponente, kao što su mikroflora zemljišta, vodene organizme i biljnu vegetaciju (Lecová i sar., 2014). Do sada nisu opisani i prijavljeni slučajevi genotoksičnosti i teratogenosti ove grupe jedinjenja. Svi navedeni podaci o pojavi rezistencije ukazuju na nužnu potrebu za daljim istraživanjem mehanizama razvoja rezistencije parazita na aminoacetonitrile da bi se u budućnosti sprečile negativne posledice usled neefikasnosti antiparazitske terapije.

### 3. Ciljevi i zadaci

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se ispita potencijalno antinematodno dejstvo odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja i utvrdi mehanizam kojim oni ostvaruju antiparazitski efekat. Brojna istraživanja pokazuju da su esencijalna biljna ulja, odnosno njihovi aktivni sastojci bezbedni za primenu kod ljudi i životinja i potencijalno atraktivna alternativa postojećoj antiparazitskoj terapiji. Biljke stvaraju esencijalna ili eterična ulja kao organske produkte sekundarnog metabolizma. Aktivni principi esencijalnih biljnih ulja su zavisno od prekursora primarnog metabolizma iz koga nastaju i različitog metaboličkog puta podeljeni na terpenoide, fenilpropanoide, steroide i alkaloidne. Posebnu pažnju privlače monoterpenoidi: karvakrol, karveol, alfa-pinen, mentol, timol kao i fenilpropanoid cinamaldehyd, kod kojih se među brojnim biološkim efektima spominje i njihovo antiparazitsko dejstvo.

Zadatak istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje interakcije aktivnih principa etarskih biljnih ulja sa holinergičkim i GABA-ergičkim receptorima nematoda. Poznato je da pojedine konvencionalno korišćene supstance (avermektini) pored delovanja na nervno-mišićni sistem nematoda, deluju i na farinks, odnosno faringijalno pumpanje. Planirano je da se ispita dejstvo aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na kontrakcije farinksa nematoda, konkretno u ovom istraživanju na nematodi *C. elegans*.

Da bi se analizirala selektivnost dejstva odabranih biljnih terpenoida, tema istraživanja je i njihov uticaj na GABA i holinergičke receptore sisara. Ispitivanja su sprovedena na izolovanim preparatima dijafragme i ileuma pacova, dok je ispitivanje njihovog uticaja na integrisanost CNS-a testirano Rota-rod testom na pacovima.

Cilj istraživanja je da se ispitaju potencijalni antinematodni efekti odabranih biljnih terpenoida, za koje u literaturi postoje podaci (ili za etarska ulja u čijem su sastavu) da imaju izvesna antiparazitska svojstva. Posle preliminarnih testova na izolovanom nervnomišićnom preparatu, jedinjenja sa jasno ispoljenim antinematodnim dejstvom biće dalje ispitivana u cilju definisanja preciznog mehanizma antiparazitskog efekta. Jedan od ciljeva istraživanja je da se proceni selektivnost dejstva biljnih terpenoida i njihova bezbednost za domaćina. Komparacijom farmakoloških efekata na



izolovanim neuromišićnim preparatima nematoda i sisara biće definisane efektivne antinematodne, ali i istovremeno bezbedne koncentracije aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja za potencijalnu kliničku primenu.

Zato smo za zadatke našeg rada postavili sledeće:

Da se ispita potencijalno farmakološko dejstvo odabranih biljnih mono i diterpenoida na kontraktilnu sposobnost neuromišićnog preparata parazitskih nematoda i da se odredi dozna zavisnost efekta.

Da se ispita mehanizam antinematodnog dejstva odabranih terpenoida na neuromišićnom preparatu nematoda i to:

-dejstvo na različite tipove nikotinskog receptora (L, N i B tip),

-dejstvo na GABA receptor.

Da se ispita interakcija odabranih biljnih terpenoida sa najnovijim antinematodnim lekovima derivatima aminoacidonitrila (monepantel).

Da se ispita dejstvo odabranih biljnih terpenoida na faringealno pumpanje nematoda i stepen preživljavanja *Caenorhabditis elegans*.

Da se analizira selektivnost dejstva odabranih terpenoida na neuromišićnim preparatima sisara (izolovana dijafragma i ileum pacova).

Da se analizira selektivnost dejstva odabranih terpenoida i testira njihov efekat na integrisanost nervnog sistema sisara izvođenjem Rota-rod testa na pacovima.

U okviru ove disertacije, svi eksperimenti neophodni za rešavanje postavljenih ciljeva i zadataka, izvedeni su u Laboratoriji za Farmakodinamiku Katedre za Farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

## 4. Materijal i metode

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji podeljena su u četiri dela. Prvi deo čine ispitivanja na neuromišićnom preparatu velike parazitske nematode svinja *Ascaris suum*; Drugi i treći deo istraživanja odnosili su se na utvrđivanje i analizu selektivnosti dejstva odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja. Ovaj deo je podrazumevao ispitivanja dejstva odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na periferne nikotinske i muskarinske strukture - izolovana dijafragma i ileum i istraživanja njihovog dejstva na integrisanost nervnog sistema sisara, Rota-rod testom na pacovima; Četvrti deo bila su ispitivanja efekata odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na preživljavanje i intenzitet faringealnog pumpanja slobodnoživeće nematode *Caenorhabditis elegans* (engl. Wild-type-divlji soj).

### Istraživanja na neuromišićnom preparatu *Ascaris suum*

Parazitska nematoda svinja *Ascaris suum* je dopremana u specijalno dizajniranim nerđajućim termosima sa klanica u okolini Beograda (IMES i Ambar) neposredno posle čišćenja creva i prikupljanja u posebno pripremljenom rastvoru - *Lockes solution*. Sastav *Lockes solution* je standardizovan i vrednosti su izražene u mM: NaCl 155, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 1.5 i glukoza 5. Nematode su u laboratoriji čuvane u istom rastvoru koji je održavan na temperaturi od 32-36°C u vodenom kupatilu. Lockes rastvor je menjan svakih 12 sati, što je omogućavalo da se paraziti iz jedne kolekcije mogu koristiti u ispitivanju kontrakcija najduže 5 dana.

U ispitivanjima su korišćene adultne ženke askarisa jer su većih dimenzija i čine većinu u populaciji parazita. Neuromišićni preparat za ispitivanje kontrakcija pripreman je disekcijom prednjeg dela tela parazita 2 do 3 cm kaudalno od glave. Daljim odsecanjem tkiva između dve crvene linije longitudinalno na telu parazita, dužine 1cm uvek je dobijan preparat (segment) istih dimenzija.

Zatim je isečeni segment askarisa postavljan u komoru (kupačice) zapremine 20 ml, koja je bila ispunjena sa *Ascaris Perienteric Fluid Ringer/APF Ringer standardnog sastava* (mM): NaCl 23, Na-acetat 110, KCl 24, CaCl<sub>2</sub> 6, MgCl<sub>2</sub> 5, glukoza 11, HEPES

5, sa vrednosti pH 7.6. Postupak fiksiranja preparata je obavljan tako što je jedan kraj segmenta pričvršćen za kukicu na dnu kupatilca, a drugi deo je koncem zakačen za izometrijski transdjuser koji je preko interfejsa i amplifajera povezan sa PC računarom. Kontinuirano mešanje aplikovanih supstanci u kupatilcu zapremine 20 ml obezbeđeno je stalnim ubrizgavanjem smeše vazduha električnom pumpom, pri čemu kretanje mehurića nije uticalo na kontrakcije jer je jačina mešanja kontrolisana ventilom na crevima koja ubrizgavaju vazduh.

Nakon disekcije preparata, postavljanja u kupatilce i povezivanja sa izometrijskim transdjuserom, preparat je mikrometarskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen početnoj tenziji od 0.5-1.0 g tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao na oko 0.5 g, aplikovane su ispitivane supstance a zatim su praćene i merene kontrakcije.

Korišćen je protokol aplikacije rastućih koncentracija ispitivanih supstanci koje su poznate kao agonisti nikotinskog receptora (acetilholin, befinijum, pirantel i morantel) i supstanci za koje smo pretpostavili da će delovati agonistički (mentol i karveol u niskim koncentracijama) ili antagonistički (monepantel, karvakrol, piperazin, GABA, karveol u visokim koncentracijama). Nakon dobijanja kontraktalnog efekta, supstance su ispirane iz kupatilca u pravilnim vremenskim intervalima.

Spontana aktivnost preparata askarisa, njegove kontrakcije izazvane agonistima nikotinskog receptora ili relaksacije izazvane antagonistima registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera eLAB 11 i eLAB 44 (El Unit, Beograd) na PC računaru u realnom vremenu. Dobijeni zapisu su kasnije analizirani, kontrakcije merene i rezultati statistički obrađivani.

### **Istraživanja na neuromišićnom preparatu dijafragme i ileuma pacova**

Za ispitivanja na izolovanoj dijafragmi i ileumu korišćeni su pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne mase 150-200 g. Životinje su držane u standardnim uslovima regulisanim EU direktivama i predviđenim za kavezne laboratorijske životinje u grupama od po 5, sa kontrolisanim svetlosnim ciklusom 12-h svetlo/tama i pri temperaturi 21-24°C. Životinje su hranjene propisanom kompletnom peletiranom hranom za pacove (Veterinarski Zavod Subotica) i pojene *ad libitum*. Sve procedure koje

su primenjivane u skladu sa EEC Directive 86/609 i odobrene su od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Neophodno žrtvovanje ogleđnih životinja sprovedeno je neposredno pred ispitivanje, odobrenom standardnom metodom, predoziranje tiopenton-Na u skladu sa propisima *Home Office Code of Practice* (1997). Odmah po žrtvovanju pristupalo se evisceraciji dijafragme i ileuma. Manipulacija i održavanje izolovanog ileuma i dijafragme pacova u *in vitro* uslovima vršeno je u hranjivom Tyrode rastvoru. Sastav Tyrode rastvora (mM) je sledeći: NaCl 139,9; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1,04; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 i glukoza 5,5.

Postupak pripremanja preparata dijafragme obavljan je tako što se najpre cela dijafragma, na koštanoj osnovi od rebara i grudne kosti, prenese u Tyrode-ov rastvor a zatim se makazama pažljivo odvoje leva i desna hemisfera. Od jedne hemisfere dijafragme, preparat je pripreman tako što je isecan poprečni, centralni deo hemisfere, dužine 10 mm i širine 5 mm. Isečak je odmah zatim postavljan vertikalno u vodeno kupatilo zapremine 20 ml, sa Tyrode rastvorom temperature 37°C, pH vrednosti 7.4. Oksigenacija Tyrode-ovog rastvora u vodenom kupatilu za izolovane organe vršena je mešavinom kiseonika i ugljen-dioksida (95% + 5%). Mešanje rastvora gasom u vodenom kupatilu nije uticalo na parametre kontrakcije jer je ventilom na dovodnim crevima vršena precizna kontrola jačine oksigenacije preparata.

Prilikom manipulacije jedan kraj preparata dijafragme koncem je pričvršćen za stalak, dok je drugi pričvršćen za izometrijski transdjuser. Dve platinaste elektrode postavljene su paralelno na razdaljini od 3-4 mm od preparata. Elektrode su povezane sa stimulatorom BioSmart 150 (EIUnit, Beograd) koji preko softvera eLAB 44 (EIUnit, Beograd) i PC računara omogućava stimulaciju preparata i beleženje kontrakcija na ekranu računara u realnom vremenu. Pre početka ispitivanja preparat je izložen početnoj tenziji od 0.5g tokom 10-15 minuta. Ovakvo opterećenje ne menja dužinu preparata za više od 1 mm. Preparat dijafragme je stimulisan tetaničnim pulsevima, "paketom" od 5 stimulacija svakih 30 sekundi (20 μs, 50Hz, 30v, 2s) sa pauzom od 3 do 5 minuta između "paketa". Kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera eLAB 44 (EIUnit, Beograd). Merene su maksimalne kontrakcije i eventualna pojava "tetanic fade", odnosno blokade presinaptičkog nikotinskog receptora.

Na preparatu izolovanog ileuma pacova, koji je pripreman od preterminalnog dela ileuma postupak je bio sledeći. Isečak dužine 4 do 5 cm uziman je na rastojanju od oko 10 cm od ileocekalne valvule i odlagan u Tyrode-ov rastvor. Posle preparisanja (uklanjana masnog tkiva i čišćenja unutrašnjeg dela creva), segment creva dužine 2 cm postavljen je u vodeno kupatilo zapremine 20 ml, sa Tyrode rastvorom na temperaturi od 37°C, pH 7.4 vrednosti. Oksigenacija Tyrode-ovog rastvora u vodenom kupatilu za izolovane organe vršena je mešavinom kiseonika i ugljen-dioksida (95% + 5%).

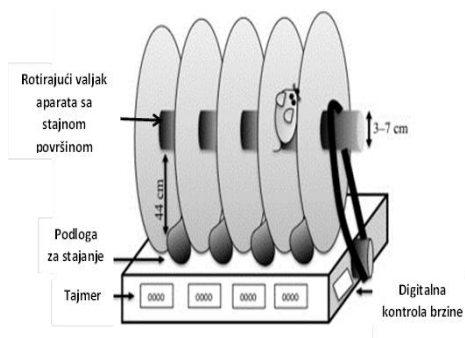
Prvo je jedan kraj preparata ileuma koncem pričvršćen za stalak, dok je drugi kraj pričvršćen za izometrijski transdjuser, tako da se isečak ileuma nalazio u središnjem delu prostora između dve elektrode. Elektrode izrađene od platine postavljene su sa bočnih strana preparata na razdaljinu od 3-4 mm, povezane sa stimulatorom BioSmart 150 (ElUnit, Beograd). Pre početka ispitivanja, preparat je izložen početnoj tenziji od 0.5 g. Posle postizanja stabilnog početnog tonusa preparat ileuma je stimulisan “paketom” od 5 stimulacija na svakih 60 sekundi (2 ms, 100 Hz, 45v, 2s). Posle pauze od 5 minuta i ispiranja, istom preparatu aplikovane su rastuće koncentracije acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu$ M) ili drugih ispitivanih supstanci radi određivanja odnosa doze i efekta. Spontana aktivnost ileuma i njegove kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom, odnosno acetilholinom ili drugim supstancama registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera eLAB 44 (El Unit, Beograd) na PC računaru.

### **Ispitivanje dejstva karvakrola na nervni sistem pacova izvođenjem Rota-rod testa**

Rota-rod test se koristi kao metoda za ispitivanje koordinacije neuro-mišićne aktivnosti pacova koji su izloženi dejstvu neke ispitivane supstance. Aparat za Rota-rod test pruža jednostavan način da se testiraju efekti lekova, oštećenja mozga, bolesti koje utiču na motornu koordinaciju ili otpornost na zamor pacova. Životinja se postavlja na rotirajući valjke Rota-rod aparata. Pacovi moraju da zadrže ravnotežu na rotirajućem valjku ukoliko im nije ugrožena koordinacija nervnog i mišićnog sistema. Kada životinja padne sa valjka u svojoj koloni, automatski se snima vreme kašnjenja (minute i sekunde) i brzina rotacije pokretnog valjka. Parametri koji se regulišu i ispituju su brzina rotirajućeg valjka koja se izražava kao RPM (1-100) i vreme rotiranja i kretanja

pacova koje se izražava u MIN (1-100). Izmenjivi gornji separator za aparat za pacove sprečava uticaj između životinja koje se kreću u susednim trakama. Rad Rota rod aparata kontroliše se naprednim mikroprocesorom koji obezbeđuje preciznu kontrolu vremena okretanja i izuzetno preciznu regulaciju brzine. Dobijeni podaci se grupišu i čuvaju u tabelama. Prečnik rotirajućeg valjka iznosi 5 cm. Na valjku se nalaze četiri pregradne komore na kojima ima mesta za po jednog pacova. Istovremeno se meri kretanje 4 jedinice koje se stavljaju na valjak. Na aparatu postoji digitalna kontrola parametara, a ukoliko se poveže sa računarom, postoji i softverska kontrola pomoću programa RotaSoft (ElUnit, Beograd) (Slika 16). Procedura izvođenja ispitivanja jesledeća. Naime, sedam dana pre ispitivanja pacovi se treniraju kako bi bili sposobni da

se održe na rotirajućem valjku pod zadatim parametrima rotacije bez padova. Parametri koje smo koristili bili su 15 RPM i vreme od 5 MIN. Svi pacovi su podeljeni u kaveze u 6 grupa po 6 životinja. Pacovi su trenirani dva puta dnevno pre hranjenja kompletnom peletiranom hranom (Veterinarski Zavod Subotica) predviđenom za ovu vrstu oglednih životinja. Vodu su dobijali *ad libitum*. Četiri grupe su bile ogledne, a dve kontrolne. Na dan izvođenja ispitivanja pacovi nisu hranjeni, kavezi su stavljeni u prostoriju za izvođenje ispitivanja 15 minuta pre početka testa. Svaka životinja je izmerena da bi se odredila doza ispitivane supstance. Ispitivanu supstancu (karvakrol) aplikovali smo peroralno u dozama 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg i 500 mg/kg telesne mase, dok je kontrolna supstanca (diazepam) aplikovana intraperitonealno u dozi od 3 mg/kg telesne mase pacova. Nakon aplikacije supstanci obavljan je test u pravilnim vremenskim intervalima. Tako je prvo testiranje izvedeno nakon 30 minuta od momenta aplikacije, a drugo testiranje nakon 90 minuta. Tabelarno su prikazani rezultati testa sa brojem padova pojedinačno po grupama i ukupan broj padova na testu po vremenskim intervalima.



Slika 16. Šematski prikaz Rota-rod aparata

**Ispitivanje uticaja timola i karvakrola na stepen preživljavanja i faringealno pumpanje *Caenorhabditis elegans***

Eksperimentalni deo ovog oglada je izveden u Laboratoriji za Farmakodinamiku Katedre za Farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, dok je deo oglada koji obuhvata pripremu, razlivanje i inokulaciju podloga urađen u laboratoriji za Mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine. Univerziteta u Beogradu.

**Kultura *Caenorhabditis elegans***

Materijal za ogled bila je laboratorijska kultura *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Divlji tip (eng. *wild type*) ove nematode se uzgaja za potrebe projekta TR 31087 i to prvi put u Srbiji i u ovom delu Evrope. Treba napomenuti da se za uzgajanje ove specifične neparazitske nematode moraju stvoriti posebni uslovi. Sveže kulture su dobijene presejavanjem na odgovarajućem medijumu sa inokulacijom posebnog soja bakterije *Escherichia coli* OP50. Reproductivni ciklus *C. elegans* kontroliše se temperaturnim uslovima u inkubatoru. Na temperaturi od 20° C, ploče sa se pesejavaju svaka 4 dana kako ne bi došlo do prerastanja ploča adultnim oblicima ove nematode i da bi na ploči bilo dovoljno hrane i za larvene oblike.

***Escherichia coli* OP50**

Kao izvor hrane u laboratorijskim uslovima za *C. elegans* koristi se soj *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 koja je uracil deficitarna. Usled nemogućnosti da metaboliše uracil, navedeni soj tokom inkubacije u ogledu ne prerasta podlogu ni nematode, pa samim tim se eliminiše nespecifični uticaj na viabilnost *C. elegans*. Nakon razlivanja podloga u Petrijevu ploču inokulisano je po 100 µl bakterijske kulture *E. coli* u turbiditetu od 0.5 McFarland jedinica ( $1-2 \times 10^8$  cfu/ml). Inokulusane ploče su nakon 24 h na 37°C inkubacije u aerobnim uslovima korišćene za dalje presejavanje *C. elegans*.

### Podloga

Za uzgajanje *C. elegans* korišćena je gotova podloga Nematode Growth Medium NGM (US Biological, Life Sciences, SAD). Podloga je pripremljena rastvaranjem prema preporuci proizvođača (23 g) u 1 litar destilovane vode uz kuvanje na 100° C do rastvaranja. Rastvorena podloga je sterilisana u autoklavu (Rypa, Španija) 15 min na 121°C, a zatim prohlađena u vodenom kupatilu (Sutjeska) na 50°C u trajanju od pola sata. U prohlađenu podlogu su dodavani odvojeno rastvori pufera i to: kalijum hidrogen fosfat i kalijum di-fosfat, kalcijum hlorid i magnezijum hlorid, a konačni sastav podloge je prikazan u tabeli 1.

Ovako pripremljena podloga je razlivana u Petrijeve ploče za održavanje kulture. Za potrebe presejavanja, izliveno je po 5 ml podloge u Petri ploče dijametra 60 mm, dok je za potrebe izvođenja oglada razlivano po 2.5 ml podloge u Petri ploče prečnika 30 mm.

**Tabela 1.** Sastav NGM podloge ( na litar podloge)

<b>Trypton</b>	2.5g
<b>Natrijum hlorid (NaCl)</b>	3.0g
<b>Agar</b>	15.0g
<b>Holesterol</b>	5mg
<b>Kalcium hlorid (CaCl<sub>2</sub>)</b>	1mM
<b>Magnezium sulfat (MgSO<sub>4</sub>)</b>	1mM
<b>Kalijum fosfat (KPO<sub>4</sub>) pH 6.0</b>	25mM

### Uzgoj *C. elegans* i presejavanje

Postoji nekoliko načina za presejavanje culture *C. elegans* sa jedne Petrijeve ploče na drugu. U ovom radu je korišćen metod prenošenja pojedinačnih jedinki uz pomoć metalne eze. Između prenošenja pojedinačnih jedinki, vršena je sterilizacija instrumenta zagrevanjem eze do usijanja na plameniku. Ceo proces presejavanje je obavljan u digestoru (BIOBASE Fume hood, NRK), nakon dezinfekcije UV svetlom u



trajanju od 30 minuta kada je obavljan transfer nematoda sa Petri šolja koje su imale adulte na Petri šolje sa NGM agarom za dalja ispitivanja.

### **Metoda izvođenja ogleda preživljavanja**

#### **Izdvajanje *C. elegans* iz podloge i priprema za ogled**

Podloga u Petrijevim pločama sa zrelim adultnim oblicima *C. elegans* isečena je na kvadrate 3x3 mm i prebačena u staklene kivete, a potom je dodat fiziološki rastvor u zapremini od 2 ml. Maceriranjem NGM podloge pospešen je izlazak nematoda u tečnu fazu. Kivete sa maceriranim nematodama centrifugirane su na 2500 obrtaja (Lace 24, Colo centrifuge, NRK) u trajanju od 4 min, a zatim je 400 µl suspenzije supernatanta prebačeno u čistu kivetu. Nakon ponovnog centrifugiranja od 2000 obrtaja u trajanju od 1 minuta, po 20 µl suspenzije nematoda u fiziološkom rastvoru je inokulisano u ogledne Petrijeve ploče prečnika 30 mm.

#### **Priprema oglednih ploča i priprema ispitivane supstance**

Timol i karvakrol su čiste supstance rastvorene u alkoholu, a potom u vodi, tako da je dobijen radni rastvor gde količina apsolutnog alkohola ne prelazi 0.1 % v/v. Radni rastvori koncentracije timola i karvakrola od 10, 100, 1000 i 10000 nM pripremljeni su rastvaranjem u destilovanoj vodi, a zatim je dodavan NGM agar pripremljen prema uputstvu proizvođača. Nakon mešanja agara i radnih rastvora timola i karvakrola dobijene su konačne ogledne Petrijeve ploče sa NGM agarom koji je sadržao 1, 10, 30, 100, 300 i 1000 nM timola i isto toliko karvakrola. Ploče bez dodatih aktivnih principa biljnih ulja korišćene su kao kontrola. Sve ploče su pripremljene u triplikatu.

#### **Inkubacija i brojanje**

Nakon pripreme oglednih i kontrolnih ploča u njih su inokulisane nematode. Ploče su ostavljene u termostat (Memmert IN30, Nemačka) na 20 °C u trajanju od 24 h. Nakon inkubacije, ploče su posmatrane pod invertnim mikroskopom (Motic AE 31, NRK) i rezultat je zabeležen kamerom (MOTICAM 5MP, NRK). U ispitivanju smo pratili stepen preživljavanja nematoda u podlogama sa i bez aktivnih principa etarskih ulja. Praćen je dozno-zavisni stepen preživljavanja nematoda u podlogama posle 24 i 48 sati inkubacije.

**Softverski i hardverski regulisani sistemi za ispitivanja kontrakcija izolovanih organa i ispitivanje neuromišićne koordinacije sisara**

Softversko-hardverski regulisani sistemi za ispitivanja na izolovanim organima kao i aparat za Rota rod test su tehnička rešenja, odnosno rezultat Projekata tehnološkog razvoja Ministarstva nauke R Srbije br. 20119 i TR 31087, Katedre za Farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine i firme ElUnit (Beograd). Prilikom izvođenja metode EFS parametri stimulacije za rad sa izolovanim organima regulišu se preko prednjeg panela upravljačkog softvera, preko koga se i otvaraju i zatvaraju pinč ventili sa hranljivim rastvorom kojim se ispira preparat. U toku rada, dobijene kontrakcije prenose se preko pojačivačkog sistema (interfejsa) izometrijskog transdjusera do PC računara, odnosno mikrokontrolera koji vrši analogno-digitalnu konverziju pojačanog signala i preko komunikacionog drajvera (serijski RS 232 ili USB port) šalje podatke na komercijalni računar. Vremenski dijagram promene sile teče kontinuirano jer je program u stalnoj vezi sa hardverom sistema (*on line* upravljanje). Posebni alati za rad sa dijagramom omogućavaju analizu talasnog oblika: markeri, zum, numerički kursori, veličina vremenskog prozora, itd. Detaljno arhiviranje prikupljenih podataka vrši se u numeričkoj datoteci radi dokumentovanja ili naknadne obrade i analize podataka. Dalju, naprednu obradu rezultata (engl. post processing) smo obavili ubacivanjem vremenskog dijagrama direktno u tekst procesor (Microsoft Office 2010) Word 2010 i Power Point 2010.

Softveri eLAB 44 i eLAB 11 kao i softver RotaSoft poseduju sopstvenu mogućnost merenja, interpolacije i eksportovanja podataka, kao i importovanje podataka u druge programe jer su komplementarni sa svim komercijalnim programima u kojima se vrši dalja analiza, obrada i prikazivanje rezultata.

**Ogledne supstance i hemikalije korišćene u radu**

U ispitivanjima su korišćeni: acetilholin-hlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), karvakrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), timol (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA ), karveol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), monepantel (Zolvix®, Novartis, USA), tiramin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), morantel tartarat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pirantel-citrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), befinijum-hidroksinaftoat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), GABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), piperazin (Fluka, St. Louis, MO, USA), mekamilamin-hidrohlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diazepam (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mentol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), alfa-pinena (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), p-cimena (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), kahveola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), karnozola (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cinamaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i kao rastvarači destilovana voda, DMSO i etanol 99% (Centrohema, Beograd). U kupatilce sa izolovanim preparatom (askarisa, dijafragme ili ileuma) rastvori supstanci su aplikovani farmakološkim špricem uvek u volumenu od 0.1ml i 0.3 ml. Kada je rastvarač bio DMSO ili etanol 99 % njegova koncentracija u kupatilcu sa preparatom nije prelazila 0.1%.

### **Statistička analiza rezultata**

Statistička analiza dobijenih rezultata obavljena je u programu Graph Pad Prism, Version 6.0 (San Diego, Ca, USA). Razlike između serija rezultata poređene su t-testom (parni), analizom varijanse (ANOVA) odnosno Tukey-testom, dok je dozna zavisnost dobijenih efekata analizirana nelinearnom regresijom.

Izračunavanje parametara sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta, kao i sinergističke krive potencijalnog aditivnog efekta opisano je jednačinom:

$$\% \text{ response} = \frac{1}{1 + [EC_{50}/X_a]^{nH}}$$

gde je EC<sub>50</sub> koncentracija agonista (X<sub>a</sub>) koja proizvodi 50% maksimalnog odgovora a nH je Hill-ov koeficijent (nagib). Za svaku ispitivanu seriju kontrakcija (ili relaksacije) program Prism 6.0 nelinearnom regresijom preračunava vrednost EC<sub>50</sub> i nH u jednačini

za svaku seriju kontrakcija. Zavisno od broja uzoraka nH je fiksiran na vrednost 1.0 za neke serije u ispitivanjima. Da bi se dobili što reprezentativniji rezultati u istraživanju svake supstance korišćeni su paraziti iz različitih kolekcija. Srednje vrednosti kontrakcija izražene su kao  $\pm$  standardna greška (SE). Analiza varijanse i Tukey test su korišćeni za komparaciju efekta testiranih supstanci pojedinačno i zajedno, dok su nivoi poverenja iznosili (Confidence Intervals, CI) 95%.

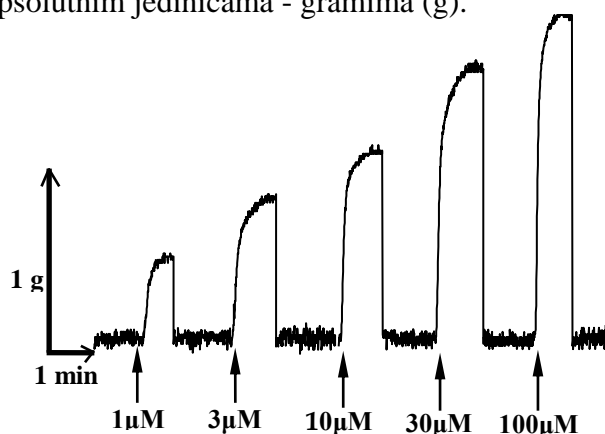
## 5. Rezultati

### 5.1. Ispitivanje dozno-zavisnog dejstva odabranih biljnih mono i diterpenoida na kontrakcije neuromišićnog preparata *Ascaris suum*.

U preliminarnim ispitivanjima testirali smo veći broj terpenoidnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Testirane su koncentracije od 1 do 300  $\mu\text{M}$  monoterpenoida: alfa-pinena i p-cimena, diterpenoida: kahveola i karnozola kao i fenilpropanoida cinamaldehyda. Međutim, nikakvi njihovi farmakološki efekti na kontrakcije *A. suum* nisu zabeleženi, pa ove rezultate nismo prikazali. U daljem tekstu disertacije prikazani su samo rezultati dejstva terpenoida koji su ispoljili jasne farmakološke efekte na primenjenim modelima.

#### 5.1.1. Ispitivanje efekta acetilholina, karvakrola, GABA i piperazina.

Istraživanje je započelo ispitivanjem dozno-zavisnog uticaja acetilholina na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* i određena je vrednost njegove srednje efektivne koncentracije ( $\text{EC}_{50}$ ). Testirane su rastuće koncentracije ACh od 1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$  (Slika 17) i izmeren je maksimalni kontraktilni efekat, posle čega je preparat ispiran rastvorom APF (engl. *Ascaris* Perienteric Fluid). Vrednosti kontrakcija izražene su u apsolutnim jedinicama - gramima (g).



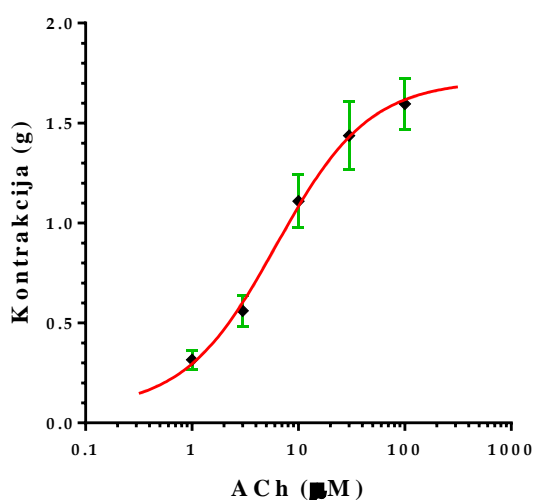
**Slika 17.** Reprezentativni zapis dozno-zavisnog efekta acetilholina na neuromišićnom preparatu *A. suum*.

U ovom ispitivanju testirano je ukupno 6 preparata iz dve kolekcije *A. suum*. Na osnovu dobijenih rezultata izračunata je vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina za kontrakcije preparata *A. suum* od 5.66  $\mu\text{M}$ , sa granicama sigurnosti od (95%) 3.93 - 8.14  $\mu\text{M}$ .

Nelinearnom regresionom analizom dobijena je sigmoidna kriva prikazana na slici 18. Statistički preračunati maksimalni efekat ACh u ovom ispitivanju iznosio je 2.12 g sa granicama sigurnosti (95%) 2.01g - 2.23 g (Tabela 2).

**Tabela 2.** Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija ACh na kontrakcije neuromišićnog preparata *Ascaris suum*.

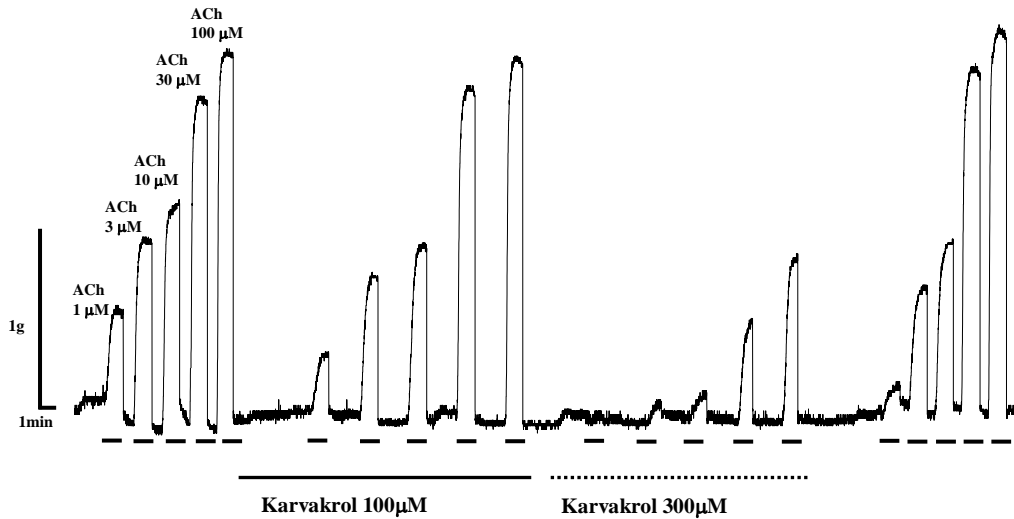
Srednja efektivna koncentracija (EC <sub>50</sub> ) (μM)	95% granice sigurnosti EC <sub>50</sub> (μM)	Log EC <sub>50</sub>	Maksimalni efekat (E <sub>max</sub> ) (g)	95% granice sigurnosti (E <sub>max</sub> ) (g)	Koeficijent regresije (R <sup>2</sup> )	Broj testiranih preparata (n)
5.66	3.93-8.14	0.75	2.12	2.01-2.23	0.96	6



**Slika 18.** Sigmoidna kriva odnosa doze i efekta ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μM) naizometrijske kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*.

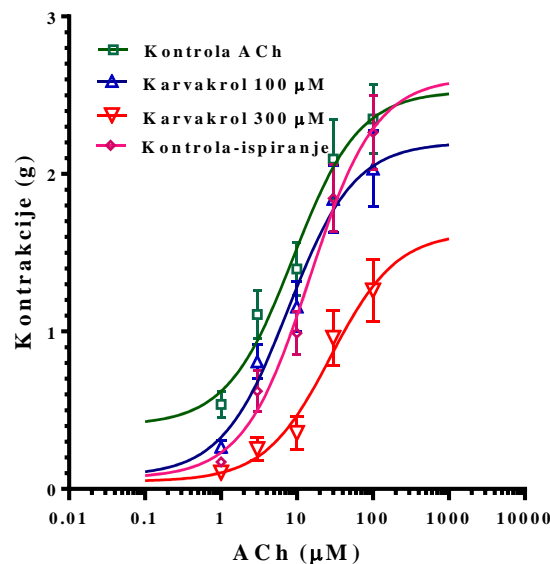
### Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu 100 i 300 μM karvakrola

U literaturi se navodi da karvakrol poseduje izvesno antinematodno dejstvo. Cilj našeg ispitivanja je bio da se ovaj efekat proveriti i utvrdi mehanizam kojim karvakrol deluje na neuromišićni preparat *A. suum*. Za ispitivanje uticaja različitih koncentracija karvakrola na kontrakcije izazvane acetilholinom korišćen je uvek isti protokol za svaki testirani preparat. Protokol podrazumeva početnu kontrolnu seriju od 5 kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100 μM), a zatim testiranje uticaja 100 i 300 μM karvakrola na dozno-zavisni kontraktilni efekat acetilholina. Na kraju protokola, urađena je kontrolna serija kontrakcija posle ispiranja preparata i posmatran je njegov oporavak (Slika 19). Ukupan broj testiranih preparata u ovom ispitivanju iznosio je osam.



**Slika 19.** Prikaz dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih acetilholinom u prisustvu karvakrola 100 i 300  $\mu\text{M}$ .

ACh je u kontrolnoj seriji izazvao dozno-zavisne kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* (Slika 19). Kada je u inkubacionu tečnost dodat karvakrol 100 i 300  $\mu\text{M}$  5 minuta, on nije promenio bazalni tonus preparata, ali je inhibirao kontrakcije izazvane ACh. Na slici 20 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i kontraktinog efekta acetilholina bez i u prisustvu karvakrola.



**Slika 20.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktinog efekta acetilholina bez i u prisustvu karvakrola: kontrola ACh (n=8, zelena); u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=8, plava); u prisustvu 300  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=8, crvena); kontrola ACh nakon ispiranja (n=8, ljubičasta). Svaka tačka predstavlja  $\bar{x} \pm \text{SE}$  n=8.

Rezultati ovog ispitivanja dejstva karvakrola na neuromišićnom preparatu *Ascaris suum*, kao i nelinearna regresiona analiza ovih rezultata prikazani su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Rezultati ispitivanja uticaja 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola na dozno-zavisne kontrakcije *A. suum* izazvane rastućim koncentracijama acetilholina.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Acetilholin-kontrola</b>						
8.87	2.63 - 29.90	0.95	2.53	2.03 - 3.02	0.63	8
<b>Acetilholin + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
7.66	2.48 - 23.64	0.88	2.20	1.77 - 2.62	0.70	8
<b>Acetilholin + karvakrol 300 <math>\mu\text{M}</math></b>						
27.71	7.30 - 105.20	1.44	1.63	0.97 - 2.28	0.65	8
<b>Acetilholin- kontrola nakon ispiranja</b>						
14.69	5.91 - 36.43	1.17	2.61	2.06 - 3.16	0.75	8

Kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ACh bila je 8.87  $\mu\text{M}$  i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola nije se značajnije promenila (7.66 $\mu\text{M}$ ), ali je 300  $\mu\text{M}$  karvakrola povećalo vrednost  $\text{EC}_{50}$  na 27.71  $\mu\text{M}$ . Posle ispiranja preparata (i samim tim uklanjanja karvakrola),  $\text{EC}_{50}$  je smanjena na 14.69  $\mu\text{M}$ , što je i dalje bilo skoro dvostruko više od kontrolnog nalaza. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) sa kontrolnih 2.53 g na 2.20 g a druga na čak 1.63 g. Posle ispiranja, maksimalni efekat je ponovo dostigao početnu vrednost (2.61g).

U tabeli 4 prikazani su rezultati statističke analize dobijenih rezultata ANOVA testom. Karvakrol je u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  smanjio kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane svim primenjenim rastućim koncentracijama acetilholina ali to smanjenje nije dostiglo stepen statističke značajnosti. Međutim, trostruko viša koncentracija karvakrola (300  $\mu\text{M}$ ) je visoko signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane ACh (Tabela 4). Iz prikazanih rezultata se vidi da karvakrol ispoljava jasno inhibitorno dejstvo na kontraktilnost parazitske nematode *A. suum*.



**Tabela 4.** Rezultati ANOVA testa. Prikaz srednjih vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu karvakrola (100 i 300  $\mu\text{M}$ ): Kontrola; ACh + karvakrol 100  $\mu\text{M}$ ; ACh + karvakrol 300  $\mu\text{M}$ ; ACh-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x}\pm\text{SE}$ ,  $n=8$ ).

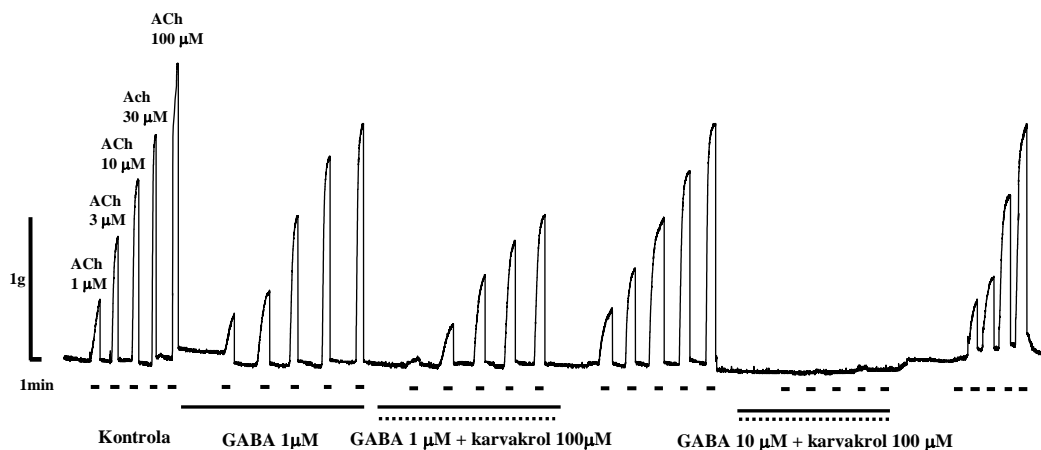
Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
ACh-kontrola	0.53 $\pm$ 0.36	1.10 $\pm$ 0.48	1.39 $\pm$ 0.41	2.09 $\pm$ 0.25	2.34 $\pm$ 0.08
ACh + karvakrol 100 $\mu\text{M}$	0.27 $\pm$ 0.27	0.81 $\pm$ 0.30	1.16 $\pm$ 0.23	1.84 $\pm$ 0.25	2.03 $\pm$ 0.31
ACh + karvakrol 300 $\mu\text{M}$	0.10 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.03** $p=0.001$	0.35 $\pm$ 0.05***+ $p<0.0001$ $p=0.05$	0.96 $\pm$ 0.04***++ $p<0.0001$ $p=0.001$	1.26 $\pm$ 0.11****+ $p<0.0001$ $p<0.0001$
ACh-ispiranje	0.17 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01	1.84 $\pm$ 0.01	2.26 $\pm$ 0.01

\* Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola

+ Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola posle ispiranja

### Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu GABA i karvakrola

Na osnovu ranije postavljenih ciljeva u narednom delu istraživanja ispitan je efekat GABA i karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom, kao i potencijalna interakcija između njih. Primenjeni protokol podrazumevao je kontrolnu seriju kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), zatim seriju kontrakcija izazvanih istim koncentracijama ACh, ali u prisustvu 1  $\mu\text{M}$  GABA i kombinacije 1  $\mu\text{M}$  GABA + 100  $\mu\text{M}$  karvakrola, zatim seriju kontrolnih kontrakcija posle ispiranja preparata i na kraju efekat 10  $\mu\text{M}$  GABA + 100 $\mu\text{M}$  karvakrola na iste koncentracije acetilholina (Slika 21).



**Slika 21.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija koju proizvode GABA i karvakrol. Isprekidane linije pokazuju aplikaciju acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), puna linija prikazuje prisustvo GABA u koncentracijama od 1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ , dok linija u tačkama predstavlja inkubaciju sa 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.

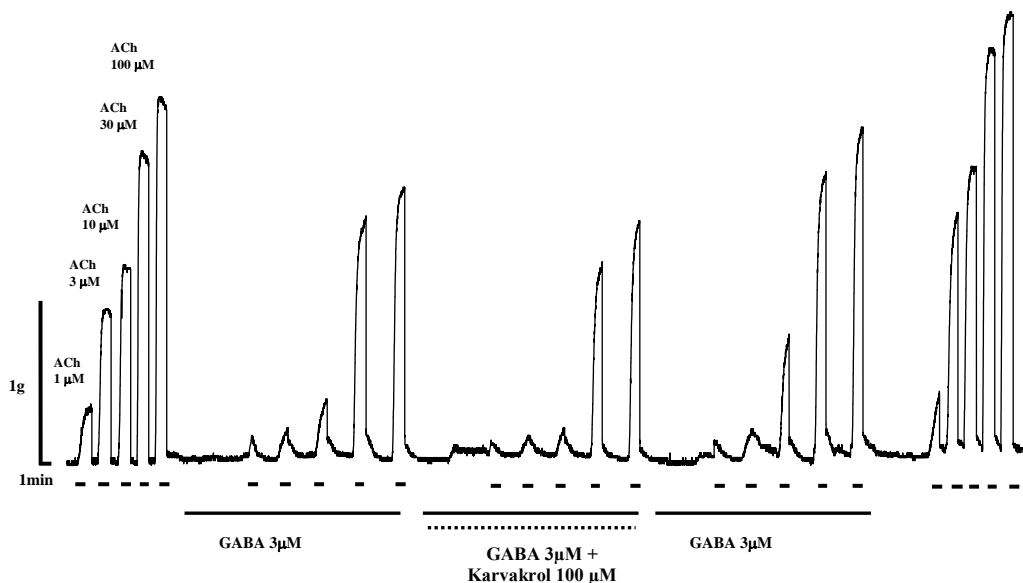
Kontrolna vrednost  $EC_{50}$  za ACh u ovom ispitivanju iznosila je 13.50  $\mu\text{M}$  a maksimalni kontraktilni efekat 1.37 g. Inkubacija sa 1  $\mu\text{M}$  GABA nije značajnije promenila vrednost  $EC_{50}$  za ACh (12.19  $\mu\text{M}$ ) niti vrednost maksimalnih kontrakcija (1.21g). Kombinacija GABA 1  $\mu\text{M}$  i karvakrol 100 $\mu\text{M}$  takođe nije značajnije promenila  $EC_{50}$  ACh (15.63  $\mu\text{M}$ ) ali je smanjila maksimalni efekat za više od 0.5 g, pa je  $E_{\text{max}}$  iznosio 0.80 g. Posle ispiranja preparata ponovo su dobijene vrednosti kontrakcija približne kontrolnim. Međutim, kombinacija viših koncentracija GABA 10  $\mu\text{M}$  i karvakrola 100  $\mu\text{M}$ , gotovo je potpuno inhibisala kontrakcije izazvane rastućim koncentracijama ACh (Slika 21 i Tabela 5).

**Tabela 5.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktilnog efekta ACh i uticaja GABA i karvakrola na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $EC_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Acetilholin- kontrola</b>						
13.50	3.44-50.27	1.12	1.37	1.06-1.69	0.71	5
<b>Acetilholin + GABA 1 <math>\mu\text{M}</math></b>						
12.19	3.09-48.16	1.09	1.21	0.93-1.49	0.70	5
<b>Acetilholin + GABA 1 <math>\mu\text{M}</math> + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
15.63	3.38-72.22	1.19	0.80	0.56- 1.05	0.65	5
<b>Acetilholin-kontrola</b>						
9.28	1.49-57.95	0.97	1.22	0.88-1.56	0.57	5
<b>Acetilholin+ GABA 10 <math>\mu\text{M}</math> + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
19.34	5.34-70.03	1.29	0.15	0.10-0.19	0.73	5
<b>Acetilholin-kontrola</b>						
10.25	1.81-58.09	1.01	0.93	0.68-1.17	0.59	5

U narednom istraživanju testiran je uticaj 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom (Slika 22).

Ukupan broj preparata korišćenih u ovom ispitivanju bio je šest. Iz rezultata se može videti da kombinacija 1  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola dovodi do smanjenja maksimalnog efekta za skoro pola grama. U kombinaciji 10  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola vrednost maksimalnog efekta je skoro 10 puta manja (sa 1.37 g na 0.15 g).



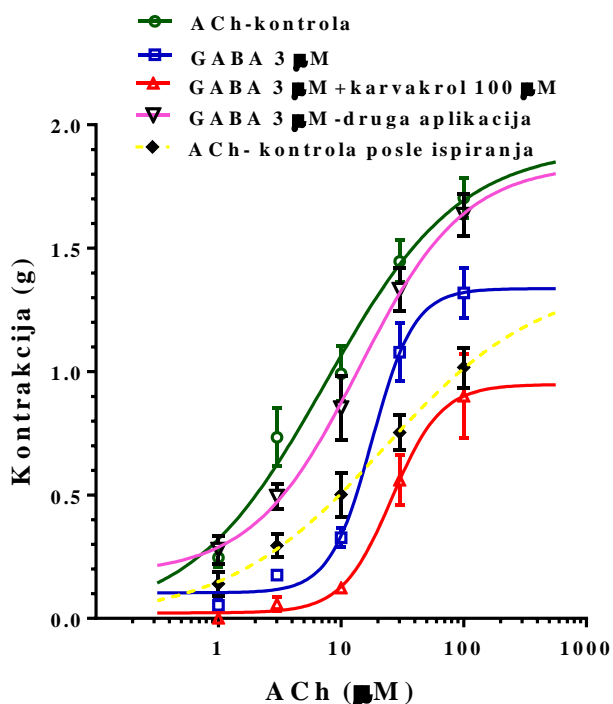
**Slika 22.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum*, izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija izazvana sa GABA i karvakrolom. Isprekidane linije pokazuju aplikaciju acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), puna linija ukazuje na prisustvo GABA u koncentraciji od 3  $\mu\text{M}$ , dok linija u tačkama označava prisustvo karvakrola u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ .

U tabeli 6 su prikazani rezultati nelinearne regresione analize dobijenih rezultata. Kontrolna vrednost  $EC_{50}$  za ACh iznosila je 7.47  $\mu\text{M}$  a  $E_{\text{max}}$  1.91 g. Inkubacija preparata sa 3  $\mu\text{M}$  GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti  $EC_{50}$  na 17.87  $\mu\text{M}$  dok je maksimalni efekat opao na 1.34 g. Kombinacija GABA 3  $\mu\text{M}$  i karvakrola 100  $\mu\text{M}$  posle 3 minuta inkubacije, još intenzivnije je inhibisala kontrakcije izazvane ACh. Vrednost  $EC_{50}$  bila je 25.84  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}=0.95$  g. Ponovljena inkubacija sa GABA 3  $\mu\text{M}$  izazvala je inhibiciju sličnog intenziteta kao i prethodna (Tabela 6).

**Tabela 6.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktalnog efekta ACh i uticaja 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*.

Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $EC_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Acetilholin- kontrola</b>						
7.47	2.89-19.33	0.87	1.91	1.14-2.67	0.85	6
<b>Acetilholin + GABA 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
17.87	13.26-24.08	1.25	1.34	1.16-1.51	0.90	6
<b>Acetilholin+ GABA 3 <math>\mu\text{M}</math>+karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
25.84	15.44-43.25	1.41	0.95	0.65-1.24	0.75	6
<b>Acetilholin+ GABA 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
22.22	2.23-221.70	1.35	1.38	0.31-2.45	0.80	6
<b>Acetilholin- kontrola nakon ispiranja</b>						
13.89	6.40-30.16	1.14	1.84	1.20-2.48	0.87	6

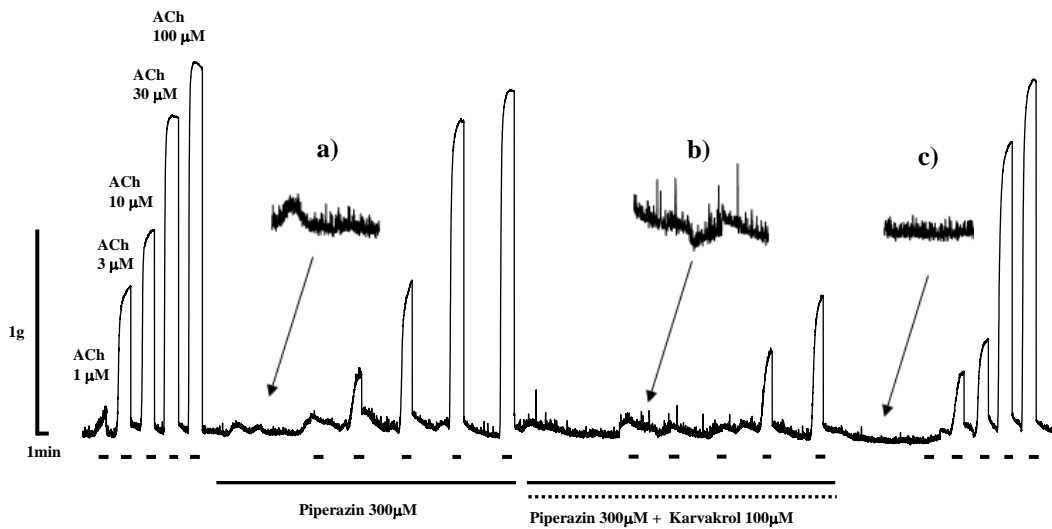
Na slici 23 grafički je prikazan rezultat nelinearne regresione analize efekta 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije izazvane rastućim koncentracijama acetilholina.



**Slika 23.** Sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta acetilholina na kontrakcijeneuromišićnog prepratata *A. suum*. Sigmoidne krive prikazane su različitim bojama: kontrola ACh (n=6, zelena); u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA (n=6, plava); u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA+100  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=6, crvena); u prisustvu GABA posle druge aplikacije (n=6, roze); kontrola ACh nakon ispiranja (n=6, žuta).

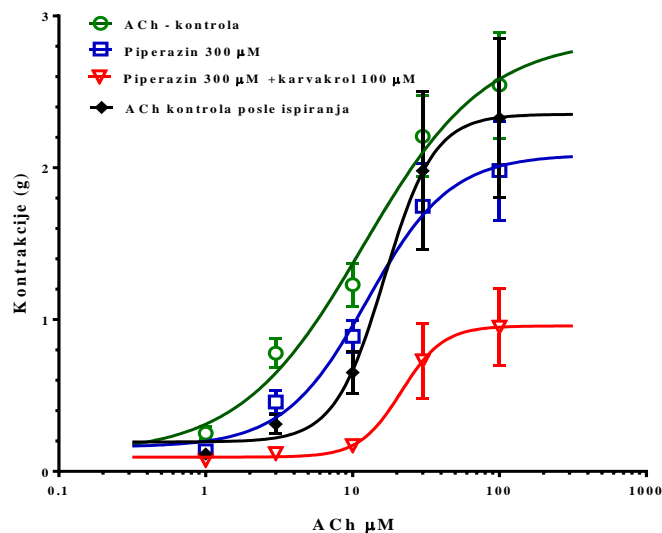
### Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu piperazina i karvakrola

Ranija ispitivanja mehanizma dejstva piperazina ukazuju da on spada u grupu agonista GABA receptora. U narednom ispitivanju testiran je uticaj piperazina i karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*. Primenjeni protokol podrazumevao je kontrolnu seriju aplikacije acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), potom je ispitan uticaj 300  $\mu\text{M}$  piperazina i kombinacije 300  $\mu\text{M}$  piperazina i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije izazvane ACh. Na kraju ispitivanja preparat je ispiran i urađena je kontrolna serija kontrakcija kako bi se utvrdila reverzibilnost ispitivanih efekata (Slika 24). Ukupan broj ispitanih preparata *A. suum* iznosio je pet.



**Slika 24.** Izometrijske kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, izazvane rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija piperazinom i karvakrolom. Isprekidana kratka linija pokazuje aplikaciju acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), puna linija obeležava prisustvo 300  $\mu\text{M}$  piperazina, dok linija u tačkama ukazuje na prisustvo 100  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Na slici 25 prikazane su sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta acetilholina u prisustvu piperazina i karvakrola. Broj ispitanih preparata iznosio je šest.



**Slika 25.** Prikaz sigmoidnih kriva dobijenih nelinearnom regresionom analizom rezultata izometrijskih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina. ACh kontrola ( $n=6$ , kriva zelene boje); u prisustvu 300  $\mu\text{M}$  piperazina ( $n=6$ , kriva plave boje); u prisustvu 300  $\mu\text{M}$  piperazina i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , kriva crvene boje); ACh kontrola nakon ispiranja ( $n=6$ , kriva crne boje).

U tabeli 7 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize efekta rastućih koncentracija acetilholina i uticaja 300  $\mu\text{M}$  piperazina i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije.

**Tabela 7.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktalnog efekta ACh i uticaja 300  $\mu\text{M}$  piperazina i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekt ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Acetilholin- kontrola</b>						
11.75	4.09-33.74	1.07	2.88	2.24-3.52	0.76	6
<b>Acetilholin + piperazin 300 <math>\mu\text{M}</math></b>						
13.24	3.94-44.56	1.12	2.31	1.67-2.96	0.71	6
<b>Acetilholin + piperazin 300 <math>\mu\text{M}</math> + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
33.25	2.63-419.80	1.52	1.31	0.31-2.30	0.48	6
<b>Acetilholin-kontrola posle ispiranja</b>						
22.39	5.73-87.48	1.35	2.97	1.64-4.30	0.56	6

Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  za ACh iznosila je 11.75  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}$  2.88 g. Inkubacija preparatata sa 300  $\mu\text{M}$  piperazina imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  na 13.24  $\mu\text{M}$ , dok je maksimalni efekat opao na 2.31 g. Kombinacija 300  $\mu\text{M}$  piperazina i karvakrola 100  $\mu\text{M}$  posle 3 minuta inkubacije, još intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane sa ACh. Vrednost  $\text{EC}_{50}$  bila je 33.25  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}=1.31$  g. Ispiranjem je dobijena vrednost  $\text{EC}_{50}$  od 22.39  $\mu\text{M}$  sa maksimalnim efektom većim nego kontrolnim koji je iznosio 2.97 g.

U tabeli 8 prikazani su rezultati ANOVA testa srednjih vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih acetilholinom i efekat piperazina i karvakrola.

**Tabela 8.** Prikaz analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija ( $\pm\text{S.E.}$ , g) preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibitorni uticaj piperazina (300  $\mu\text{M}$ ) i karvakrola (100  $\mu\text{M}$ ) na te kontrakcije.

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
ACh-kontrola	0.25 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.09	1.23 $\pm$ 0.14	2.21 $\pm$ 0.08	2.54 $\pm$ 0.34
ACh + piperazin 300 $\mu\text{M}$	0.13 $\pm$ 0.01* <i>p</i> =0.0195	0.46 $\pm$ 0.07* <i>p</i> =0.0248	0.89 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.11** <i>p</i> =0.0015	1.98 $\pm$ 0.32
ACh+ Piperazin 300 $\mu\text{M}$ + Karvakrol 100 $\mu\text{M}$	0.07 $\pm$ 0.01**++ <i>p</i> =0.0072 <i>p</i> =0.0012	0.12 $\pm$ 0.02***+++ <i>p</i> =0.0006 <i>p</i> =0.0059	0.17 $\pm$ 0.02***+++ <i>p</i> =0.0006 <i>p</i> =0.0008	0.56 $\pm$ 0.10***+++ <i>p</i> <0.0001 <i>p</i> =0.0002	0.95 $\pm$ 0.25***+ <i>p</i> =0.0015 <i>p</i> =0.017
ACh-ispiranje	0.11 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.29	1.33 $\pm$ 0.09	2.33 $\pm$ 0.52

\* Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola

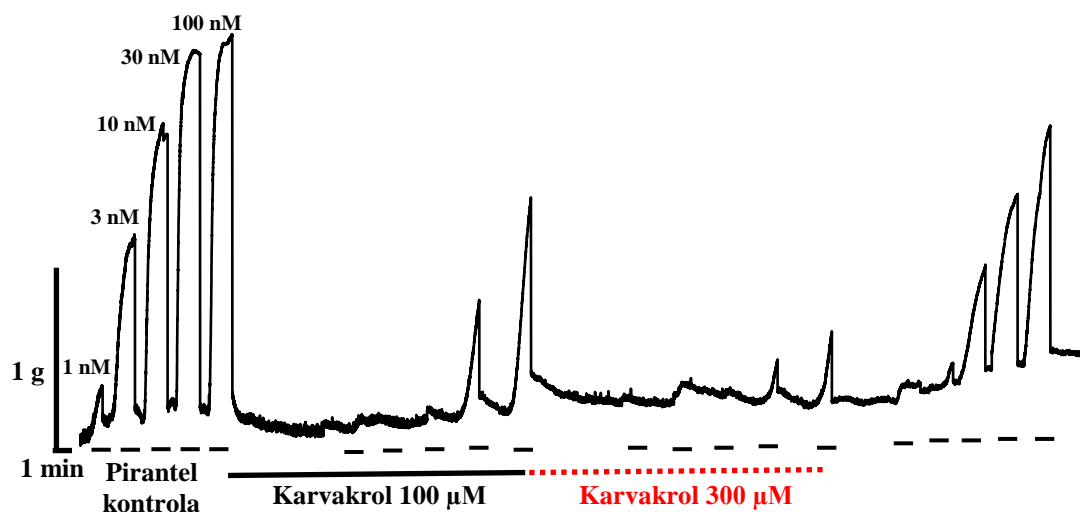
+ Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola posle ispiranja

Rezultati analize varijanse pokazuju da je piperazin u koncentraciji od 300  $\mu\text{M}$  smanjio kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, ali je to smanjenje dostiglo stepen statističke značajnosti prilikom aplikacije 1, 3 i 30  $\mu\text{M}$  ACh u odnosu na kontrolu. Međutim, u kombinaciji 300  $\mu\text{M}$  piperazina i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola zabeležena je visoka signifikantnost inhibicije u svim primenjenim rastućim koncentracijama u odnosu na kontrolu i u odnosu na ispiranje (Tabela 8).

### 5.1.2. Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih pirantelom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA

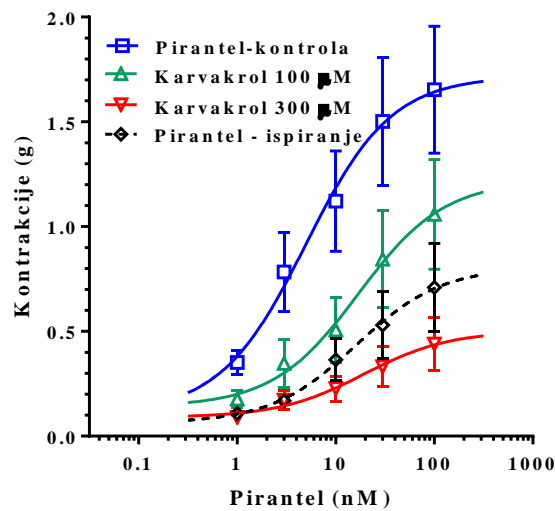
#### Uticaj karvakrola na izometrijske kontrakcije izazvane pirantelom

Ranija istraživanja pirantela ukazuju da je on agonista N-tipa nikotinskog receptora nematoda. Ispitan je uticaj karvakrola na kontrakcije izazvane pirantelom na preparatu *A. suum*. Primenjen je protokol u kome je na početku urađena kontrolna serija kontrakcija izazvanih pirantelom (1, 3, 10, 30 i 100 nM), a zatim su preparati inkubirani 5 minuta sa 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola. Na kraju serije preparat je ispran i urađena je kontrolna serija kontrakcija (Slika 26). Ukupan broj ispitanih preparata iznosio je šest.



**Slika 26.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM) i efekat 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola na te kontrakcije.

Na slici 27 prikazane su sigmoidne krive odnosa koncentracija i kontraktilnog efekta pirantela na neuromišićnom preparatu *A. suum* bez i u prisustvu karvakrola.



**Slika 27.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta pirantela bez i u prisustvu karvakrola: pirantel kontrola ( $n=6$ , plava); u prisustvu  $100 \mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , zelena); u prisustvu  $300 \mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , crvena); pirantel kontrola nakon ispiranja ( $n=6$ , crna).

U tabeli 9 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize ispitivanja kontraktalnog efekta pirantela i uticaja karvakrola na taj efekat.

**Tabela 9.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktalnog efekta pirantela i uticaja  $100 \mu\text{M}$  i  $300 \mu\text{M}$  karvakrola na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) (nM)	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ (nM)	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekt ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Pirantel - kontrola</b>						
4.97	0.55-45.17	0.70	1.72	1.21-2.23	0.44	6
<b>Pirantel + karvakrol <math>100 \mu\text{M}</math></b>						
17.05	1.64-177.10	1.23	1.22	0.58-1.86	0.39	6
<b>Pirantel + karvakrol <math>300 \mu\text{M}</math></b>						
19.32	1.25-297.60	1.29	0.50	0.20-0.80	0.32	6
<b>Pirantel - kontrola posle ispiranja</b>						
16.16	1.51-173	1.21	0.81	0.37-1.24	0.38	6

Kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) pirantela bila je  $4.97 \mu\text{M}$  a u prisustvu  $100 \mu\text{M}$  karvakrola se povećala na  $17.05 \text{ nM}$ , dok je  $300 \mu\text{M}$  karvakrola povećalo vrednost  $\text{EC}_{50}$  na  $19.32 \text{ nM}$ . Posle ispiranja preparata  $\text{EC}_{50}$  je neznatno smanjena na  $16.16 \text{ nM}$ , što je i dalje bilo skoro četverostruko više od kontrolnog nalaza. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) sa



kontrolnih 1.72 g, na 1.22 g a druga na čak 0.50 g. Posle ispiranja maksimalni efekat je dostigao vrednost od 0.81 g.

U tabeli 10 prikazani su rezultati testova analize varijanse kontrakcija izazvanih pirantelom bez i u prisustvu karvakrola (100 i 300 $\mu$ M).

**Tabela 10.** Rezultati ANOVA testa. Prikaz srednjih vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela bez i u prisustvu karvakrola (100  $\mu$ M i 300  $\mu$ M): pirantel-kontrola; pirantel + karvakrol 100  $\mu$ M; pirantel+ karvakrol 300  $\mu$ M; pirantel-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x}\pm$ SE, n=6).

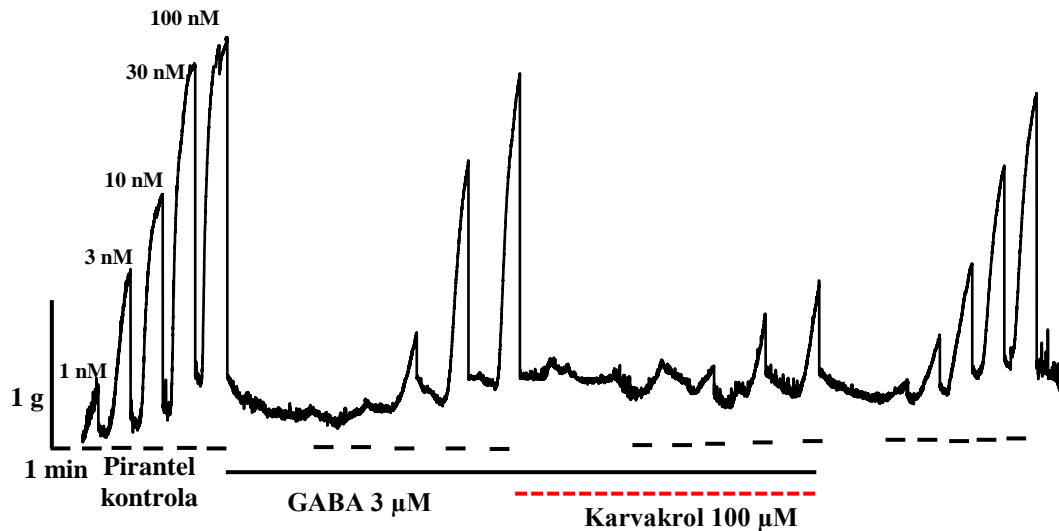
Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1nM	3nM	10nM	30nM	100nM
<b>Pirantel-kontrola</b>	0.35 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.19	1.12 $\pm$ 0.24	1.50 $\pm$ 0.30	1.65 $\pm$ 0.30
<b>Pirantel + karvakrol 100<math>\mu</math>M</b>	0.18 $\pm$ 0.04* <i>p</i> =0.01	0.35 $\pm$ 0.11* <i>p</i> =0.05	0.51 $\pm$ 0.15* <i>p</i> =0.05	0.84 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.26
<b>Pirantel + karvakrol 300<math>\mu</math>M</b>	0.09 $\pm$ 0.01*** <i>p</i> =0.0002	0.17 $\pm$ 0.05** <i>p</i> =0.005	0.23 $\pm$ 0.06** <i>p</i> =0.003	0.33 $\pm$ 0.09** <i>p</i> =0.004	0.44 $\pm$ 0.12** <i>p</i> =0.008
<b>Pirantel-ispiranja</b>	0.11 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.10	0.53 $\pm$ 0.16	0.71 $\pm$ 0.21

\* Statistička značajnost u odnosu na Pirantel-kontrola

Iz tabele 10 se vidi da karvakrol u koncentraciji od 100  $\mu$ M je signifikantno inhibisao kontrakcije izazvane sa 1, 3 i 10 nM pirantela dok je trostruko viša koncentracija karvakrola visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM).

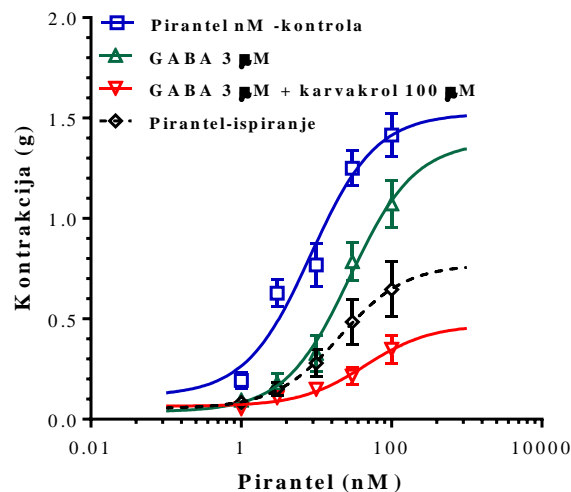
### Izometrijske kontrakcije izazvane pirantelom u prisustvu 3 $\mu$ M GABA i 100 $\mu$ M karvakrola

U prikazanom ispitivanju posmatran je uticaj GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane pirantelom. Protokol ispitivanja bio je sledeći: prvo je urađena kontrolna serija aplikacija rastućih koncentracija pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), potom je ispitan uticaj 3  $\mu$ M GABA na ove kontrakcije, a zatim je preparat inkubiran sa 3  $\mu$ M GABA i 100  $\mu$ M karvakrola. Ispiranjem preparata i kontrolnom serijom kontrakcija na kraju protokola posmatran je oporavak preparata i reverzibilnost efekta karvakrola (Slika 28). Ukupan broj testiranih preparata iznosio je šest.



**Slika 28.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela i inhibicija kontrakcija sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Crne kratke linije pokazuju aplikaciju pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), puna linija pokazuje vreme inkubacije preparata sa 3  $\mu\text{M}$  GABA, dok crvena isprekidana linija pokazuje vreme inkubacije sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola.

U daljoj statističkoj obradi dobijenih vrednosti kontrakcija nelinearnom regresionom analizom dobijene su vrednosti srednjih efektivnih koncentracija pirantela bez i u prisustvu GABA i karvakrola. Na slici 29 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i kontraktinog efekta pirantela bez i u prisustvu GABA i karvakrola.



**Slika 29.** Sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta pirantela na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*. Na grafiku je prikazano: pirantel kontrola ( $n=6$ , plava); aplikacija 3  $\mu\text{M}$  GABA ( $n=6$ , zelena); istovremena aplikacija 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , crvena); pirantel kontrola nakon ispiranja ( $n=6$ , isprekidana crna).

U tabeli 11 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize dobijenih rezultata kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane rastućim koncentracijama pirantela bez i u prisustvu GABA i karvakrola.

**Tabela 11.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktilnog efekta pirantela i uticaja 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) (nM)	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ (nM)	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Pirantel - kontrola</b>						
8.44	3.39-21.04	0.93	1.52	1.28-1.76	0.81	6
<b>Pirantel + GABA 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
28.11	10.48-75.36	1.45	1.38	0.97-1.90	0.80	6
<b>Pirantel + 3 <math>\mu\text{M}</math> GABA+karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
44.64	5.77-345.20	1.65	0.47	0.16-0.78	0.53	6
<b>Pirantel - kontrola posle ispiranja</b>						
20.51	3.57-117.90	1.31	0.77	0.43-1.11	0.54	6

Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  za pirantel iznosila je 8.44 nM, a  $E_{\text{max}}$  1.52 g. Inkubacija preparata sa 3  $\mu\text{M}$  GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  na 28.11 nM, dok je maksimalni efekat opao na 1.38 g.

Kombinacija GABA 3  $\mu\text{M}$  i karvakrola 100  $\mu\text{M}$  posle 5 minuta inkubacije, još intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane pirantelom. Naime, vrednost  $\text{EC}_{50}$  bila je 44.64 nM, a  $E_{\text{max}}=0.47\text{g}$ . Nakon ispiranja preparata vrednost srednje efektivne koncentracije vratila se na 20.51 nM, a maksimalni efekat se blago povećao na 0.77 g.

U tabeli 12 prikazani su rezultati testa analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija. Prikazane izračunate vrednosti su dobijene u pomenutom testu sa intervalom pouzdanosti od 95 % ( $p<0.05$ ). Srednje vrednosti kontrakcija sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i srednje vrednosti iz zajedničke inkubacije 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola u testu poređene su sa srednjim vrednostima iz pirantel-kontrola.

**Tabela 12.** Prikaz rezultata ANOVA testa. Izračunate srednje vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela bez i u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola: pirantel-kontrola; pirantel + GABA 3  $\mu\text{M}$ ; pirantel + 3  $\mu\text{M}$  GABA + karvakrol 100  $\mu\text{M}$ ; pirantel-kontrola nakon ispiranja ( $x \pm \text{SE}$ ,  $n=6$ ).

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1nM	3nM	10nM	30nM	100nM
Pirantel-kontrola	0.19 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.10	1.25 $\pm$ 0.09	1.41 $\pm$ 0.11
Pirantel + GABA 3 $\mu\text{M}$	0.09 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05**** <i>p</i> <0.0001	0.33 $\pm$ 0.09** <i>p</i> =0.004	0.78 $\pm$ 0.09** <i>p</i> =0.006	1.07 $\pm$ 0.12
Pirantel + GABA 3 $\mu\text{M}$ + karvakrol 100 $\mu\text{M}$	0.05 $\pm$ 0.01** <i>p</i> =0.006	0.11 $\pm$ 0.03**** <i>p</i> <0.0001	0.15 $\pm$ 0.03**** <i>p</i> <0.0001	0.21 $\pm$ 0.04**** <i>p</i> <0.0001	0.35 $\pm$ 0.07**** <i>p</i> <0.0001
Pirantel-kontrola posle ispiranja	0.08 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.14

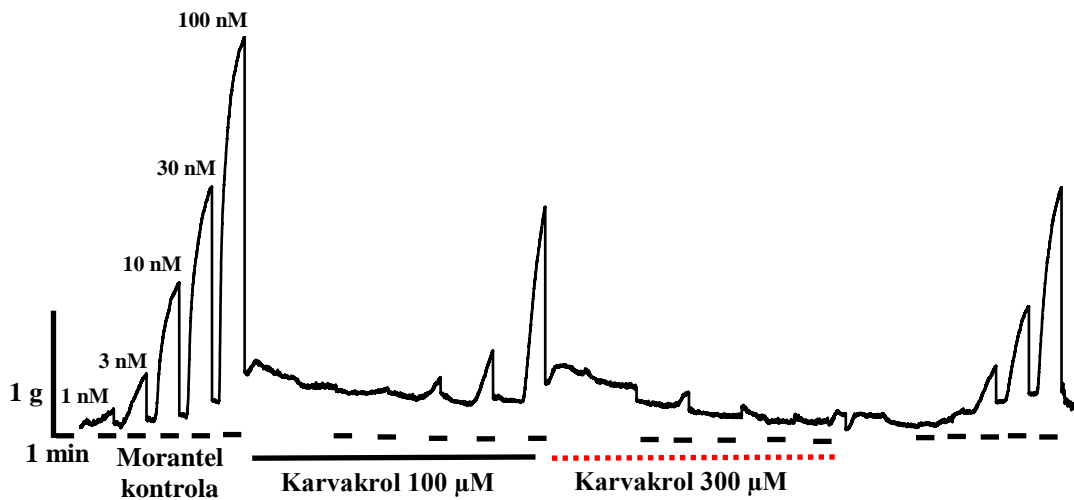
\* Statistička značajnost u odnosu na Pirantel-kontrola

Kao što se iz tabele 12 može videti GABA je u koncentraciji od 3  $\mu\text{M}$  signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 3, 10 i 30 nM pirantela, dok je 3  $\mu\text{M}$  GABA u kombinaciji sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM).

### 5.1.3. Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih morantelom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA

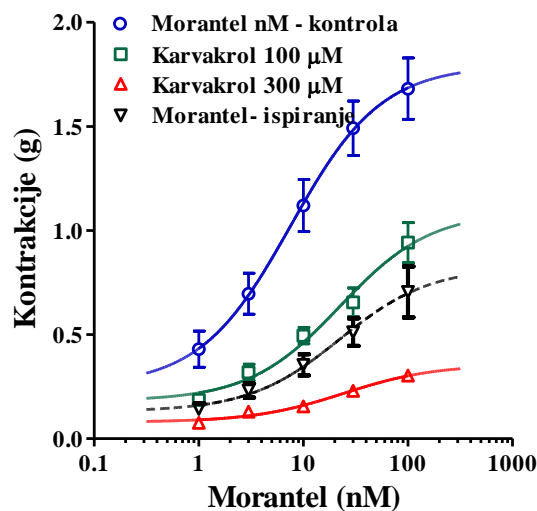
#### Uticaj karvakrola na izometrijske kontrakcije izazvane morantelom

Za razliku od pirantela i oksantela, specifičnost dejstva morantela, trećeg antinematodnog tetrahidropirimidina u odnosu na podtipove nikotinskog receptora nije potpuno definisana. Naše ispitivanje je sprovedeno na neuromišićnom preparatu *A. suum*, početnom serijom aplikacije rastućih koncentracija morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), zatim su preparati inkubirani sa 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola. Protokol je završen posle ispiranja preparata još jednom kontrolnom serijom kontrakcija. Od ukupno šest ispitanih preparata na slici 30 prikazan je originalni reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija.



**Slika 30.** Originalni reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama morantela i inhibicija kontrakcija sa 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola. Crna kratka linija pokazuje aplikaciju morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), puna prikazuje prisustvo 100  $\mu\text{M}$  karvakrola, dok crvena isprekidana linija u tačkama označava inkubaciju sa 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Dozno-zavisni kontraktilni efekat morantela analiziran je nelinearnom regresijom a dobijene sigmoidne krive prikazane su na slici 31. Na slici 31 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i kontraktilnog efekta morantela u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.



**Slika 31.** Grafički prikaz dozno-zavisnih sigmoidnih kriva kontraktilnog efekta morantela bez i u prisustvu karvakrola: morantel kontrola ( $n=6$ , plava); u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , zelena); u prisustvu 300  $\mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , crvena); kontrola morantel nakon ispiranja ( $n=6$ , crna). Svaka tačka predstavlja  $\bar{x} \pm \text{SE}$ .

U tabeli 13 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize kontraktilnog efekta morantela, bez i u prisustvu karvakrola.

**Tabela 13.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktilnog efekta morantela i uticaja 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) (nM)	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ (nM)	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Morantel - kontrola</b>						
7.59	2.59-22.25	0.88	1.79	1.50-2.08	0.76	6
<b>Morantel + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
22.45	8.24-61.20	1.35	1.09	0.83-1.35	0.78	6
<b>Morantel + karvakrol 300 <math>\mu\text{M}</math></b>						
24.25	8.49-69.25	1.38	0.36	0.27-0.44	0.77	6
<b>Morantel - kontrola posle ispiranja</b>						
22.29	5.06-98.11	1.35	0.82	0.53-1.11	0.62	6

Rezultati pokazuju da je kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) morantela bila 7.59 nM. Inkubacija preparata sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  na 22.45 nM, dok je tri puta viša koncentracija (300  $\mu\text{M}$ ) karvakrola samo manje promenila prethodnu vrednost  $\text{EC}_{50}$  na 24.25 nM. Posle ispiranja preparata  $\text{EC}_{50}$  je i dalje bila na istom nivou od 22.29 nM. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) sa kontrolnih 1.79 g, na 1.09 g a druga na čak 0.36 g. Posle ispiranja, maksimalni efekat je dostigao vrednost od 0.82 g.

U tabeli 14 nalaze se rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija.

**Tabela 14.** Prikaz rezultata ANOVA testa sa izračunatim srednjim vrednostima kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama morantela bez i u prisustvu karvakrola (100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$ ): morantel-kontrola; morantel + karvakrol 100  $\mu\text{M}$ ; morantel + karvakrol 300  $\mu\text{M}$ ; morantel-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ , n=6).

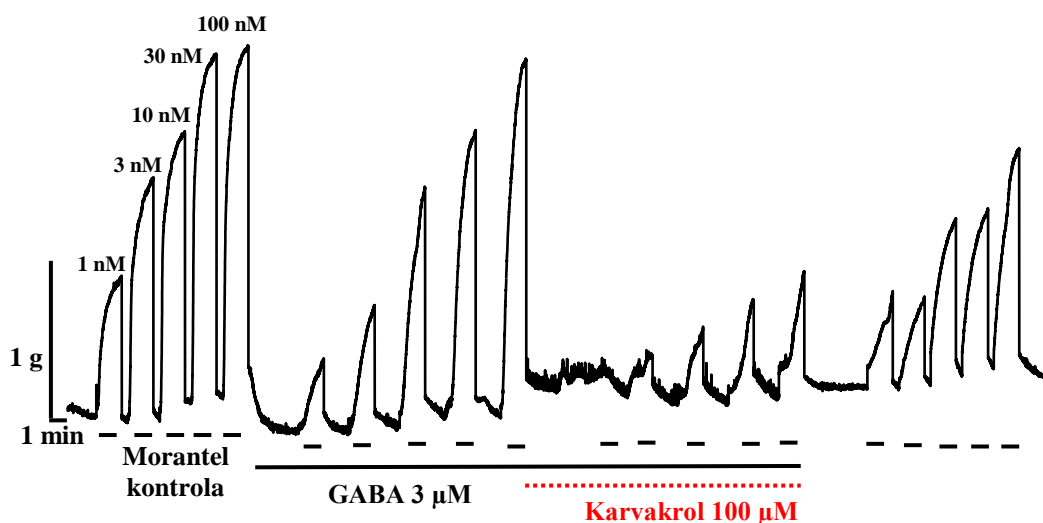
Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1nM	3nM	10nM	30nM	100nM
<b>Morantel-kontrola</b>	0.43±0.09	0.70±0.09	1.12±0.12	1.49±0.13	1.68±0.15
<b>Morantel + karvakrol 100<math>\mu\text{M}</math></b>	0.19±0.02** <i>p</i> =0.008	0.32±0.04*** <i>p</i> =0.0006	0.49±0.04**** <i>p</i> <0.0001	0.65±0.07**** <i>p</i> <0.0001	0.94±0.09*** <i>p</i> =0.0005
<b>Morantel + karvakrol 300<math>\mu\text{M}</math></b>	0.08±0.01*** <i>p</i> =0.0002	0.13±0.02**** <i>p</i> <0.0001	0.15±0.02**** <i>p</i> <0.0001	0.23±0.02**** <i>p</i> <0.0001	0.30±0.02**** <i>p</i> <0.0001
<b>Morantel -ispiranje</b>	0.14±0.02	0.23±0.03	0.35±0.05	0.51±0.07	0.70±0.12

\* Statistička značajnost u odnosu na Morantel-kontrola

Iz tabele se vidi da je karvakrol u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  signifikantno inhibisao kontrakcije svih aplikovanih rastućih koncentracija morantela, dok je 300  $\mu\text{M}$  karvakrola takođe visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane testiranim rastućim koncentracijama morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM).

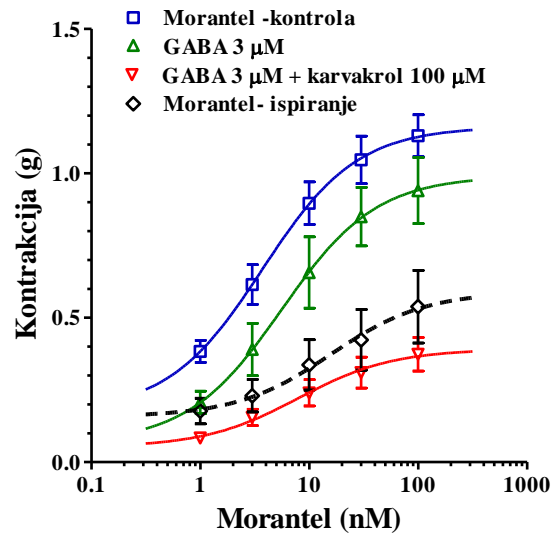
### Izometrijske kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane morantelom u prisustvu 3 $\mu\text{M}$ GABA i 100 $\mu\text{M}$ karvakrola

U ovom ispitivanju posmatran je uticaj GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane morantelom. Protokol ispitivanja bio je sledeći: prvo je urađena kontrolna serija aplikacija rastućih koncentracija morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), potom je ispitan uticaj 3  $\mu\text{M}$  GABA na ove kontrakcije, a zatim je preparat inkubiran sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Ispiranjem preparata i kontrolnom serijom kontrakcija na kraju protokola posmatran je oporavak preparata (Slika 32). Ukupan broj ispitanih preparata iznosio je šest.



**Slika 32.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane rastućim koncentracijama morantela i inhibicija kontrakcija sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Kratka crna linija predstavlja aplikaciju morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM), puna linija ukazuje na prisustvo 3  $\mu\text{M}$  GABA, dok crvena isprekidana linija u tačkama ukazuje na inkubaciju sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Dozno-zavisni kontraktilni efekat morantela i dejstvo GABA i karvakrola na taj efekat analiziran je nelinearnom regresijom. Na slici 33 prikazane su sigmoidne krive dozno-zavisnog efekta morantela.



**Slika 33.** Grafički prikaz dozno-zavisnih sigmoidnih kriva kontraktalnog efekta morantela bez i u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Prikazani su: morantel kontrola ( $n=6$ , plava); aplikacija 3  $\mu\text{M}$  GABA ( $n=6$ , zelena); u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola ( $n=6$ , crvene); morantel kontrola nakon ispiranja ( $n=6$ , isprekidana crna).

U tabeli 15 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize kontrakcija.

**Tabela 15.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktalnog efekta morantela i uticaja 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola na kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum*.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) (nM)	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ (nM)	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekt ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Morantel - kontrola</b>						
3.72	1.20-11.51	0.57	1.16	1.03-1.30	0.76	6
<b>Morantel + GABA 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
5.60	1.19-26.30	0.75	0.99	0.77-1.21	0.61	6
<b>Morantel + 3 <math>\mu\text{M}</math> GABA+karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
7.94	1.36-46.23	0.90	0.39	0.28-0.50	0.53	6
<b>Morantel - kontrola posle ispiranja</b>						
15.81	0.90-277	1.20	0.59	0.29-0.89	0.30	6

Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  morantela iznosila je 3.72 nM, a  $E_{\text{max}}$  1.16 g. Inkubacija preparatata sa 3  $\mu\text{M}$  GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  na 5.60 nM, dok je maksimalni efekat opao na 0.99 g. Kombinacija GABA 3  $\mu\text{M}$  i karvakrola 100  $\mu\text{M}$  posle 5 minuta inkubacije, još intenzivnije je inhibisala kontrakcije



izazvane morantelom. Naime, vrednost  $EC_{50}$  bila je 7.94 nM, a  $E_{max}=0.39$  g. Nakon ispiranja vrednost srednje efektivne koncentracije morantela povećana je na 15.81 nM, dok se maksimalni efekat samo neznatno povećao na 0.59 g.

U tabeli 16 prikazani su rezultati poređenja srednjih vrednosti kontrakcija izazvanih morantelom u ANOVA testu.

**Tabela 16.** Prikaz rezultata ANOVA testa sa izračunatim srednjim vrednostima kontrakcija nervno-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama morantela bez i u prisustvu 3  $\mu$ M GABA i 100  $\mu$ M karvakrola: morantel-kontrola; morantel + GABA 3  $\mu$ M; morantel + GABA 3  $\mu$ M + karvakrol 100  $\mu$ M; morantel-kontrola nakon ispiranja ( $x \pm SE$ ,  $n=6$ ).

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1nM	3nM	10nM	30nM	100nM
Morantel-kontrola	0.38 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.07
Morantel+ GABA 3 $\mu$ M	0.21 $\pm$ 0.04* <i>p</i> =0.12	0.39 $\pm$ 0.09* <i>p</i> =0.10	0.66 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.11
Morantel+ GABA 3 $\mu$ M+ karvakrol 100 $\mu$ M	0.08 $\pm$ 0.02**** <i>p</i> <0.0001	0.15 $\pm$ 0.03*** <i>p</i> =0.0004	0.24 $\pm$ 0.04*** <i>p</i> =0.0002	0.31 $\pm$ 0.05**** <i>p</i> <0.0001	0.37 $\pm$ 0.06*** <i>p</i> =0.0001
Morantel-ispiranje	0.18 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.12

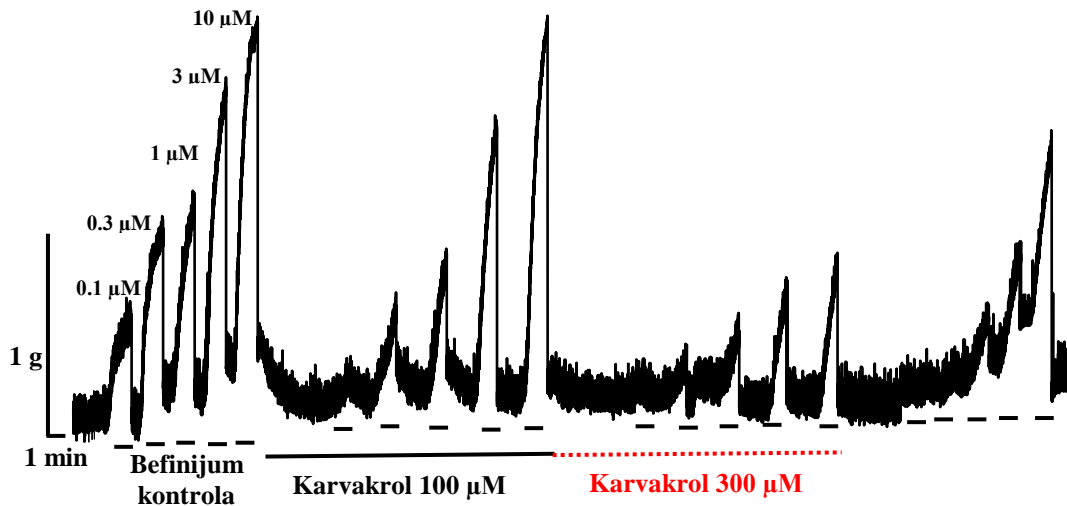
\* Statistička značajnost u odnosu na Morantel-kontrola

Na osnovu rezultata testa može se videti da je GABA je u koncentraciji od 3  $\mu$ M signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 1 i 3 nM morantela, dok je 3  $\mu$ M GABA u kombinaciji sa 100  $\mu$ M karvakrola visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama morantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM).

#### 5.1.4. Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih befinijumom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA

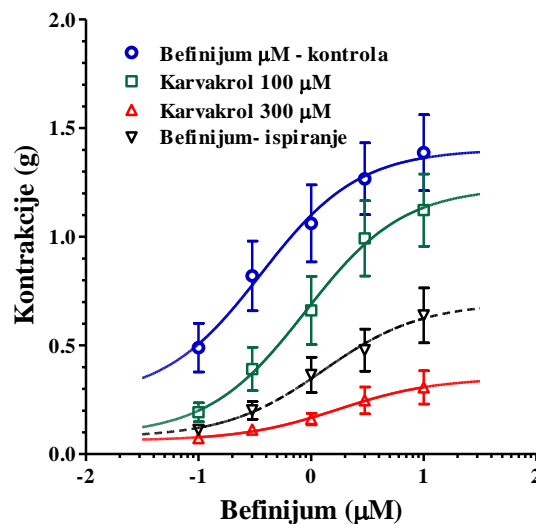
##### Uticaj karvakrola na izometrijske kontrakcije izazvane befinijumom

Literaturni podaci o befinijumu ukazuju da je on agonista B-podtipa nikotinskog acetilholinskog receptora parazitskih nematoda. U ispitivanju njegovog kontraktilnog dejstva koristili smo isti protokol kao i kod prethodno testiranih agonista. Ispitivane su rastuće koncentracije befinijuma od 100 nM, 300 nM, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, a zatim i dejstvo karvakrola 100 i 300 mM na te kontrakcije (Slika 34).



**Slika 34.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama befinijuma i inhibicija kontrakcija posle inkubacije preparata sa 100 i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola. Crne kratke linije označavaju aplikaciju befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10  $\mu\text{M}$ ), puna linija pokazuje prisustvo 100  $\mu\text{M}$  karvakrola, dok crvena isprekidana linija ukazuje na inkubaciju sa 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Dobijeni rezultati kontrakcija izazvanih befinijumom analizirani su nelinearnom regresijom, čime su dobijene vrednosti  $\text{EC}_{50}$  befinijuma i  $E_{\text{max}}$ . Na slici 35 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i kontraktalnog efekta befinijuma bez i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.



**Slika 35.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta befinijuma bez i u prisustvu karvakrola. Prikazani su: befinijum-kontrola (n=7, plava); befinijum u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=7, zelena); befinijum u prisustvu 300  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=7, crvena); befinijum kontrola nakon ispiranja (n=7, isprekidana crna).

U tabeli 17 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize.

**Tabela 17.** Rezultati ispitivanja dozne zavisnosti kontraktilnog efekta befinijuma i uticaja 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekt ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Befinijum - kontrola</b>						
0.36	0.04-3.56	-0.44	1.40	1.09-1.72	0.40	7
<b>Befinijum + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
0.89	0.17-4.62	-0.05	1.23	0.87-1.59	0.52	7
<b>Befinijum + karvakrol 300 <math>\mu\text{M}</math></b>						
1.74	0.18-16.64	0.24	0.35	0.18-0.52	0.36	7
<b>Befinijum - kontrola posle ispiranja</b>						
1.29	0.21-8.04	0.11	0.69	0.44-0.95	0.46	7

Preračunata kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) befinijuma bila je 0.36  $\mu\text{M}$ , u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola iznosila je 0.89  $\mu\text{M}$ , dok je inkubacija sa 300  $\mu\text{M}$  karvakrola povećala vrednost  $\text{EC}_{50}$  befinijuma na 1.74  $\mu\text{M}$ . Posle ispiranja preparata  $\text{EC}_{50}$  je smanjena na 1.29  $\mu\text{M}$ , što je i dalje bilo skoro četverostruko više od kontrolnog nalaza. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila maksimalni efekt ( $E_{\text{max}}$ ) sa kontrolnih 1.40 g, na 1.23 g a druga na čak 0.35 g. Posle ispiranja maksimalni efekat je dostigao vrednost od 0.69 g.

U tabeli 18 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija izazvanih befinijumom bez i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola.

**Tabela 18.** ANOVA test. Izračunate srednje vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane rastućim koncentracijama befinijuma bez i u prisustvu karvakrola (100  $\mu\text{M}$  i 300  $\mu\text{M}$ ): befinijum-kontrola; befinijum + karvakrol 100  $\mu\text{M}$ ; befinijum + karvakrol 300  $\mu\text{M}$ ; befinijum-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ , n=7)

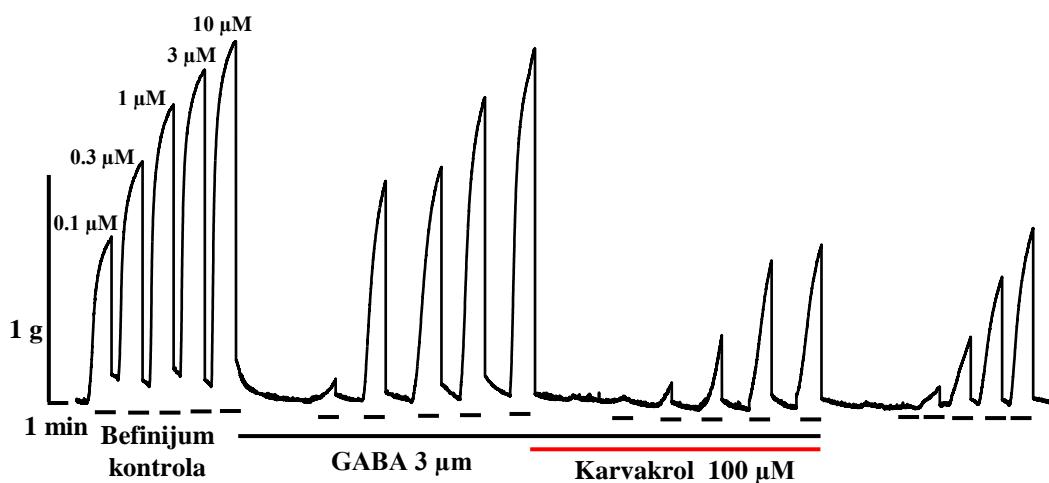
Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	0.1 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
<b>Befinijum-kontrola</b>	0.49 $\pm$ 0.11	0.82 $\pm$ 0.16	1.06 $\pm$ 0.18	1.27 $\pm$ 0.16	1.39 $\pm$ 0.17
<b>Befinijum + karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.19 $\pm$ 0.04* <i>p</i> =0.01	0.39 $\pm$ 0.10* <i>p</i> =0.02	0.66 $\pm$ 0.16	0.99 $\pm$ 0.17	1.12 $\pm$ 0.17
<b>Befinijum + karvakrol 300 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.07 $\pm$ 0.01*** <i>p</i> =0.0004	0.11 $\pm$ 0.01*** <i>p</i> =0.0002	0.16 $\pm$ 0.03*** <i>p</i> =0.0002	0.25 $\pm$ 0.06**** <i>p</i> <0.0001	0.31 $\pm$ 0.08**** <i>p</i> <0.0001
<b>Befinijum-ispiranje</b>	0.11 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.13

\* Statistička značajnost u odnosu na Befinijum-kontrola

Rezultati iz tabele pokazuju da je karvakrol u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  signifikantno inhibisao kontrakcije nakon aplikacije 0.1  $\mu\text{M}$  i 0.3  $\mu\text{M}$  befinijuma, dok je 300  $\mu\text{M}$  karvakrola visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10  $\mu\text{M}$ ).

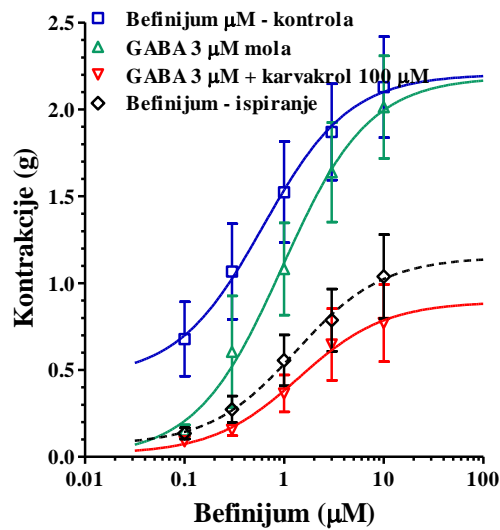
### Izometrijske kontrakcije izazvane befinijumom u prisustvu 3 $\mu\text{M}$ GABA i 100 $\mu\text{M}$ karvakrola

U daljoj analizi dejstva karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane befinijumom, ispitan je njegov zajednički efekat sa GABA. Posle početne prve serije kontrolnih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama befinijuma, preparate smo inkubirali sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Na slici 36 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija.



**Slika 36.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama befinijuma i inhibicija kontrakcija sa 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Isprekidana kratka linija ukazuje na aplikaciju befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10  $\mu\text{M}$ ), puna linija na inkubaciju sa 3  $\mu\text{M}$  GABA, dok crvena linija označava inkubaciju sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Statističkom analizom dobijenih rezultata, primenom nelinearne regresije, dobijene su dozno-zavisne sigmoidne krive odnosa koncentracije i kontraktalnog efekta befinijuma bez i u prisustvu GABA i karvakrola (Slika 37).



**Slika 37.** Grafički prikaz dozno-zavisnih sigmoidnih kriva kontraktalnog efekta befinijuma bez i u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola. Prikazani su: befinijum kontrola (n=6, plava); u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA (n=6, zelena); aplikacija 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola (n=6, crvena); befinijum kontrola nakon ispiranja (n=6, isprekidana crna).

U tabeli 19 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize vrednosti dobijenih kontrakcijama.

**Tabela 19.** Rezultati ispitivanja dozno-zavisnih kontrakcija izazvanih befinijumom na neuromišićnom preparatu *A. suum*-a nakon aplikacije 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>Befinijum - kontrola</b>						
0.62	0.07-5.67	-0.21	2.20	1.58-2.82	0.43	6
<b>Befinijum + GABA 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
0.96	0.19-4.95	-0.02	2.18	1.48-2.90	0.56	6
<b>Befinijum + 3 <math>\mu\text{M}</math> GABA+karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
1.40	0.14-13.55	0.15	0.89	0.43-1.36	0.40	6
<b>Befinijum - kontrola posle ispiranja</b>						
1.32	0.19-9.28	0.12	1.15	0.67-1.63	0.48	6

Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  za kontraktalni efekat befinijuma iznosila je 0.62  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}$  2.20 g. Inkubacija preparatata sa 3  $\mu\text{M}$  GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  na 0.96  $\mu\text{M}$ , dok je maksimalni efekat ostao nepromenjen 2.18 g.

Kombinacija GABA 3  $\mu\text{M}$  i karvakrola 100  $\mu\text{M}$  posle 5 minuta inkubacije, još intenzivnije je inhibirala kontrakcije izazvane befinijumom. Naime, vrednost  $\text{EC}_{50}$  bila je 1.40  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}=0.89$  g. Nakon ispiranja vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je 1.32  $\mu\text{M}$ , a maksimalni efekat se blago povećao na 1.15 g.

U tabeli 20. prikazani su rezultati poređenja srednjih vrednosti kontrakcija u testu analize varijanse.

**Tabela 20.** Rezultati ANOVA sa prikazanim srednjim vrednostima kontrakcija nervno-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama befinijuma bez i u prisustvu 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola: befinijum-kontrola; befinijum + GABA 3  $\mu\text{M}$ ; befinijum + GABA 3  $\mu\text{M}$  + karvakrol 100  $\mu\text{M}$ ; befinijum-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x}\pm\text{SE}$ ,  $n=6$ ).

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	0.1 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
<b>Befinijum-kontrola</b>	0.68 $\pm$ 0.21	1.07 $\pm$ 0.27	1.52 $\pm$ 0.29	1.87 $\pm$ 0.28	2.13 $\pm$ 0.29
<b>Befinijum+GABA 3<math>\mu\text{M}</math></b>	0.15 $\pm$ 0.03* <i>p=0.014</i>	0.60 $\pm$ 0.32	1.08 $\pm$ 0.26	1.64 $\pm$ 0.29	2.01 $\pm$ 0.29
<b>Befinijum+GABA 3 <math>\mu\text{M}</math>+karvakrol 100<math>\mu\text{M}</math></b>	0.09 $\pm$ 0.02** <i>p=0.005</i>	0.15 $\pm$ 0.03* <i>p=0.03</i>	0.36 $\pm$ 0.11** <i>p=0.006</i>	0.65 $\pm$ 0.21** <i>p=0.009</i>	0.77 $\pm$ 0.22** <i>p=0.008</i>
<b>Befinijum-kontrola posle ispiranja</b>	0.13 $\pm$ 0.03	0.237 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.15	0.79 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.24

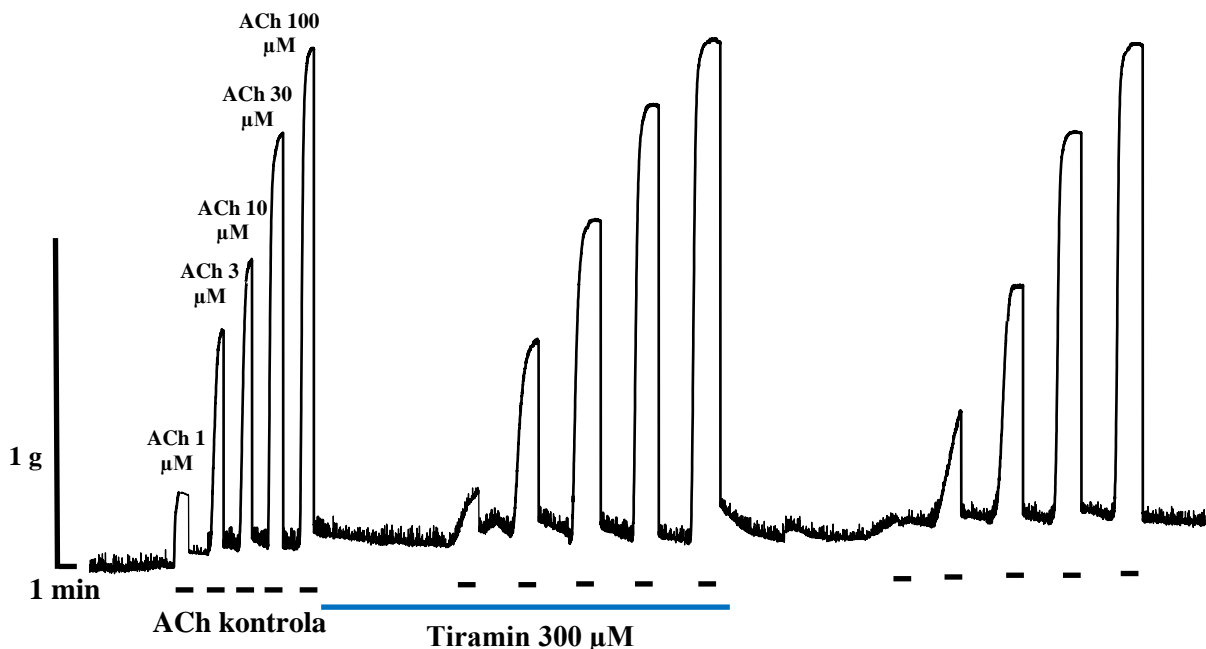
\* Statistička značajnost u odnosu na Befinijum-kontrola

U poređenju sa srednjim vrednostima kontrolnih kontrakcija može se videti da je GABA u koncentraciji od 3  $\mu\text{M}$  signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 0.1  $\mu\text{M}$  befinijuma, dok je 3  $\mu\text{M}$  GABA u kombinaciji sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim aplikovanim rastućim koncentracijama befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10  $\mu\text{M}$ ).

## 5.2. Ispitivanje dejstva tiramina na izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom

Tiramin je prirodni monoamin, koji se još naziva “amin u tragovima“. U organizmu sisara deluje slično kao i kateholamini, ali njegova uloga kod nematoda nije još uvek potpuno razjašnjena. Kako postoje podaci da karvakrol kod *C. elegans* deluje

preko tiraminskih receptora, mi smo ispitali dejstvo tiramina na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*. Na slici 38 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija.

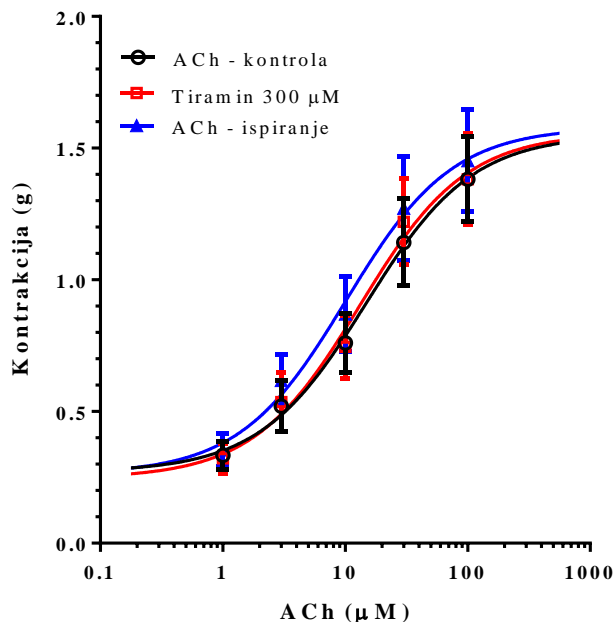


**Slika 38.** Kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane rastućim koncentracijama acetilholina i uticaj tiramina (300  $\mu\text{M}$ ) na te kontrakcije.

Kontrakcije neuromišićnog preparata su analizirane nelinearnom regresijom, a rezultati analize i dobijene sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta acetilhola bez i u prisustvu tiramina prikazane su u tabeli 21 i na slici 39.

**Tabela 21.** Rezultati ispitivanja dozno-zavisnih kontrakcija izazvanih acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A. suum* i uticaj tiramina 300  $\mu\text{M}$  na te kontrakcije.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
14.81	3.835 - 57.22	1.17	1.55	1.14-2.00	0.70	6
<b>ACh + tiramin 300 <math>\mu\text{M}</math></b>						
13.14	3.263 - 52.92	1.12	1.55	1.14-2.00	0.70	6
<b>ACh - posle ispiranja</b>						
10.14	2.163 - 47.51	1.00	1.58	1,17-2.00	0.65	6



**Slika 39.** Grafički prikaz dozno-zavisnih sigmoidnih kriva kontraktalnog efekta ACh bez i u prisustvu 300 μM tiramina. Prikazani su: ACh kontrola (n=6, crna); u prisustvu 300 μM tiramina (n=6, crvena); ACh kontrola nakon ispiranja (n=6, plava).

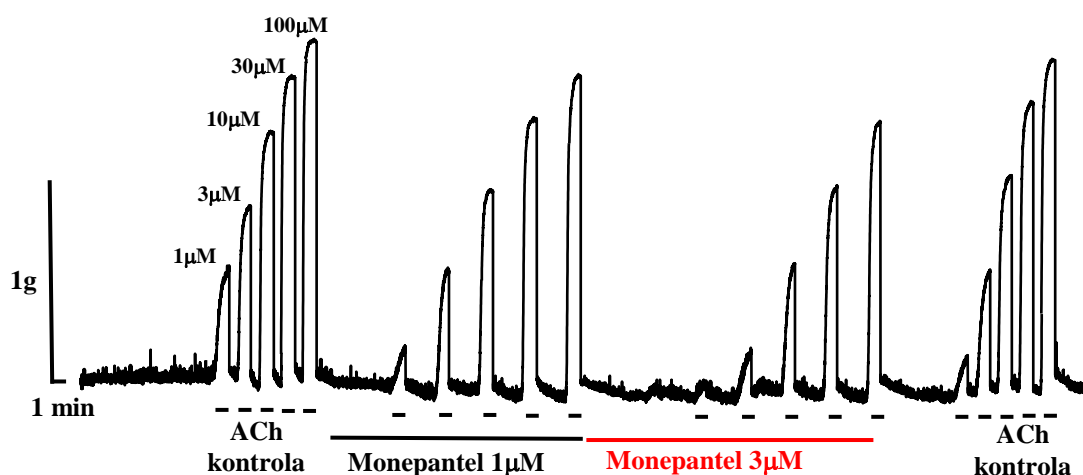
Acetilholin je izazvao dozno-zavisne kontrakcije kao i u prethodnim ispitivanjima. Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) ACh u kontrolnoj seriji iznosila je 14.81 μM, a maksimalni kontraktalni efekat ( $E_{max}$ ) 1.55 g. Inkubacija sa tiraminom 300 μM nije izazvala bilo kakvu promenu kontrakcija niti je uticala na dejstvo acetilholina.  $EC_{50}$  acetilholna u prisustvu tiramina iznosila je 13.14 μM, a maksimalni efekat 1.56 g. Sigmoidne krive efekta ACh bez i u prisustvu tiramina su se skoro potpuno poklopile (Slika 39). Posle ispiranja preparata i uklanjanja tiramina nije bilo nikakvih posledica na kontrakcije. Tako je srednja efektivna koncentracija ACh posle ispiranja iznosila 10.14 μM, dok je maksimalni efekat bio 1.58 g. Zbog činjenice da inkubacija neuromišićnog preparata *A. suum* sa tiraminom nije uticala na vrednosti  $E_{max}$  i  $EC_{50}$ , rezultate maksimalne amplitude kontrakcija nismo upoređivali ANOVA testom.



### 5.3. Ispitivanje mehanizma dejstva monepantela (derivat aminoacidonitrila) i njegova interakcija sa karvakrolom na neuromišićnom preparatu *A. suum*

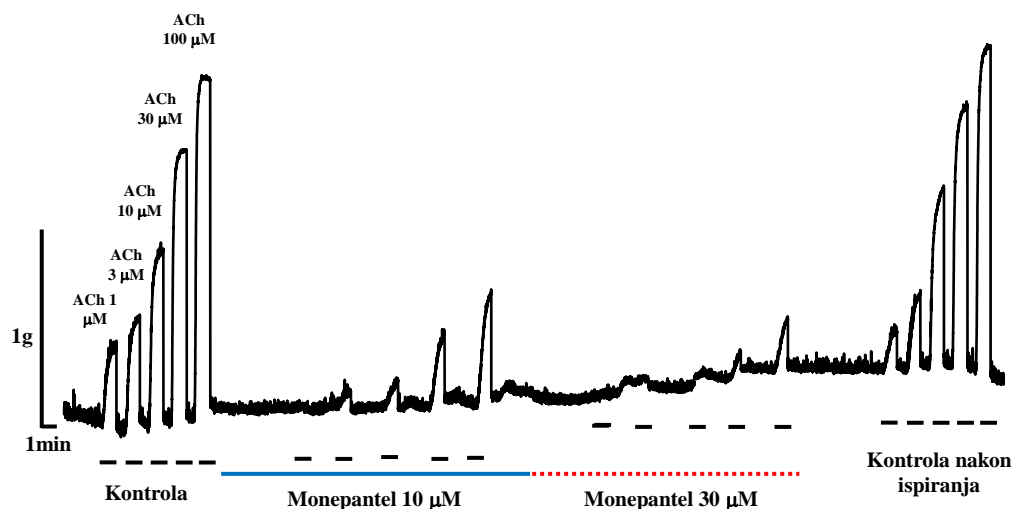
#### Uticaj monepantela na izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom

Aminoacetonitrilni derivati (AAD) predstavljaju jednu od najnovijih klasa antihelmintika za koje se smatra, na osnovu istraživanja proizvođača, da deluju kao alosterični modulatori nikorinskog receptora nematoda. Monepantel je AAD koji je registrovan za upotrebu u veterinarskoj medicini i u narednom delu istraživanja ispitan je njegov uticaj na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane ACh.

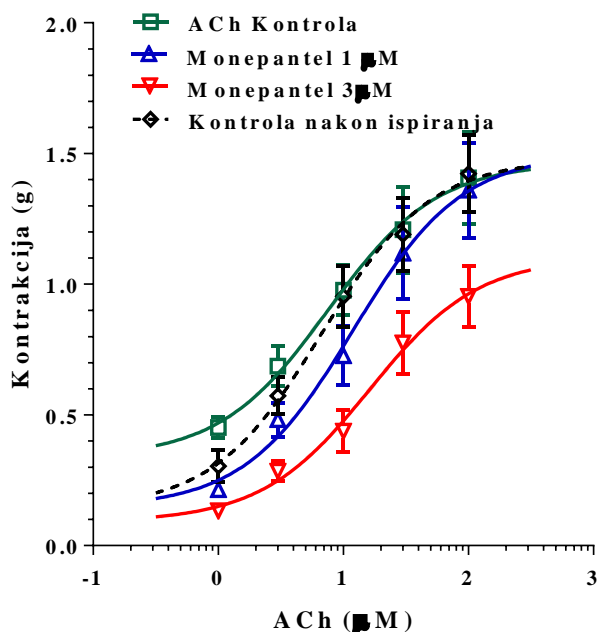


**Slika 40.** Zapis izometrijskih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum*, izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija sa 1 i 3 μM monepantela. Isprekidana kratka crna linija obeležava kontrolne kontrakcije izazvane sa ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μM), puna crna linija označava prisustvo 1 μM monepantela, dok crvena linija označava prisustvo 3 μM monepantela u eksperimentalnom kupatilu sa preparatom.

Slike 40 i 41 prikazuju izabrane zapise kontraktalnog dejstva rastućih koncentracija ACh bez i u prisustvu monepantela 1 i 3 μM i 10 i 30 μM. ACh je izazvao dozno-zavisne kontrakcije koje je monepantel, takođe dozno-zavisno inhibisao. Monepantel, sam po sebi nije značajnije promeni bazalni tonus, dok je sa druge strane ispiranje preparata imalo za posledicu povećanje kontrakcija, odnosno njihovo vraćanje na kontrolni nivo. Najviša testirana koncentracija monepantela 30 μM, je skoro potpuno blokirala kontraktalni efekat ACh (Slika 42).



**Slika 41.** Zapis izometrijskih kontrakcija nervno-mišićnog preparata *A. suum*, izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija sa 10 i 30  $\mu\text{M}$  monepantela. Isprekidana kratka crna linija obeležava kontrolne kontrakcije izazvane sa ACh (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), plava linija označava prisustvo 10  $\mu\text{M}$  monepantela, dok crvena linija u tačkama označava prisustvo 30  $\mu\text{M}$  monepantela u eksperimentalnom kupatilu sa preparatom.



**Slika 42.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu monepantela: kontrola ACh (n=8, zelena); aplikacija 1  $\mu\text{M}$  monepantela (n=8, plava); aplikacija 3  $\mu\text{M}$  monepantela (n=8, crvena); kontrola ACh nakon ispiranja (n=8, crna isprekidana). Svaka tačka predstavlja  $x \pm \text{SE}$ .

U tabeli 22 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize dobijenih vrednosti kontrakcija.

**Tabela 22.** Rezultati ispitivanja kontrakcija rastućim koncentracijama acetilholina na neuromišićnom preparatu *A. suum* nakon aplikacije 1  $\mu\text{M}$  i 3  $\mu\text{M}$  monepantela.

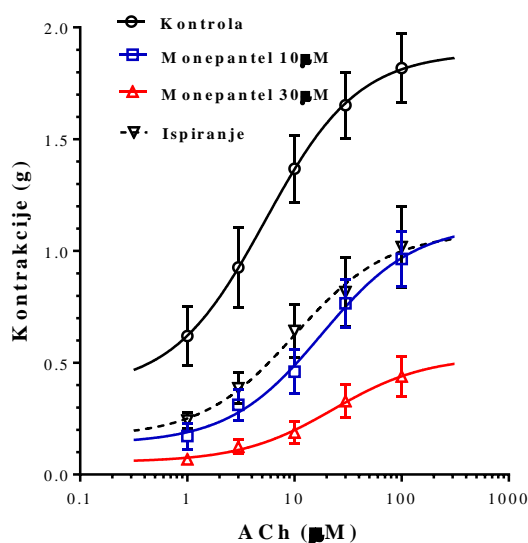
Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
7.55	1.68-33.89	0.88	1.46	1.16-1.76	0.61	8
<b>ACh + monepantel 1 <math>\mu\text{M}</math></b>						
11.95	3.28-43.53	1.08	1.50	1.12-1.88	0.67	8
<b>ACh + monepantel 3 <math>\mu\text{M}</math></b>						
16.29	5.02-52.80	1.21	1.10	0.81-1.40	0.72	8
<b>ACh - kontrola posle ispiranja</b>						
6.69	2.03-22.03	0.82	1.48	1.21-1.74	0.72	8

Kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ACh bila je 7.55  $\mu\text{M}$  i u prisustvu 1  $\mu\text{M}$  monepantela povećala se na 11.95  $\mu\text{M}$ , dok je 3  $\mu\text{M}$  monepantela povećalo vrednost  $\text{EC}_{50}$  na 16.29  $\mu\text{M}$ . Posle ispiranja preparata  $\text{EC}_{50}$  je znatno smanjena na 6.69  $\mu\text{M}$ , što je bilo čak i niže od kontrolnog nalaza. Prva testirana koncentracija monepantela nije značajnije promenila vrednost maksimalnog kontraktilnog efekta acetilholina ( $E_{\text{max}}$ ), on je sa kontrolnih 1.46 g povećan na 1.50 g. dok je 3  $\mu\text{M}$  monepantela snizilo maksimalni efekat na 1.10 g. Posle ispiranja maksimalni efekat je potpuno dostigao početnu kontrolnu vrednost (1.48 g). U tabeli 23 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize uticaja 10  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  monepantela na kontrakcije izazvane rastućim koncentracijama ACh.

**Tabela 23.** Rezultati statističke analize (nelinearna regresija) vrednosti dozno-zavisnih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ) na neuromišićnom preparatu *A. suum* nakon inkubacije sa 10  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  monepantela.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
5.34	1.20-23.80	0.73	1.89	1.55-2.22	0.68	5
<b>ACh + monepantel 10 <math>\mu\text{M}</math></b>						
18.01	4.58-70.79	1.25	1.12	0.77-1.47	0.70	5
<b>ACh + monepantel 30 <math>\mu\text{M}</math></b>						
23.05	3.51-151.4	1.36	0.53	0.27-0.78	0.57	5
<b>ACh - kontrola posle ispiranja</b>						
10.10	1.58-64.46	1.00	1.08	0.74-1.43	0.56	5

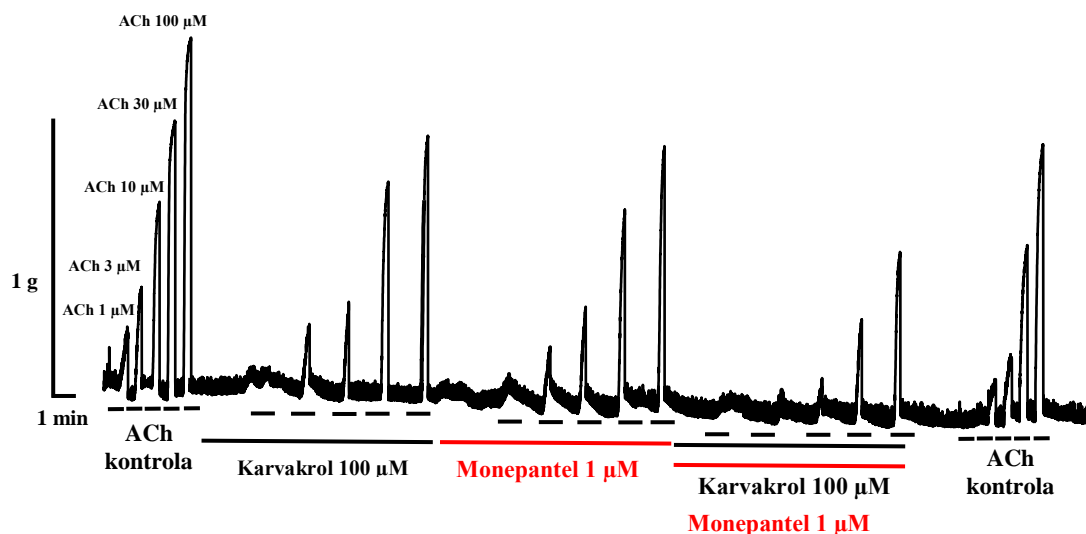
Kontrolna  $EC_{50}$  acetilholina iznosila je  $5.34 \mu\text{M}$  a maksimalni efekt  $1.89 \text{ g}$ . Inkubacija sa  $10 \mu\text{M}$  monepantela povećala je vrednost  $EC_{50}$  na  $18.01 \mu\text{M}$  i smanjila  $E_{\text{max}}$  na  $1.2 \text{ g}$ . Tri puta viša koncentracija monepantela ( $30 \mu\text{M}$ ) još samo malo je povećala  $EC_{50}$  acetilholina (na  $23.05 \mu\text{M}$ ), ali je smanjila vrednost  $E_{\text{max}}$  na čak  $0.53 \text{ g}$ . Ispiranjem preparata vrednosti  $EC_{50}$  i  $E_{\text{max}}$  nisu dostigle kontrolne vrednosti. Na slici 43 su prikazane sigmoidne krive odnosa doze i efekta acetilholina u prisustvu  $10$  i  $30 \mu\text{M}$  monepantela.



**Slika 43.** Sigmoidne krive dozno-zavisnog kontraktalnog efekta ACh na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Svaka tačka predstavlja  $x \pm \text{SE}$  ( $n=6$ ). ACh kontrola ( $n=6$ , kriva crne boje); u prisustvu  $10 \mu\text{M}$  monepantela ( $n=6$ , kriva plave boje); u prisustvu  $30 \mu\text{M}$  monepantela ( $n=6$ , kriva crvene boje); ACh kontrola nakon ispiranja ( $n=6$ , isprekidana kriva crne boje).

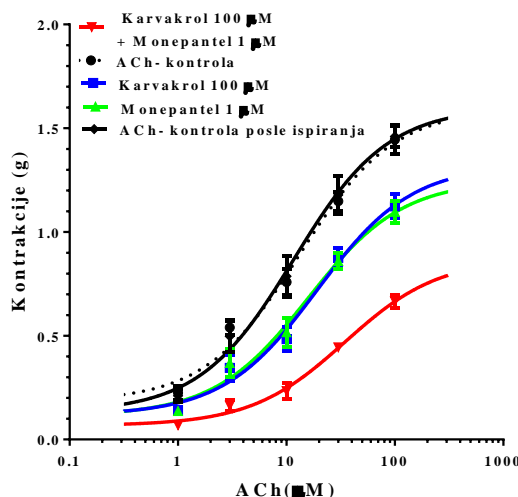
### Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu monepantela i karvakrola

Posebno značajno je bilo da se ispita i uporedi efekat karvakrola i monepantela na kontrakcije izazvane acetilholinom, kao i potencijalna interakcija ove dve supstance. Korišćen je protokol koji je počinjao kontrolnom serijom kontrakcija izazvanih acetilholinom, zatim je efekat istih koncentracija praćen u prisustvu karvakrola  $100 \mu\text{M}$ , zatim monepantela  $1 \mu\text{M}$  i na kraju je testirano dejstvo kombinacije ove dve supstance na kontrakcije. Reprezentativni zapis kontrakcija prikazan je na slici 44.



**Slika 44.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina na neuromišićnom preparatu *A. suum* i inhibicija kontrakcija sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola i 1  $\mu\text{M}$  monepantela. Na zapisu su prikazani: kratke crne linije predstavljaju aplikaciju acetilholina; puna crna linija je aplikacija 100  $\mu\text{M}$  karvakrola; crvena linija je aplikacija 1  $\mu\text{M}$  monepantela.

Dobijeni rezultati kontakcija analizirani su nelinearnom regresijom (Slika 45 i Tabela 24) i ANOVA testom (Tabela 25). Kontrolna srednja efektivna koncentracija acetilholina u ovom ispitivanju bila je 13.13  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}=1.59$  g. Karvakrol 100  $\mu\text{M}$  je samo donekle povećao  $EC_{50}$  acetilholina na 19.20  $\mu\text{M}$  i neznatno smanjio maksimalni kontraktilni efekat na 1.32 g. Sličnu inhibiciju kontrakcija je izazvao i monepantel 1  $\mu\text{M}$ . U prisustvu ovog aminoacidonitrila  $EC_{50}$  acetilholina bila je 15.86  $\mu\text{M}$ , a maksimalni efekat 1.25 g. Međutim, kombinacija ove dve supstance je ispoljila jače dejstvo od pojedinačnih efekata.  $EC_{50}$  acetilholina bila je 34.17  $\mu\text{M}$ , a maksimalni efekat samo 0.87 g (Tabela 24). Na kraju serije nakon ispiranja preparata vrednost  $EC_{50}$  ACh bila je manja nego kontrola i iznosila je 11.61  $\mu\text{M}$  sa maksimalnim efektom koji je bio 1.60 g. U regresionoj analizi koja je prikazana u tabeli 23 testirano je šest preparata.



**Slika 45.** Grafički prikaz dozno-zavisnih sigmoidnih kriva kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu monepantela i karvakrola: kontrola ACh (n=6, crna puna linija); aplikacija 100  $\mu$ M karvakrola (n=6, plava); aplikacija 1  $\mu$ M monepantela (n=6, zelena); zajednička aplikacija 100  $\mu$ M karvakrola i 1  $\mu$ M monepantela (n=6, crvena); kontrola ACh nakon ispiranja (n=6, crna isprekidana). Svaka tačka predstavlja  $x \pm SE$ .

U tabeli 24 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize izmerenih kontrakcija i primenjenih koncentracija acetilholina.

**Tabela 24.** Rezultati ispitivanja kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina na neuromišićnom preparatu *A. suum* nakon inkubacije sa karvakrololom i monepantelom.

Srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) ( $\mu$ M)	95% granice sigurnosti $EC_{50}$ ( $\mu$ M)	Log $EC_{50}$	Maksimalni efekt ( $E_{max}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{max}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
13.13	7.59-22.73	1.12	1.59	1.42-1.77	0.92	6
<b>ACh + karvakrol 100 <math>\mu</math>M</b>						
19.20	10.05-36.67	1.28	1.32	1.12-1.53	0.89	6
<b>ACh + monepantel 1 <math>\mu</math>M</b>						
15.86	7.93-31.69	1.20	1.25	1.06-1.44	0.88	6
<b>ACh + karvakrol 100 <math>\mu</math>M + monepantel 1 <math>\mu</math>M</b>						
34.57	18.61-64.22	1.54	0.87	0.70-1.04	0.92	6
<b>ACh - kontrola posle ispiranja</b>						
11.61	5.77-23.37	1.06	1.60	1.38-1.82	0.88	6

Kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $EC_{50}$ ) ACh bila je 13.13  $\mu$ M i u prisustvu 100  $\mu$ M karvakrola povećala se na 19.20  $\mu$ M, dok je  $EC_{50}$  acetilholina u prisustvu 1  $\mu$ M monepantela iznosila 15.86  $\mu$ M. Istovremenom inkubacijom preparata

sa karvakrolom i monepantelom,  $EC_{50}$  acetilholina se udvostručila na 34.57  $\mu\text{M}$ , da bi nakon ispiranja preparata opala ispod kontrolne vrednosti i dostigla 11.61  $\mu\text{M}$ . Testirana koncentracija karvakrola nije značajnije promenila maksimalni kontraktilni efekt acetilholina ( $E_{\text{max}}$ ) koji je sa kontrolnih 1.59 g opao na 1.32 g a slično je izmereno i posle inkubacije preparata sa 1  $\mu\text{M}$  monepantela ( $E_{\text{max}}=1.25$  g). Međutim, maksimalni kontraktilni efekt acetilholina se posle zajedničke inkubacije dve pomenute supstance smanjio na 0.87 g. Posle ispiranja  $E_{\text{max}}$  je dostigao početnu kontrolnu vrednost, i iznosio je 1.60 g.

U tabeli 25 prikazani su rezultati analize varijanse efekta karvakrola i monepantela na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom.

**Tabela 25.** Rezultati analize ANOVA testom kontrakcija neuromišićnih preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh ( $x \pm SE$ ,  $n=6$ ) (g) i inhibitorni efekt 100  $\mu\text{M}$  karvakrola, 1  $\mu\text{M}$  monepantela i kombinacije ove dve supstance.

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>ACh-kontrola</b>	0.22 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.06	1.15 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.07
<b>ACh+ karvakrol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.14 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.06
<b>ACh+ monepantel 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.14 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.05
<b>ACh+ Karvakrol 100<math>\mu\text{M}</math>+ monepantel 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>***++</sup> <i>p</i> =0.0001 <i>p</i> =0.002	0.16 $\pm$ 0.03 <sup>***++</sup> <i>p</i> <0.0001 <i>p</i> =0.002	0.23 $\pm$ 0.04 <sup>***++</sup> <i>p</i> <0.0001 <i>p</i> =0.0001	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>***++</sup> <i>p</i> <0.0001 <i>p</i> <0.0001	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>***++</sup> <i>p</i> <0.0001 <i>p</i> <0.0001
<b>ACh- kontrola posle ispiranja</b>	0.21 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.09	1.46 $\pm$ 0.05

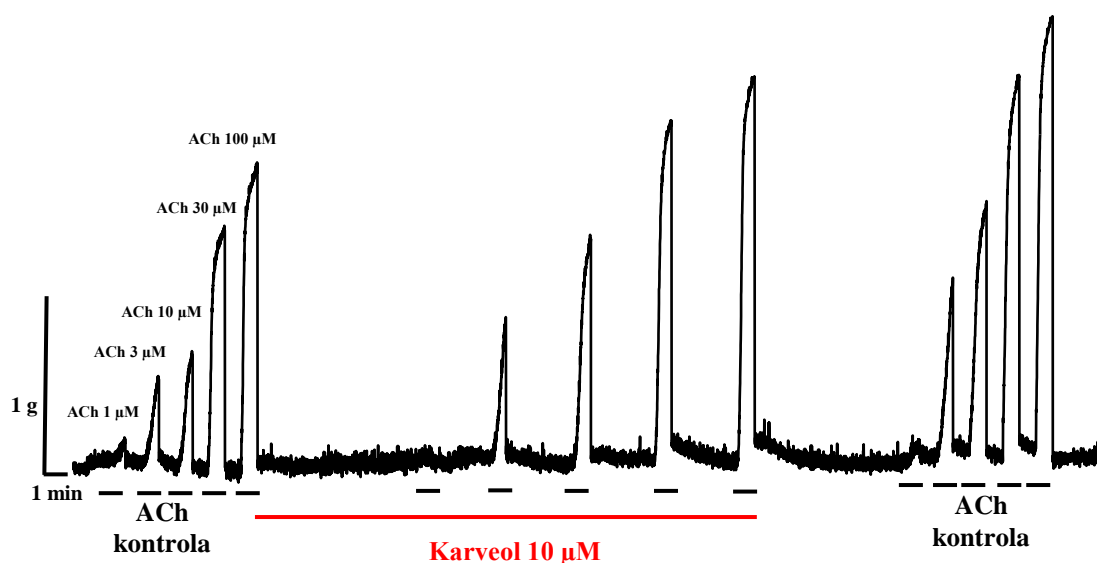
\* Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola

+ Statistička značajnost u odnosu na ACh-kontrola posle ispiranja

Rezultati analize varijanse pokazuju da je karvakrol u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  smanjio kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum*, bez statističke značajnosti. Takođe, i 1  $\mu\text{M}$  monepantela je nesignifikantno smanjio kontrakcije izazvane acetilholinom. Međutim, kada su ove dve supstance u istim koncentracijama primenjene zajedno, smanjenje kontrakcija je dostiglo stepen visoke statističke značajnosti u odnosu na kontrolu pre i u odnosu na kontrolu nakon ispiranja u svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh (Tabela 25).

#### 5.4. Ispitivanje dejstva karveola na neuromišićnom preparatu *A. suum*

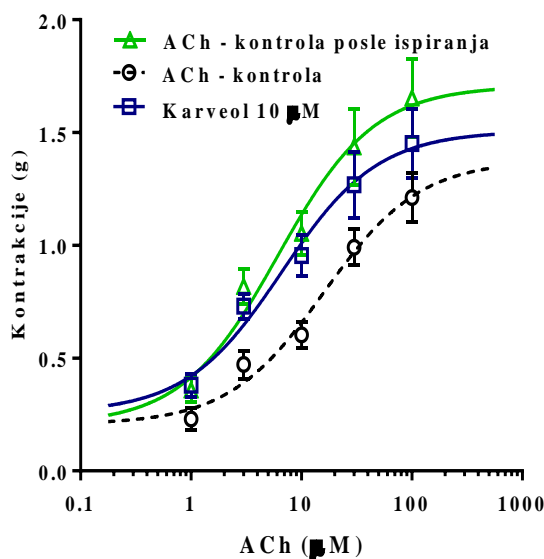
Karveol je prirodni monociklični monoterpenoid sa potencijalnim antinematodnim svojstvima. Ispitali smo uticaj karveola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom. Za razliku od karvakrola, koji je u različitom stepenu inhibirao kontrakcije *A. suum* izazvane različitim lekovima agonistima nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda, karveol je stimulisao ove kontrakcije. Na slici 46 je prikazan originalni zapis kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh i efekt karveola na te kontrakcije.



**Slika 46.** Originalni zapis izometrijskih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i dejstvo 10  $\mu\text{M}$  karveola na kontrakcije. Kratka crna linija označava aplikaciju ACh, a crvena linija označava vreme inkubacije sa 10  $\mu\text{M}$  karveola.

Na slici se jasno vidi da je karveol potencirao kontrakcije izazvane acetilholinom i da taj efekt pojačanja kontrakcija oszaje i posle ispiranja preparata. Na slici 47 i u tabeli 26 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize dobijenih rezultata kontrakcija. Slika 47 prikazuje sigmoidne krive odnosa doze i kontraktalnog efekta acetilholina i dejstva karveola na te kontrakcije.





**Slika 47.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 10  $\mu\text{M}$  karveola. ACh kontrola (n=6, isprekidana crna); ACh+karveol 10  $\mu\text{M}$  (n=6, plava); ACh kontrola nakon ispiranja (n=6, zelena).

U tabeli 26 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize uticaja karveola na kontrakcije izazvane ACh.

**Tabela 26.** Rezultati nelinearne regresione analize kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih acetilholinom bez i u prisustvu 10  $\mu\text{M}$  karveola.

Srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
15.97	6.35-40.11	1.20	1.38	1.11-1.64	0.80	6
<b>ACh + karveol 10 <math>\mu\text{M}</math></b>						
6.63	1.92-22.92	0.82	1.51	1.25-1.76	0.70	6
<b>ACh - kontrola posle ispiranja</b>						
6.14	1.82-20.70	0.79	1.71	1.41-2.00	0.71	6

Karveol, u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  stimuliše kontrakcije izazvane acetilholinom. Kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ACh iznosila je 15.97  $\mu\text{M}$  sa maksimalnim efektom ( $E_{\text{max}}$ ) od 1.38g. Posle inkubacije od 5 minuta sa 10 $\mu\text{M}$  karveola,  $\text{EC}_{50}$  iznosila je 6.62 $\mu\text{M}$  dok je  $E_{\text{max}}$  povećana na 1.51 g. Zabeleženi porast kontrakcija se nastavio i posle ispiranja karveola,  $\text{EC}_{50}$  je iznosila 6.14  $\mu\text{M}$  dok je  $E_{\text{max}}$  nastavio da raste do vrednosti od 1.71 g.

U tabeli 27 prikazani su rezultati analize varijanse kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu karveola.

**Tabela 27.** Rezultati ANOVA testa kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu 10  $\mu\text{M}$  karveola ( $x \pm \text{SE}$ ,  $n=6$ ).

Koncentracija	Kontrakcije preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
ACh-kontrola	0.23 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.08	1.21 $\pm$ 0.11
ACh + karveol 10 $\mu\text{M}$	0.38 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.05*	0.95 $\pm$ 0.09***++	1.27 $\pm$ 0.15***++	1.45 $\pm$ 0.16***++
ACh-kontrola posle ispiranja	0.36 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.17	1.65 $\pm$ 0.17

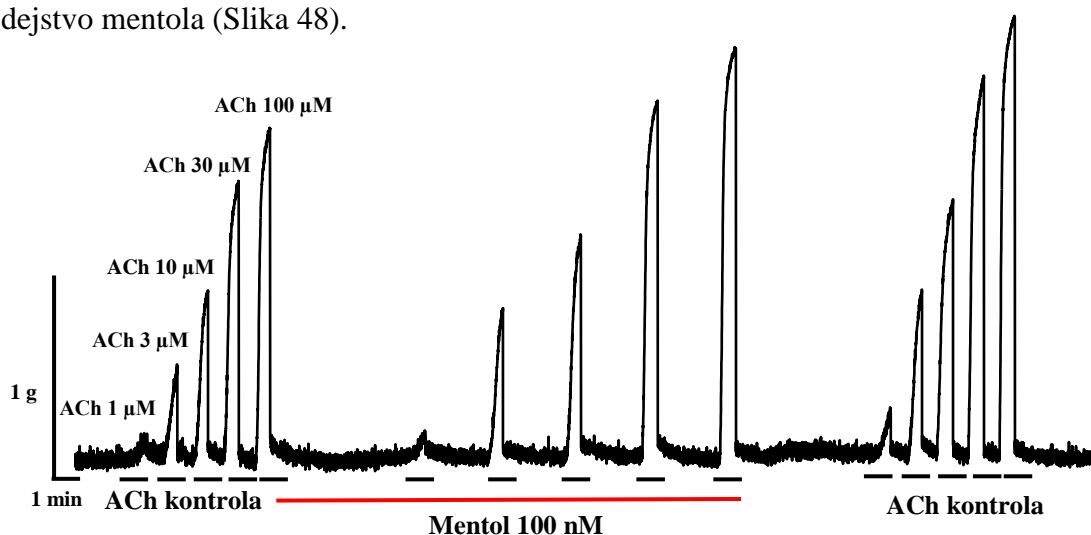
\* Statistički značajna razlika u odnosu na ACh-kontrola

+ Statistički značajna razlika u odnosu na ACh-kontrola posle ispiranja

Rezultati analize varijanse pokazuju da je karveol u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  signifikantno povećao kontrakcije nakon aplikacije 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$  ACh u odnosu na kontrolne vrednosti. Takođe, i posle ispiranja karveola kontrakcije su bile signifikantno više u odnosu na kontrolu (Tabela 27).

### 5.5. Ispitivanje mehanizma dejstva mentola na neuromišićnom preparatu *A. suum*

U narednom delu našh ispitivanja testirali smo potencijano antinematodno dejstvo mentola (Slika 48).



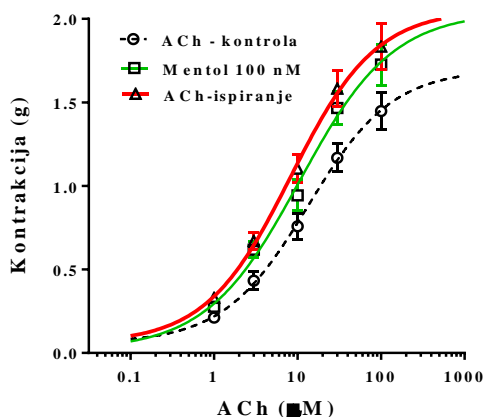
**Slika 48.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija rastućim koncentracijama acetilholina, i pojačavanje kontrakcija sa 100 nM mentola. Na zapisu je označeno: kratka crna linija predstavlja aplikaciju acetilholina; puna crvena linija predstavlja aplikaciju 100 nM mentola.

Na osnovu podataka iz literature ispitivali smo efekat ovog monoterpenoida (5-metil-2-propan-2-ilcikloheksan-1-ol) na kontrakcije *A. suum* izazvane acetilholinom. Na slici 31 prikazan je originalni zapis kontrakcije u prisustvu 100 nM mentola. Dobijene rezultate kontrakcija obradili smo statistički i u tabeli 28 prikazali rezultate nelinearne regresione analize.

**Tabela 28.** Rezultati ispitivanja dozno-zavisnih kontrakcija acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A. suum*-a nakon aplikacije 100 nM mentola.

Srednja efektivna koncentracija (EC <sub>50</sub> ) (μM)	95% granice sigurnosti EC <sub>50</sub> (μM)	Log EC <sub>50</sub>	Maksimalni efekat(E <sub>max</sub> ) (g)	95% granice sigurnosti (E <sub>max</sub> ) (g)	Koeficijent regresije (R <sup>2</sup> )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
12.93	6.46-25.90	1.11	1.62	1.38-1.85	0.88	6
<b>ACh + mentol 100 nM</b>						
10.82	5.43-21.57	1.03	1.90	1.65-2.15	0.88	6
<b>ACh – kontrola nakon ispiranja</b>						
8.68	4.37-17.23	0.94	1.98	1.74-2.21	0.88	6

Iz rezultata se vidi da je kontrolna srednja efektivna koncentracija (EC<sub>50</sub>) ACh bila 12.93 μM, u prisustvu 100 nM mentola smanjila se na 10.82 μM, da bi nakon ispiranja preparata EC<sub>50</sub> nastavila da opada i spustila se na 8.68 μM, što je bila niža vrednost od kontrolnog nalaza. Testirana koncentracija mentola pojačala je kontrakcije izazvane sa ACh, pa je vrednosti maksimalnog efekta (E<sub>max</sub>) od kontrolnih 1.62 g porasla na 1.90 g. Posle ispiranja maksimalni efekat je nastavio da raste i dostigao je 1.98 g.



**Slika 49.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100 nM mentola. Na grafiku su obeleženi: ACh kontrola (n=6, isprekidana crna); aplikacija 100 nM mentola (n=6, zelena); ACh kontrola nakon ispiranja (n=6, crvena).

U tabeli 29 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija *A. suum* bez i u prisustvu 100 nM mentola.

**Tabela 29.** Rezultati ANOVA testa srednjih vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu 100 nM mentola: ACh-kontrola; ACh + mentol 100 nM; ACh-kontrola nakon ispiranja ( $x \pm SE$ ,  $n=6$ ).

Koncentracija	Kontrakcija preparata <i>A. suum</i> (g)				
	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
ACh-kontrola	0.21 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.08	1.45 $\pm$ 0.11
ACh+Mentol 100 nM	0.28 $\pm$ 0.03** <i>p</i> =0.001	0.62 $\pm$ 0.05*** <i>p</i> =0.0007	0.94 $\pm$ 0.09****+ <i>p</i> =0.0003, <i>p</i> =0.001	1.47 $\pm$ 0.10****+ <i>p</i> <0.0001, <i>p</i> <0.0001	1.73 $\pm$ 0.12****+ <i>p</i> <0.0001, <i>p</i> <0.0001
ACh-ispiranje	0.33 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.11	1.83 $\pm$ 0.14

\* Statistička značajnost u odnosu na ACh kontrola

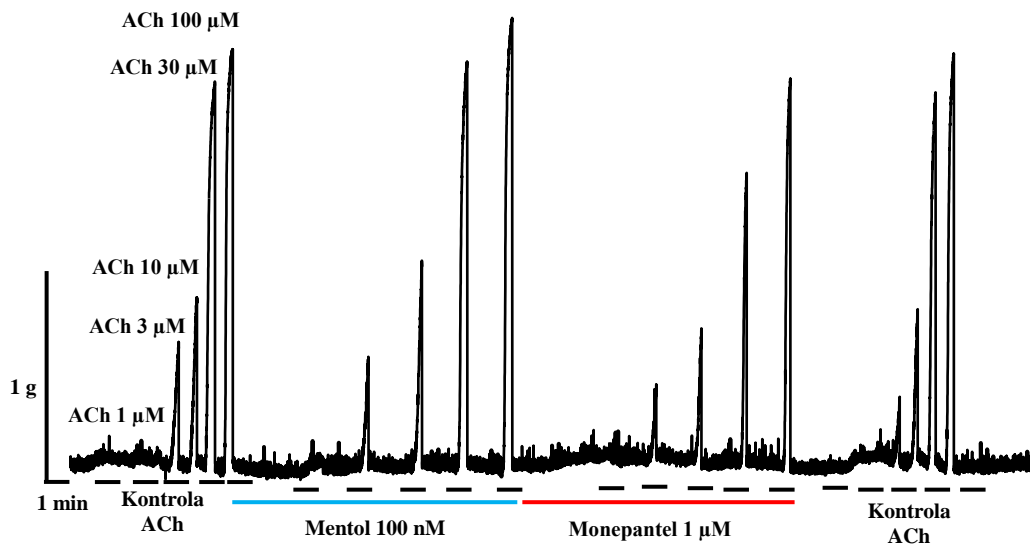
+ Statistička značajnost u odnosu na ACh kontrola posle ispiranja

Kao što se može primetiti rezultati analize varijanse pokazuju da je mentol u koncentraciji od 100 nM visoko signifikantno povećao kontrakcije izazvane svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh u odnosu na kontrolu. Signifikantno povećanje intenziteta kontrakcija je nastavljeno i posle ispiranja preparata, što je posebno interesantan nalaz (Tabela 29).

### 5.5.1. Ispitivanje mehanizma delovanja i interakcije između mentola i monepantela na neuromišićnom preparatu *A. suum*

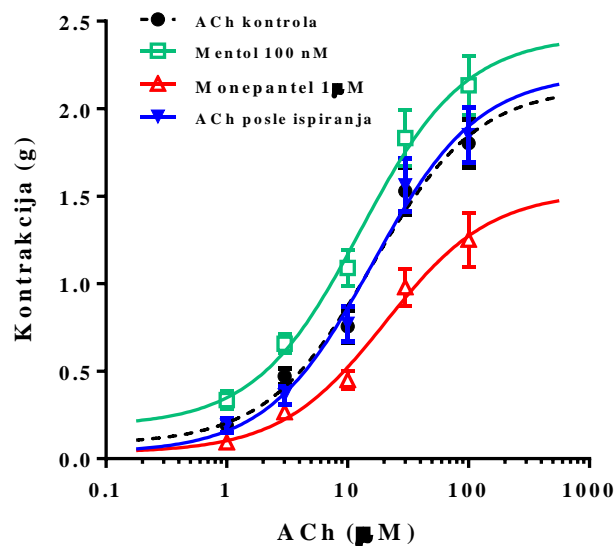
Posebno interesantno bilo je da se ispita potencijalna interakcija mentola i monepantela i njihov uticaj na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom. Da bi se ispitali ovi efekti primenjen je protokol aplikacije supstanci koji je podrazumevao početnu seriju kontrolnih kontrakcija izazvanih acetilholinom, zatim kontrakcije posle inkubacije sa mentolom, pa kontrakcije posle inkubacije sa monepantelom i na kraju protokola kontrakcije posle ispiranja preparata (Slika 50). Praćen je efekat testiranih supstanci na maksimalne kontrakcije izazvane acetilholinom kao i na bazalni tonus neuromišićnog preparata.

Na slici 50 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih acetilholinom i uticaj mentola i monepantela na te kontrakcije. Sa slike se vidi da je mentol pojačao kontrakcije dok je monepantel ispoljio inhibitorno dejstvo.



**Slika 50.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina, pojačavanje kontrakcija sa 100 nM mentola i inhibicija kontrakcija sa 1  $\mu$ M monepantela. Na zapisu je označeno: kratka crna linija predstavlja aplikaciju acetilholina; plava linija je aplikacija 100 nM mentola; crvena linija predstavlja aplikaciju 1  $\mu$ M monepantela.

Na slici 51 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize dobijenih rezultata kontrakcija.



**Slika 51.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktinog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100 nM mentola i 1  $\mu$ M monepantela. Na grafiku su obeleženi: ACh kontrola (n=6, isprekidana crna); aplikacija 100 nM mentola (n=6, zelena); aplikacija 1  $\mu$ M monepantela (n=6, crvena); ACh kontrola nakon ispiranja (n=6, plava).

U tabeli 30 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize vrednosti kontrakcija dobijenih u ovom ispitivanju.

**Tabela 30.** Rezultati ispitivanja dozno-zavisnih kontrakcija izazvanih acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A. suum*-a nakon inkubacije sa 100 nM mentola i 1  $\mu$ M monepantela.

Srednja efektivna koncentracija (EC <sub>50</sub> ) ( $\mu$ M)	95% granice sigurnosti EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Log EC <sub>50</sub>	Maksimalni efekat (E <sub>max</sub> ) (g)	95% granice sigurnosti (E <sub>max</sub> ) (g)	Koeficijent regresije (R <sup>2</sup> )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
15.86	7.73-32.55	1.20	2.12	1.76-2.48	0.87	6
<b>ACh + mentol 100 nM</b>						
12.71	6.07-26.61	1.10	2.42	2.05-2.79	0.86	6
<b>ACh + monepantel 1 <math>\mu</math>M</b>						
20.57	8.53-49.60	1.31	1.53	1.17-1.89	0.82	6
<b>ACh – kontrola nakon ispiranja</b>						
16.09	7.63-33.96	1.21	2.20	1.80-2.60	0.86	6

Rezultati pokazuju da je kontrolna srednja efektivna koncentracija (EC<sub>50</sub>) ACh bila 15.86  $\mu$ M dok se u prisustvu 100 nM mentola smanjila se na 12.71  $\mu$ M, da bi se sa monepantelom povećala na 20.57  $\mu$ M. Nakon ispiranja preparata EC<sub>50</sub> se spustila na 16.09  $\mu$ M, što je dosta niža vrednost od kontrolnog nalaza. Testirana koncentracija mentola povećala je vrednost maksimalnog efekta (E<sub>max</sub>) acetilholina sa kontrolnih 2.12 g na 2.42 g. Nakon aplikacije 1  $\mu$ M monepantela E<sub>max</sub> acetilholina se smanjila na 1.53 g. Posle ispiranja maksimalni efekat je dostigao nešto višu vrednost nego početna kontrola i iznosio je 2.20 g.

U tabeli 31 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija u ovom ispitivanju.

**Tabela 31.** Rezultati ANOVA testa srednjih vrednosti kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu 100 nM mentola i 1  $\mu$ M monepantela. ACh-kontrola; ACh + mentol 100 nM; ACh + monepantel 1  $\mu$ M; ACh-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x} \pm SE$ , n=6).

<b>Kontrakcija preparata <i>A. suum</i> (g)</b>					
Koncentracija	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>ACh-kontrola</b>	0.19 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.09	1.53 $\pm$ 0.13	1.80 $\pm$ 0.14
<b>ACh+Mentol 100 nanoM</b>	0.33 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.05	1.09 $\pm$ 0.10 <sup>***</sup> <i>p</i> =0.0004	1.83 $\pm$ 0.16 <sup>***+++</sup> <i>p</i> =0.0001, <i>p</i> =0.0003	2.13 $\pm$ 0.17 <sup>*****++</sup> <i>p</i> <0.0001, <i>p</i> <0.0001
<b>ACh+Monepantel 1 <math>\mu</math>M</b>	0.09 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.05 <sup>***+++</sup> <i>p</i> =0.0007, <i>p</i> =0.0007	0.98 $\pm$ 0.10 <sup>***+++</sup> <i>p</i> =0.0001, <i>p</i> =0.0002	1.25 $\pm$ 0.15 <sup>*****++</sup> <i>p</i> <0.0001, <i>p</i> <0.0001
<b>ACh-ispiranje</b>	0.19 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.10	1.56 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.16

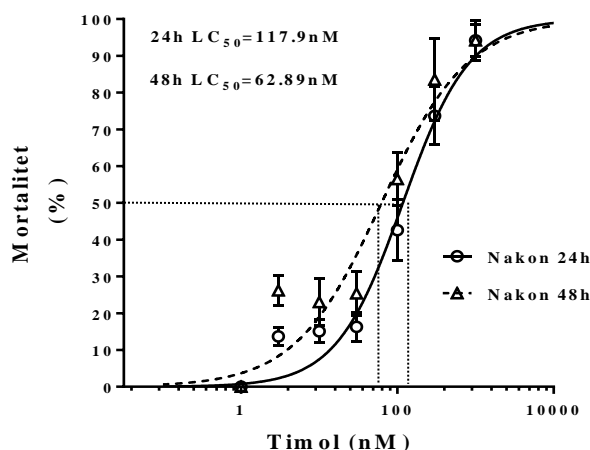
\* Statistička značajnost u odnosu na ACh kontrola

+ Statistička značajnost u odnosu na ACh posle ispiranja

Rezultati analize varijanse pokazuju da je mentol u koncentraciji od 100 nM povećao kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum*, sa visokom statističkom značajnošću nakon aplikacije 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$  ACh u odnosu na kontrolu i nakon aplikacije 30 i 100  $\mu\text{M}$  ACh u odnosu na ispiranje. Sa druge strane, 1  $\mu\text{M}$  monepantela je visoko signifikantno smanjio kontrakcije nakon aplikacije 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$  ACh u odnosu na kontrolu pre i u odnosu na kontrolu nakon ispiranja (Tabela 31).

### 5.6. Ispitivanje stepena preživljavanja adultnih oblika *C.elegans* u prisustvu timola i karvakrola

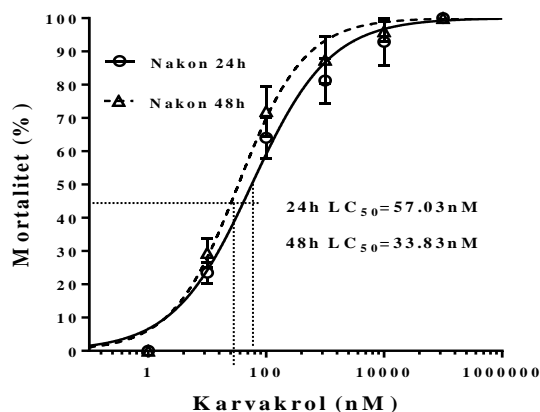
U ispitivanjima uticaja aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na stepen preživljavanja adultnih oblika *C. elegans*, letalni efekat timola pokazao je doznu i vremensku zavisnost. Vrednost srednje letalne koncentracije timola ( $\text{LC}_{50}$ ) iznosila je 117.9 nM nakon 24h (95% interval pouzdanosti 114.0-121.9 nM) i 62.89 nM (95% interval pouzdanosti 59.61 do 66.34 nM) posle 48 h inkubacije nematoda (Slika 52.). Pored toga praćen je i uticaj timola na faringealno pumpanje *C. elegans* a u toku 24 h i 48 h inkubacije. Fiziološki mehanizam faringealnog pumpanja se u potpunosti zaustavlja nakon 48 h inkubacije sa timolom u hranljivoj podlozi. Uginuća *C. elegans* u kontrolnim pločama nisu ustanovljena.



**Slika 52.** Sigmoidalne krive dozno-zavisnog nematocidnog efekta timola za *C. elegans* nakon 24 i 48 sati inkubacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost mortaliteta (%  $\pm$ SD) izračunatu za 5 Petri šolja.

U daljem toku ispitivanja testiran je uticaj karvakrola. Rezultati pokazuju da je vrednost  $\text{LC}_{50}$  karvakrola za adultne oblike *C. elegans*, nakon 24 sata inkubacije,

iznosila 53.03 nM (95% interval pouzdanosti od 53.65 do 60.61 nM). Nakon 48 sati inkubacije, LC<sub>50</sub> karvakrola iznosio je 33.83 nM (95% interval pouzdanosti 32.09 do 35.66 nM) (Slika 53). Uginuća *C. elegans* nisu zabeležena u kontrolnim Petri šoljama. U intervalu između 24 i 48 sati, primećeno je da se faringealno pumpanje *C. elegans* usporava i u potpunosti zaustavlja.

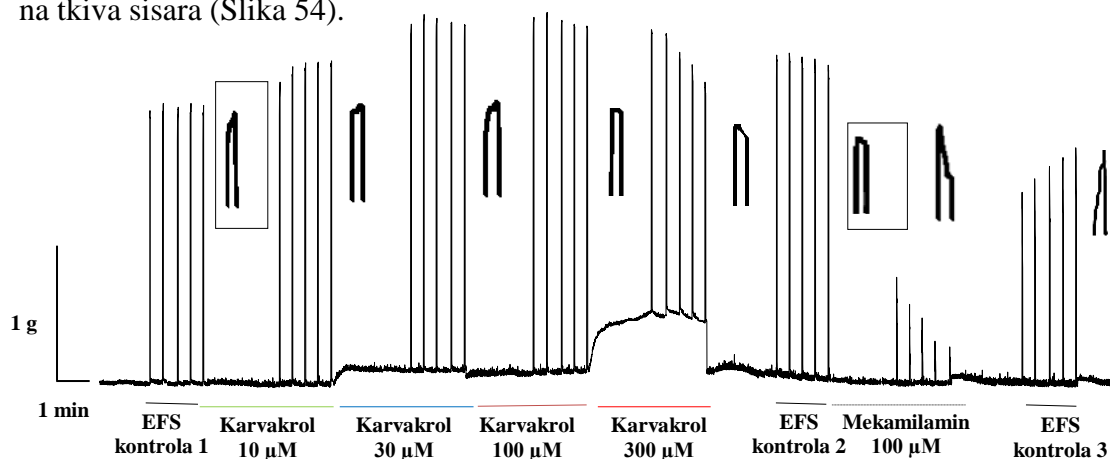


**Slika 53.** Sigmoidna kriva dozno-zavisnog nematocidnog efekta karvakrola za *C. elegans* nakon 24 i 48 sati inkubacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost mortaliteta (%  $\pm$ SD) izračunatu na 5 Petri šolja.

## 5.7. Ispitivanje uticaja biljnih monoterpenoida na kontrakcije dijafragme pacova primenom metode električne poljne stimulacije (EFS)

### 5.7.1. Ispitivanje uticaja karvakrola na kontrakcije dijafragme izazvane EFS

Na osnovu postavljenih ciljeva bilo je značajno da se ispita mehanizam dejstva odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja i selektivnost dejstva ovih supstanci na tkiva sisara (Slika 54).



**Slika 54.** Originalni zapis kontrakcija dijafragme izazvanih EFS na kome je prikazan uticaj rastućih koncentracija karvakrola (10, 30, 100 i 300  $\mu$ M) i mekamilamina (100  $\mu$ M) na indirektno tetanične kontrakcije. Parametri EFS su: 50Hz, 10  $\mu$ s, 2 s, 30 s, 30 V.



Na slici 54 prikazane su kontrakcije izolovane dijafragme pacova izazvane električnim poljem (EFS) i efekat rastućih koncentracija karvakrola (10, 30, 100 i 300  $\mu\text{M}$ ) na te kontrakcije. Na kraju testa mekamilaminom je potvrđeno da su kontrakcije izazvane indirektnom stimulacijom dijafragme (oslobađanjem ACh). U tabeli 32 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija dijafragme bez i u prisustvu karvakrola. Analizom zapisa kontrakcija dijafragme može se videti da karvakrol u koncentracijama od 100 i 300  $\mu\text{M}$  dovodi do pojave tetaničnog slabljenja (engl. tetanical fade) što ukazuje da karvakrol utiče na presinaptičku autoreceptorsku strukturu (Slika 54).

**Tabela 32.** Prikaz rezultata ANOVA testa. Uticaj četiri rastuće koncentracije karvakrola (10, 30, 100, 300  $\mu\text{M}$ ) i 100  $\mu\text{M}$  mekamilamina na kontrakcije dijafragme izazvane električnom poljnom stimulacijom (EFS).

Supstanca	(n)	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )	Kontrola 1	Supstanca	Kontrola 2	Kontrola 3
Karvakrol	6	10	2.62±0.31	2.90±0.43	2.67±0.14	2.09±0.27
Karvakrol	6	30	2.69±0.33	2.96±0.33	2.67±0.15	2.18±0.27
Karvakrol	6	100	2.85±0.45	3.20±0.30	2.69±0.16	2.28±0.28
Karvakrol	6	300	2.82±0.44	2.54±0.16	2.66±0.15	2.39±0.25
Mekamilamin	6	100	2.83±0.43	0.45±0.06 *##### <i>p=0.001,p&lt;0.0001,p&lt;0.0001</i>	2.65±0.15	2.53±0.21

\*Statistička značajnost u poređenju sa kontrola 1

#Statistička značajnost u poređenju sa kontrola 2

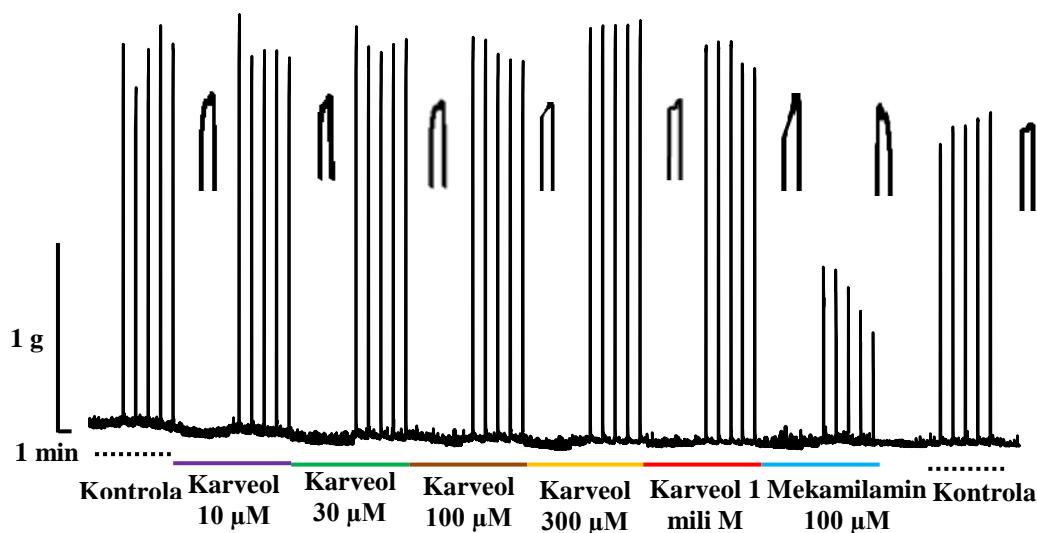
\*Statistička značajnost u poređenju sa kontrola 3

Kao što se u tabeli 32 može videti, karvakrol nije promenio amplitudu kontrakcija, dok je mekamilamin kontrakcije signifikantno inhibirao. Međutim, primećeno je da najviša testirana koncentracija karvakrola (300  $\mu\text{M}$ ) povećava osnovni tonus preparata. Ovo dejstvo je reverzibilno i prestaje posle ispiranja karvakrola (Slika 38).

### 5.7.2. Ispitivanje uticaja karveola na EFS-indukovane kontrakcije dijafragme pacova

Selektivnost dejstva karveola je takođe ispitana na modelu kontrakcija dijafragme pacova izazvanih sa EFS. Indirektnim dejstvom EFS oslobađa se ACh na motornoj ploči što izaziva kontrakcije. U ovoj seriji ispitan je uticaj karveola na kontrakcije dijafragme. Kao što je prikazano na slici 55, testiran je efekat pet rastućih koncentracija karveola (10, 30, 100, 300 i 1000  $\mu\text{M}$ ) a zatim je mekamilaminom u koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  potvrđeno da su kontrakcije dijafragme izazvane oslobađanjem ACh.

Ukupan broj testiranih preparata dijafragme pacova bio je šest. Na slici 55 se vidi da nakon aplikacije rastućih koncentracija karveola ne dolazi do povišenja bazalnog tonusa preparata. Čak ni nakon aplikacije 1 mM karveola ne dolazi do promene maksimalnog efekta kontrakcija dijafragme niti bazalnog tonusa preparata.



**Slika 55.** Originalni zapis kontrakcija dijafragme izazvanih EFS na kome je prikazan uticaj rastućih koncentracija karveola (10, 30, 100, 300 i 1000  $\mu\text{M}$ ) i mekamilamina (100  $\mu\text{M}$ ) na kontrakcije (Parametri EFS: 50Hz, 10  $\mu\text{s}$ , 2 s, 30 s, 30 V).

Analizom zapisa kontrakcija dijafragme na slici 55 uočava se da karveol ne dovodi do tetaničnog slabljenja (za razliku od karvakrola), što ukazuje da karveol ne ispoljava efekat na presinaptičku autoreceptorsku strukturu na motornoj ploči. U tabeli 33 prikazani su rezultati statističke obrade rezultata kontrakcija metodom analize varijanse gde su poređene srednje vrednosti amplituda kontrakcija.

**Tabela 33.** Analiza srednjih vrednosti kontrakcija ANOVA testom. Prikaz uticaja pet rastućih koncentracija karveola (10, 30, 100, 300, 1000  $\mu\text{M}$ ) i 100  $\mu\text{M}$  mekamilamina na indirektnu tetaničnu kontrakciju električnom poljnom stimulacijom.

Supstanca	(n)	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )	Kontrola	Supstanca	Ispiranje
Karveol	6	10	3.56±0.25	3.71±0.27	2.66±0.15
Karveol	6	30	3.47±0.21	3.69±0.25	2.79±0.16
Karveol	6	100	3.56±0.23	3.71±0.25	2.84±0.16
Karveol	6	300	3.58±0.27	3.71±0.22	2.88±0.17
Karveol	6	1000	3.60±0.26	3.62±0.27	2.94±0.18
Mekamilamin	6	100	3.55±0.24	1.35±0.14**** <i>p=0.0008, p=0.001</i>	2.82±0.16

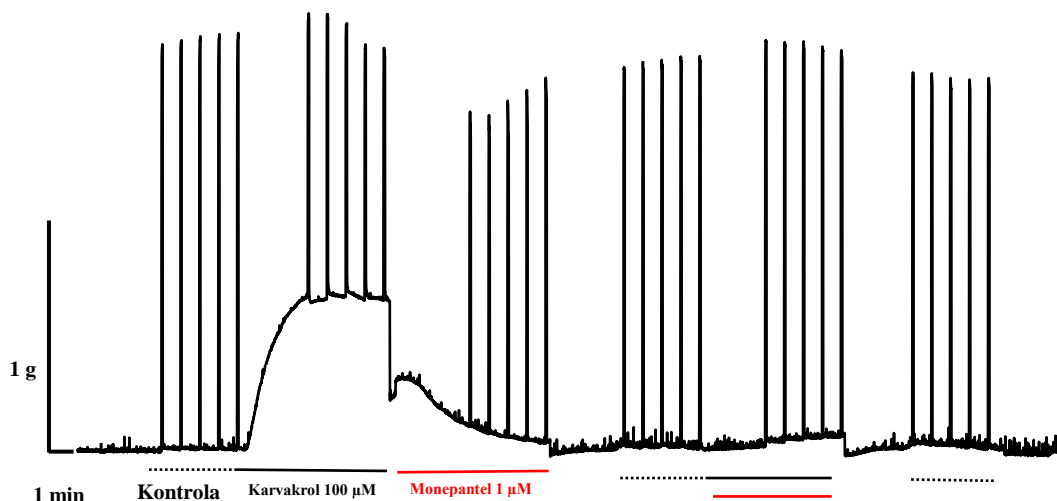
\*Statistička značajnost u odnosu na kontrolu

+Statistička značajnost u odnosu na ispiranje

Rezultati analize varijanse kontraktilnog efekta EFS pokazuju da je 100  $\mu\text{M}$  mekamilamina visoko signifikantno smanjilo kontrakcije, dok karveol nije uticao na promenu srednjih vrednosti kontrakcija u odnosu na kontrolu pre i posle ispiranja preparata.

### 5.7.3. Ispitivanje uticaja karvakrola i monepantela na EFS-indukovane kontrakcije dijafragme pacova

Značajno je bilo da ispitamo interakciju karvakrola i monepantela na modelu kontrakcija dijafragme pacova, jer smo prethodno takvu interakciju utvrdili na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Testirane su koncentracije 100  $\mu\text{M}$  karvakrola i 1  $\mu\text{M}$  monepantela. Na slici 56 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcije dijafragme bez i u prisustvu ispitivanih supstanci. Broj testiranih preparata iznosio je 6.



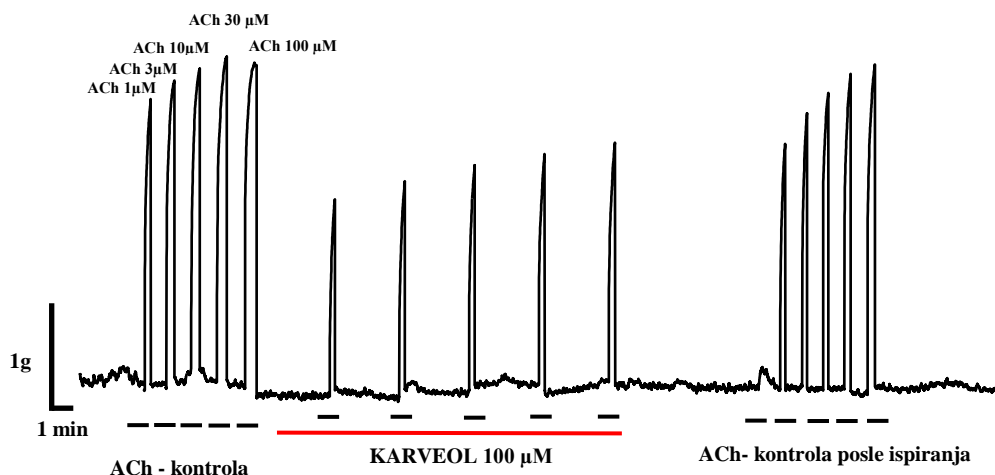
**Slika 56.** Reprezentativni zapis kontrakcija dijafragme izazvanih EFS na kome je prikazan uticaj 100  $\mu\text{M}$  karvakrola i 1  $\mu\text{M}$  monepantela. Parametri EFS su: 50Hz, 10  $\mu\text{s}$ , 2 s, 30 s, 30 V.

Na zapisu se vidi da karvakrol u koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  dovodi do povećanja bazalnog tonusa dijafragme, a da se nakon ispiranja i aplikacije 1  $\mu\text{M}$  monepantela preparat relaksira i vraća bazalni tonus na kontrolni nivo. Interesantno je da nakon zajedničke aplikacije ove dve supstance ne dolazi do povećanja tonusa dijafragme ili je promena tonusa zanemarljivo mala.

## 5.8. Ispitivanje efekta monoterpenoida na kontrakcije izolovanog ileuma pacova

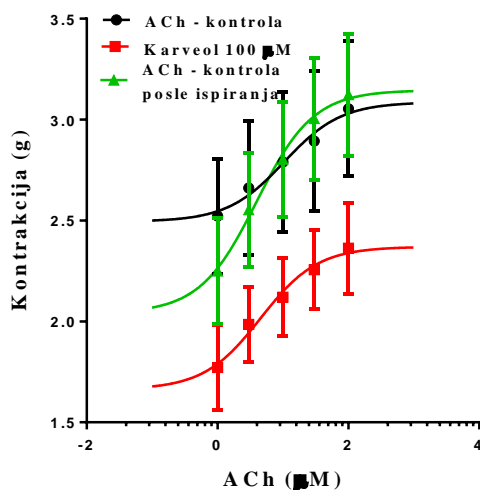
### 5.8.1. Ispitivanje efekta karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina

Na osnovu prethodno postavljenog zadatka, ispitana je selektivnost dejstva i uticaj karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova, izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ). Po protokolu, prvo je posmatrana kontrolna serija kontrakcija, nakon toga aplikovan je karveol u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ . Posle ispiranja karveola ponovo je urađena kontrolna serija kontrakcija. Reprezentativni zapis kontrakcija je prikazan na slici 57. Ukupan broj testiranih preparata ileuma iznosio je šest.



**Slika 57.** Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija ileuma pacova izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i inhibicija kontrakcija sa 100  $\mu\text{M}$  karveola. Na zapisu je označeno: crna linija je kontrola, dozno-zavisni efekti acetilholina; crvena linija označava inkubaciju sa 100  $\mu\text{M}$  karveola.

Dobijeni rezultati kontrakcija ileuma pacova analizirani su nelineranom regresijom.



**Slika 58.** Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karveola. Na grafiku su obeleženi: ACh kontrola ( $n=6$ , crna linija); ACh u prisustvu karvakrola 100  $\mu\text{M}$  ( $n=6$ , crvena linija); ACh kontrola posle ispiranja ( $n=6$ , zelena linija).

Na slici 58 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i kontraktalnog efekta acetilholina na izolovanom ileumu pacova, bez i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karveola. U tabeli 34 prikazani su rezultati nelinearne regresione analize dobijenih kontrakcija.

**Tabela 34.** Rezultati neregresione analize uticaja 100 $\mu\text{M}$  karveola na kontrakcije izolovanog ileuma izazvanih acetilholinom.

Srednja efektivna koncentracija ACh ( $\text{EC}_{50}$ ) ( $\mu\text{M}$ )	95% granice sigurnosti $\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Log $\text{EC}_{50}$	Maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	95% granice sigurnosti ( $E_{\text{max}}$ ) (g)	Koeficijent regresije ( $R^2$ )	Broj testiranih preparata (n)
<b>ACh - kontrola</b>						
10.44	0.01-204.16	1.02	3.09	2.16-4.01	0.06	6
<b>ACh + karveol 100 <math>\mu\text{M}</math></b>						
4.56	0.06-360.50	0.66	2.37	1.95-2.79	0.17	6
<b>ACh – kontrola nakon ispiranja</b>						
3.95	0.06-248.20	0.60	3.15	2.57-3.72	0.19	6

Dobijeni rezultati pokazuju da je kontrolna srednja efektivna koncentracija ( $\text{EC}_{50}$ ) ACh bila 10.44  $\mu\text{M}$  ali se u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karveola smanjila se na 4.56  $\mu\text{M}$ . Nakon ispiranja preparata  $\text{EC}_{50}$  se spustila se na 3.95  $\mu\text{M}$ , što je znazno niža vrednost od kontrolnog nalaza. Testirana koncentracija karveola izazvala je smanjenje vrednosti maksimalnog efekta ( $E_{\text{max}}$ ) kontrakcija ileuma od kontrolnih 3.09 g na 2.37 g. Nakon ispiranja maksimalni efekat je dostigao nešto veću vrednost nego početna kontrolna i iznosio je 3.15 g.

U tabeli 35 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija ileuma pacova bez i u prisustvu karveola.

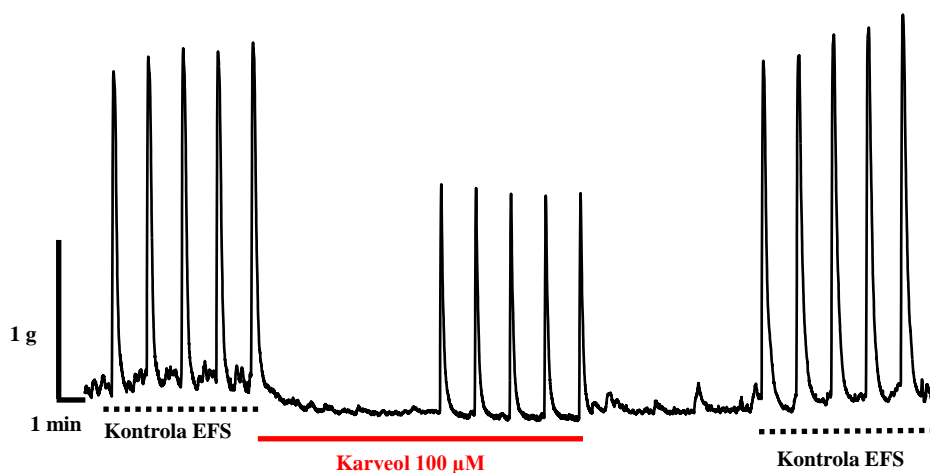
**Tabela 35.** Rezultati ANOVA testa sa izračunatim srednjim vrednostima kontrakcija ileuma pacova izazvanih rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karveola: ACh-kontrola; ACh + karveol 100  $\mu\text{M}$ ; ACh-kontrola nakon ispiranja ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n=6$ ).

Kontrakcija preparata ileuma pacova (g)					
Koncentracija	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
ACh - kontrola	2.52 $\pm$ 0.28	2.66 $\pm$ 0.33	2.79 $\pm$ 0.35	2.89 $\pm$ 0.35	3.05 $\pm$ 0.33
ACh + karveol 100 $\mu\text{M}$	1.77 $\pm$ 0.21 <i>p=0.14</i>	1.88 $\pm$ 0.19 <i>p=0.20</i>	2.12 $\pm$ 0.19 <i>p=0.18</i>	0.78 $\pm$ 0.09 <i>p=0.17</i>	2.36 $\pm$ 0.22 <i>p=0.16</i>
ACh - kontrola nakon ispiranja	2.25 $\pm$ 0.26	2.55 $\pm$ 0.28	2.80 $\pm$ 0.28	0.21 $\pm$ 0.04	3.12 $\pm$ 0.30

Rezultati analize varijanse pokazuju da 100  $\mu\text{M}$  karveola nije signifikantno uticao na smanjenje srednjih vrednosti kontrakcija ileuma pacova izazvanih ACh u odnosu na kontrolu pre i u odnosu na kontrolu nakon ispiranja.

### 5.8.2. Ispitivanje efekta karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvanih EFS

Metodom EFS izazvane su kontrakcije izolovanog ileuma i posmatran je efekat karveola na te kontrakcije. Protokol je započeo izvođenjem kontrolne serije kontrakcija sa pet stimulacija. Nakon toga, preparat je inkubiran sa 100  $\mu\text{M}$  karveola. Posle ispiranja karveola ponovo je urađena kontrolna serija kontrakcija (Slika 59).



**Slika 59.** Reprezentativni zapis kontrakcija ileuma izazvanih EFS na kome je prikazan uticaj 100  $\mu\text{M}$  karveola. Parametri EFS stimulacije su: 100Hz, 2  $\mu\text{s}$ , 2 s, 60 s, 45 V.

U tabeli 36 prikazani su rezultati analize varijanse srednjih vrednosti kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS bez i u prisustvu karveola.

**Tabela 36.** Prikaz rezultata ANOVA testa srednjih vrednosti kontrakcija ileuma pacova izazvanih električnim poljem bez i u prisustvu 100  $\mu$ M karveola: EFS-kontrola; EFS + karveol 100  $\mu$ M; EFS-kontrola nakon ispiranja ( $x \pm SE$ ,  $n=6$ ).

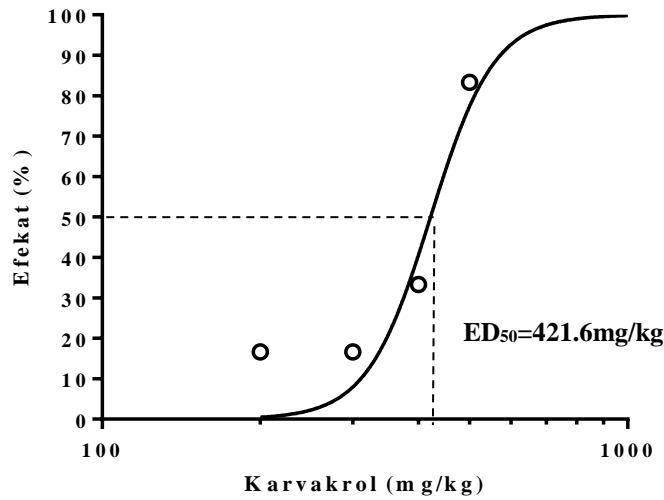
Oznaka paketa stimulacija	Broj ponavljanja	Kontrola EFS	Karveol 100 $\mu$ M	Ispiranje EFS
1	6	2.67 $\pm$ 0.27	1.61 $\pm$ 0.27* $p=0.03$	2.73 $\pm$ 0.27
2	6	2.66 $\pm$ 0.26	1.60 $\pm$ 0.26* $p=0.03$	2.78 $\pm$ 0.26
3	6	2.69 $\pm$ 0.28	1.59 $\pm$ 0.25* $p=0.02$	2.83 $\pm$ 0.26
4	6	2.68 $\pm$ 0.28	1.63 $\pm$ 0.24* $p=0.03$	2.86 $\pm$ 0.25
5	6	2.70 $\pm$ 0.28	1.62 $\pm$ 0.24* $p=0.02$	2.92 $\pm$ 0.25

\*Statistički značajna razlika u odnosu na EFS kontrola

Rezultati pokazuju da je 100  $\mu$ M karveola signifikantno inhibisao kontrakcije ileuma pacova izazvane sa EFS u odnosu na kontrolne kontrakcije.

### 5.9. Ispitivanje dejstva karvakrola na neuromišićnu koordinaciju pacova izvođenjem Rota-rod testa

Rota-rod test se koristi kao metod u ispitivanju neuromišićne koordinacije i integrisanosti nervnog sistema pacova. U našem ispitivanju merena je sposobnost pacova da se održe na rotirajućoj osovini odnosno, beležen je broj padova posle aplikacije ispitivane supstance. Parametri rotacija bili su 15 obrtaja u minuti u toku 5 minuta trajanja testa. Pacovi su trenirani 7 dana pre izvođenja glavnog testa. Na kraju sedmodnevnog perioda oni su bili sposobni da se održe na rotirajućoj osovini 5 minuta bez padova. Životinje su podeljene u šest grupa sa po šest pacova u svakoj. Karvakrol je aplikovan pre izvođenja testa želudačnom sondom peroralno. Prva eksperimentalna grupa je na dan izvođenja testa dobila 200 mg/kg karvakrola, druga 300 mg/kg, treća 400 mg/kg, četvrta je dobila 500 mg/kg karvakrola, dok je peta grupa tretirana sa 3 mg/kg diazepamom intraperitonealno. Šesta grupa je bila netretirana kontrola. Na slici 60. prikazana je dozno-zavisna sigmoidna kriva odnosa doze i efekta karvakrola na Rota rod testu posle 90 minuta od aplikacije.



**Slika 60.** Sigmoidne krive dozno-zavisnog efekta karvakrola (200, 300, 400 i 500 mg/kg) na neuromišićnu koordinaciju pacova ispitanu Rota-rod testom i izračunate vrednosti ED<sub>50</sub> nakon 90 minuta od aplikacije karvakrola. Broj testiranih pacova u svakoj grupi iznosio je šest.

U prvom testiranju pacova, pola sata posle aplikacije karvakrola, samo su dve životinje pale sa rotirajuće osovine, pa nije bilo moguće preračunati srednju efektivnu dozu. U sledećem vremenu testiranja, posle 90 minuta pacovi su padali u sve četiri tretirane grupe (Tabela 37) i srednja efektivna doza karvakrola preračunata na osnovu dobijenih rezultata iznosila je 421.6 mg/kg telesne mase.

**Tabela 37.** Prikaz primenjenih doza karvakrola i njihov efekat na Rota-rod testu pacova kao i efekat diazepamama.

DIAZEPAM (mg/kg) intraperitonealno	KARVAKROL (mg/kg) peroralno	(n)	Broj padova pacova pre aplikacije	Broj padova pacova 30 min posle aplikacije	Broj padova pacova 90 min posle aplikacije
3		6	0/6	3/6	0/6
	200	6	0/6	1/6	1/6
	300	6	0/6	1/6	1/6
	400	6	0/6	0/6	2/6
	500	6	0/6	0/6	5/6

Kod kontrolnih netretiranih pacova nisu zabeležili padovi ni u jednom posmatranom vremenskom intervalu posle aplikacije karvakrola (nije prikazano u tabeli 37). Iz tabele 37 se vidi da je posle pola sata od aplikacije diazepamama, sa rotirajuće osovine palo 3/6 pacova, dok padova nije bilo posle 90 minuta. Sa druge strane, u grupi pacova tretiranih sa 200 mg/kg karvakrola zabeležen je po jedan pad u oba perioda merenja rota-rod performansi. Pacovi tretirani sa 300 mg/kg karvakrola imali su po



jedan pad posle 30 i 90 minuta od aplikacije. U grupi pacova tretiranih sa 400 mg/kg karvakrola nije bilo padova nakon pola sata od aplikacije, međutim nakon 90 minuta zabeležena su dva pada. Posle aplikacije 500 mg/kg karvakrola posle pola sata nije bilo padova, dok je nakon 90 minuta palo 5/6 pacova. Ovi rezultati su obrađeni nelinearnom regresijom i dobijena vrednosti  $ED_{50}$  prezentovana je na slici 60.

## 6. Diskusija

**Ispitivanje dozno-zavisnog dejstva odabranih biljnih mono i diterpenoida na kontrakcije neuromišićnog preparata *Ascaris suum***

**Ispitivanje efekta acetilholina, karvakrola, GABA i piperazina**

***Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom (ACh) u prisustvu 100 i 300  $\mu$ M karvakrola***

Biljke proizvode etarska ulja kao organske proizvode sekundarnog metabolizma. Aktivni principi esencijalnih ulja, prema do sada objavljenim podacima, su bezbedni za upotrebu i potencijalno su atraktivna alternativa aktuelnim antiparazitskim lekovima. U literaturi se navodi da biljna eterična ulja i njihovi aktivni principi pokazuju insekticidnu i nematocidnu aktivnost protiv jednog broja insekata i nematoda (Ellis i Baxendale 1997; Enan 2005; Camurca-Vasconcelos i sar., 2007; Barros i sar., 2009.). Prema podacima Lei i saradnika (2010), utvrđeno je da karvakrol u koncentraciji od 0.67 mM ispoljava 100%-tni letalitet prema *A. suum* u *in vitro* uslovima. Timol i karvakrol ispoljavaju nematocidna dejstva i na *Haemonchus contortus* i *Bursaphelenchus xylophilus* (Camurca-Vasconcelos i sar., 2007; Kong i sar., 2007).

ACh je endogeni neurotransmiter u neuromišićnom sistemu parazitskih nematoda. Holinergički receptori neuromišićnog sistema parazitskih nematoda regulišu njihovo kretanje i imaju funkciju održavanja, kao i potpurnu ulogu u toku svih motoričkih aktivnosti. Kao što literaturni podaci ukazuju, smatra se da je upravo ACh glavni neurotransmiter u holinergičkom delu neuromišićnog sistema parazitskih nematoda. Iz tog razloga, ispitivanje je započeto određivanjem dozno-zavisnog efekta acetilholina tokom kontrakcija na neuromišićnom preparatu *A.suum*. Nelinearnom regresionom analizom dobijena je vrednost  $EC_{50}$  za ACh koja je iznosila 5.66  $\mu$ M koja je približna podacima Ivanović (2013), gde je autor naveo da je vrednost  $EC_{50}$  bila 6.22  $\mu$ M ACh. Na osnovu naših dobijenih rezultata vrednost maksimalnog efekta kontrakcije iznosila je 2.12 g.

Za nas je bilo posebno značajno da ispitamo efekte različitih koncentracija karvakrola na kontrakcije izazvane ACh. Vrednost  $EC_{50}$  ACh u kontrolnoj seriji iznosila

je 8.87  $\mu\text{M}$  sa maksimalnim efektom od 2.53 g. Nakon aplikacije 100  $\mu\text{M}$  karvakrola vrednost  $\text{EC}_{50}$  ACh neznatno se smanjila na 7.66  $\mu\text{M}$ , kao i maksimalni efekat koji je dostigao 2.20 g. Tri puta viša koncentracija karvakrola imala je za posledicu povećanje vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za 3 puta i smanjenje maksimalnog efekta za skoro 1 gram ( $E_{\text{max}} = 1.63$  g). Ovakav efekat karvakrola na kontrakcije izazvane ACh ukazuje da njegovo inhibitorno dejstvo ispoljava karakteristike kompetitivnog i nekompetitivnog antagonizma. Rezultati ANOVA testa pokazuju da je 300  $\mu\text{M}$  karvakrola visoko signifikantno inhibirao kontrakcije, što ukazuje na opravdanost naše prethodne konstatacije da karvakrol ispoljava karakteristike kompetitivnog/nekompetitivnog antagoniste. Na osnovu rezultata Trailović i sar. (2015) inhibitorno dejstvo karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* se odigrava posredstvom nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR). Kako je u našem ispitivanju pokazano, najverovatnije jedan deo inhibitornog dejstva karvakrol ostvaruje vezujući se za mesto na receptoru koje je različito od mesta vezivanja ACh. Ovakvi rezultati nisu u saglasnosti sa podacima koje su objavili Lei i sar. (2010) jer su oni tvrdili da karvakrol deluje na tiraminski receptor, koji otvara tiramin-zavisni hloridni kanal kod *C. elegans* i reguliše pokrete glave i kretanje unapred (Pirri i sar. 2009). Međutim, mi smo testirali dejstvo tiramina na neuromišićnom preparatu *A. suum* i dokazali da on ne ispoljava bilo kakav efekat na kontrakcije izazvane acetilholinom. Ovakav naš rezultat je u saglasnosti sa podacima Komuniecki i sar. (2012) koji navode da tiramin ne utiče na lokomociju *A. suum* kada se aplikuje injekcijom u telesni zid nematode. Ovi autori smatraju da se tiraminski receptori nalaze najverovatnije samo u predelu glave i da reguliše pokrete ovog dela tela nematoda.

#### *Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu GABA i karvakrola*

Po hemijskom sastavu neproteinska aminokiselina, GABA je evolutivno prisutna još kod nekih vrsta bakterija kod kojih ima metaboličku ulogu. U literaturi se navodi da se kod nekih pljosnatih crva evolutivno prvi put pojavljuje primitivni CNS, dok dokumentovani podaci govore da je GABA glavni inhibitorni neurotransmiter u neuromišićnom sistemu valjkastih glista (Gou i sar., 2012). Kod nematoda i sisara GABA otvara spore hloridne jonske kanale na postsinaptičkoj membrani,

omogućavajući ulazak jona hlora iz ekstracelularnog u intracelularni prostor, što ima za posledicu smanjenje rezistencije ćelijske membrane i hiperpolarizaciju postsinaptičke ćelijske membrane (Trailović i sar., 2001). To praktično znači da GABA dovodi do relaksacije somatske muskulature otvaranjem hloridnih jonskih kanala. Opisani GABA receptori invertebrata ne odgovaraju klasifikaciji sisarskih GABA receptora, ali je većinsko mišljenje da su slični GABA<sub>A</sub> receptoru sisara (Holden-Dye i sar., 1989; Trailović i sar., 2011). Sa druge strane, ACh je endogeni neurotransmitter koji se posle oslobađanja vezuje na postsinaptičkoj membrani za nAChR, što za posledicu ima otvaranje neselektivnog katjonskog kanala, ulazak jona natrijuma, a time i nastanak brze depolarizacije membrane mišićne ćelije nematode, koja rezultira mišićnom kontrakcijom. U interakciji ova dva neurotransmitera leži koordinacija kretanja nematoda. GABA je neurotransmitter odgovoran za procese relaksacije na neuromišićnim strukturama svih nematoda. Molekuli GABA se oslobađaju na krajevima inhibitornog, dok se ACh oslobađa na kraju ekscitatornog interneurona i na postsinaptičkoj membrani motoneurona i samim tim se ova dva molekula ponašaju kao fiziološki antagonisti. Posle kontrolne serije kontrakcija izazvanih sa ACh, neuromišićni preparati su inkubirani sa 1 μM GABA. Ova koncentracija GABA nije uticala na snižavanje bazalnog tonusa niti je menjala spontanu aktivnost preparata. Vrednost EC<sub>50</sub> ACh posle inkubacije sa 1 μM GABA gotovo da se nije promenila kao i vrednost maksimalnog efekta. Međutim, kada smo isti preparat inkubirali sa 1 μM GABA i 100 μM karvakrola EC<sub>50</sub> se povećala za oko 2 μM (sa 13.50 na 15.63 μM), ali je maksimalni efekat smanjen za više od pola grama sa 1.37 na 0.80 g. Testirali smo i 10 puta višu koncentraciju GABA (10 μM) sa 100 μM karvakrola i dobili povećanje vrednosti EC<sub>50</sub> za manje od 6 μM, ali je maksimalni efekat opao na svega 10 % kontrolne vrednosti (0.15 g). Ovakvi naši rezultati ukazuju na nekompetitivnu inhibiciju koju dominantno u ovoj kombinaciji nosi GABA jer je povećanje njene koncentracije značajno smanjilo E<sub>max</sub>. Upravo zbog toga testirali smo uticaj 3 μM GABA samostalno i u kombinaciji sa 100 μM karvakrola. Pokazalo se da je 3 μM GABA ispoljilo sličan efekat kao i tri puta niža koncentracija u prethodnom ispitivanju. Vrednost EC<sub>50</sub> ACh se povećala za oko 10 μM, ali se maksimalni efekat smanjio za oko pola grama. Međutim, kada smo inkubaciju preparata izvršili sa 3 μM GABA i 100 μM karvakrola EC<sub>50</sub> acetilholina je

dostigla skoro 26  $\mu\text{M}$ , a maksimalni efekat je opao ispod jednog grama. Kao što se iz rezultata vidi karvakrol je potencirao inhibitorne efekte GABA. Ovde se očigledno radi o sinergističkom inhibitornom dejstvu GABA i karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih ACh. Generalno ove dve supstance deluju antagonistički u odnosu na dejstvo ACh. Mehanizam fiziološkog antagonizma bi trebao da bude nekompetitivan, jer se radi o supstancama agonisti (GABA) i antagonisti (karvakrol) različitih receptora na istom efektornom organu (Holden-Dye i sar., 1989) koje ispoljavaju isti efekat, odnosno inhibiciju kontrakcija. To upravo znači da bi karvakrol ako deluje na nAChR trebalo da ispolji kompetitivni, a GABA nekompetitivni antagonizam. Ovo se samo donekle pokazalo tačnim u našim eksperimentima, tako da ni karvakrol ni GABA nisu ispoljili isključivo efekte kompetitivnog odnosno nekompetitivnog antagoniste. Objasnjenje može biti u činjenici da kod nematoda zbog specifične uloge inhibitornih i ekscitatornih interneurona i motoneurona postoji ovakav kombinovani antagonistički efekat. Kod kompetitivnog antagonizma dolazi do pomeranja krive odnosa doze i efekta u desno, sa potencijalnim povećanjem vrednosti  $EC_{50}$ , ali bez promene maksimalnog efekta  $E_{max}$  (Katzung i sar., 2011; Rang i sar., 2005). Međutim, očigledno da ovakve relacije zabeležene u sisarskim neuromišićnim sistemima ne važe za neuromišićni sistem parazitskih nematoda. Za razliku od mišićnih ćelija sisara do kojih stiže akson motoneurona koji gradi motornu ploču, mišićne ćelije nematode imaju produžetak prema nervnoj vrpici u kojoj se vezuju za motoneuron čija se regulacija odvija posredstvom inhibitornih i ekscitatornih interneurona. To upravo može biti razlog mešovitog antagonizma koji se javlja, bilo da je primenjen nikotinski antagonista ili GABA agonista (Trailović i sar., 2015). Martin (1982) je dokazao da se na vrećastom delu mišićne ćelije nalaze ekstra-sinaptički GABA receptori čija aktivacija ima za posledicu pojačavanje hloridne struje. Činjenica da se GABA u našem istraživanju ponaša kao kompetitivni/nekompetitivni antagonist može biti posledica toga da je prvi deo dejstva posledica vezivanja za GABA receptor u sinapsama između inhibitornih interneurona i motoneurona (sinaptički efekat) dok je drugi deo dejstva postinaptički i uključuje GABA-receptore u regionu vreće mišićnih ćelija. Prvi deo dejstva je odgovoran za kompetitivnu inhibiciju, koja odmah aktivira ekscitatorni antagonistički mehanizam (ekscitatorni interneuroni). Drugi deo dejstva je sekundarni

postsinaptički efekat, odnosno posledica vezivanja ekstrasinaptičkih receptora i posledična nekompetitivna inhibicija kontrakcija.

*Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu piperazina i karvakrola*

Na osnovu prethodno dobijenih rezultata pokazalo se značajno da ispitamo i uporedimo efekte piperazina na kontrakcije izazvane ACh i interakciju piperazina sa karvakrolom. Cilj je bio da uporedimo efekte GABA i piperazina za koga je poznato da je gabaergički antihelminetik (Trailović, 2001). U kontrolnoj seriji dobijene su vrednosti  $EC_{50}$  acetilholina od 11.75  $\mu$ M sa maksimalnim efektom 2.88 g. Piperazin (300  $\mu$ M) je sam po sebi ispoljio efekat klasičnog nekompetitivnog antagoniste, povećavajući vrednost  $EC_{50}$  za manje od 1.5  $\mu$ M, dok je maksimalni efekat smanjio za više od pola grama. Kombinacija 300  $\mu$ M piperazina i 100  $\mu$ M karvakrola, slično efektu GABA i karvakrola povećala je vrednost  $EC_{50}$  na čak 33.25  $\mu$ M, a maksimalni efekat smanjila na 1.5 g. Na ovom mestu svakako treba uporediti efekat GABA sa efektom piperazina. Kao što se vidi piperazin je za razliku od GABA ispoljio isključivo nekompetitivni antagonizam u odnosu na kontraktilni efekat ACh. Ovo je verovatno posledica činjenice da on deluje samo na ekstrasinaptičke GABA receptore (Martin i sar., 1998) dok efekat na inhibitorne interneurone izostaje, a samim tim i kompetitivna komponenta antagonizma protiv dejstva acetilholina na ekscitatornim interneuronima. Očigledno je da karvakrol potencira inhibitorne efekte piperazina intenzivirajući i kompetitivnu i nekompetitivnu komponentu antagonističkog dejstva (povećanje vrednosti  $EC_{50}$  i smanjenje maksimalnog efekta).

Jedan interesantan nalaz koji želimo da istaknemo ovom prilikom jeste inhibicija spontanijih kontrakcija, koja se očigledno dešava mehanizmom nezavisnim od kontrakcija indukovanih acetilholinom. Pojačana spontana aktivnost preparata primećena je posle zajedničke primene piperazina i karvakrola i nestajala je nakon njihovog ispiranja. Detaljniju analizu ovog fenomena nismo izvršili, ali se svakako radi o interesantnom nalazu za buduća istraživanja. Još jedna interesantna pojava je primećena tokom ovog ispitivanja. Naime, kontrolne kontrakcije u poslednjoj seriji nakon ispiranja piperazina i karvakrola prosečno su bile više od početnih kontrolnih

kontrakcija. Ovaj nalaz se može objasniti izostajanjem kontrole ekscitatornih mehanizama do koje dolazi brzim povlačenjem inhibitornih supstanci sa receptora koji regulišu kontrakcije u evolutivno primitivnom neuromišićnom sistemu nematoda.

### **Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija preparata *A. suum* izazvanih pirantelom, morantelom i befinijumom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA**

*Uticaj karvakrola na izometrijske kontrakcije izazvane pirantelom, morantelom i befinijumom*

Na osnovu istraživanja koja su obavljena u SAD primenom elektrofiziološke metode karent klamp (engl. current clamp), inhibitorni efekat karvakrola je definitivno posledica direktnog dejstva na nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) *A. suum*. Ovi rezultati su potvrdili naše nalaze dobijene na modelu kontrakcija preparata askarisa. Za razliku od sisara, kod nematoda su dokazana tri tipa nikotinskog acetilholinskog receptora na membrani mišićne ćelije: L-tip (preferira levamizol i pirantel kao agonistu), N-tip (preferira nikotin i oksantel kao agonistu) i B-tip (preferira befinijum kao agonistu) (Martin i sar., 2004, Qian i sar., 2006). Kao ortosterični agonisti nikotinskog receptora pirantel, morantel i befinijum dovode do dozno-zavisnih kontrakcija na neuromišićnom preparatu *Ascaris suum*. Za razliku od ACh, oni nisu osetljivi na dejstvo ACh-esteraze koja je odgovorna za razgradnju i uklanjanje molekula acetilholina sa receptora, a samim tim i brzu posledičnu relaksaciju mišića. Pirantel, agonista L-tipa nAChR nematoda, izaziva kontrakcije u koncentracijama koje su 1000 puta niže od ACh, dok befinijum kao agonista B-tipa istog nikotinskog receptora izaziva kontrakcije u 10 puta nižim koncentracijama u odnosu na ACh (Ivanović, 2013). U ovom delu ispitivanja za nas je bilo značajno da utvrdimo kako karvakrol deluje na kontrakcije izazvane različitim agonistima nAChR parazitskih nematoda. U kontrolnoj seriji kontrakcija izazvanih pirantelom EC<sub>50</sub> ovog nikotinskog agoniste iznosila je 4.97nM, a maksimalni efekat kontrakcije 1.72g. U toku inkubacije sa 100 μM karvakrola, došlo je do povećanja vrednosti EC<sub>50</sub> za više od tri puta (17.05 nM) što je proizvelo odnos koncentracija sa kontrolnom vrednosti (engl. dose-ratio) od 3.43. Sa druge strane maksimalni efekat se smanjio za 0.5g ili za 30%. Tri puta veća koncentracija karvakrola nije značajnije promenila EC<sub>50</sub> vrednosti pirantela (19.32 nM)

pa je odnos  $EC_{50\text{kontrola}}/EC_{50\text{karvakrol300}}$  od 3.88 sličan kao i prethodni. Međutim maksimalni efekat bio je smanjen više od tri puta u odnosu na kontrolni nalaz, odnosno za 71%. Statistička analiza srednjih vrednosti maksimalnog efekta pokazala je visoku signifikantnost inhibicije kontrakcija, što zajedno sa neznatnim smanjenjem vrednosti  $EC_{50}$  pirantela ukazalo na nekompetitivni antagonizam koji karvakrol ispoljava.

Srednja efektivna koncentracija morantela u kontrolnoj seriji kontrakcija iznosila je 7.59 nM, a  $E_{\text{max}}$  1.79 g. Ustanovljeno je da je 100  $\mu\text{M}$  karvakrola skoro tri puta povećalo vrednost  $EC_{50}$  morantela (22.45 nM), i proizvelo odnos  $EC_{50\text{control}}/EC_{50\text{karvakrol100}}$  od 2.95. Maksimalni kontraktilni efekat smanjen je za 0.7 g ili 40%. Tri puta viša koncentracija karvakrola je samo malo povećala vrednost  $EC_{50}$  morantela (24.25 nM) tako da se odnos  $EC_{50\text{control}}/EC_{50\text{karvakrol300}}$  koncentracija nije značajnije promenio, bio je 3.19. Međutim  $E_{\text{max}}$  morantela je smanjena za 80% (0.36 g). I u ovom ispitivanju ANOVA je pokazala visoko signifikantnu inhibiciju srednjih vrednosti maksimalnog efekta kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama morantela. Kao i u slučaju pirantela i ovde se radi o izraženijem nekompetitivnom antagonizmu u odnosu na dejstvo morantela.

Poslednji od testiranih agonista bio je befinijum. Srednja efektivna kontraktilna koncentracija befinijuma u kontrolnoj seriji iznosila je 0.36  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}$  1.4 g. U prisustvu 100  $\mu\text{M}$  karvakrola  $EC_{50}$  je bila 0.89  $\mu\text{M}$ , tako da je odnos  $EC_{50\text{kontrola}}/EC_{50\text{karvakrol100}}$  iznosio 2.95, dok se  $E_{\text{max}}$  smanjio za 12.5% (1.23 g). Tri puta viša koncentracija karvakrola imala je za posledicu povećanje vrednosti  $EC_{50}$  befinijuma na 1.74  $\mu\text{M}$ , pa je odnos  $EC_{50\text{kontrola}}/EC_{50\text{karvakrol300}}$  iznosio 4.83 dok je maksimalni efekat opao na 0.35 g, odnosno smanjio se za 75%. Signifikantnu inhibiciju kontrakcija izazvanih svim testiranim rastućim koncentracijama befinijuma pokazala je samo tri puta viša koncentracija karvakrola.

Ukoliko analiziramo sve dobijene podatke možemo videti da je 100  $\mu\text{M}$  karvakrola smanjila  $E_{\text{max}}$  pirantela za 29 %, morantela za 39 % i befinijuma za 12 %. Sa druge strane odnos  $EC_{50\text{kontrola}}/EC_{50\text{karvakrol100}}$  pirantela bio je 3.43, morantela 2.95 i befinijuma 2.47. Tri puta viša koncentracija karvakrola (300  $\mu\text{M}$ ) smanjila je  $E_{\text{max}}$  pirantela za 71 %, morantela za 80 % i befinijuma za 75 %. Odnos  $EC_{50\text{kontrola}}/EC_{50\text{karvakrol300}}$  pirantela bila je 3.88, morantela 3.19 i befinijuma 4.83.



Očigledno je da karvakrol ispoljava razlike u inhibitornom dejstvu u odnosu na različite agoniste nAChR *A. suum*. Najvišu efikasnost karvakrol je ispoljio u inhibiciji dejstva morantela, mada je taj efekat bio najvećim delom nekompetitivan, jer je maksimalni efekat smanjen za 80%, a  $EC_{50}$  povećana 3.19 puta. Najviše kompetitivni antagonistički efekat karvakrol je ispoljio prema dejstvu befinijuma, jer je povećao  $EC_{50}$  ovog agoniste za skoro 5 puta. Međutim, generalno možemo zaključiti da je karvakrol antagonista koji veoma efikasno inhibiše efekte agonista svih tipova nAChR nematoda. Takođe, na osnovu naših rezultata možemo pretpostaviti da se morantel vezuje za poseban tip nACh receptora.

*Izometrijske kontrakcije izazvane pirantelom, morantelom i befinijumom u prisustvu 3  $\mu$ M GABA i 100  $\mu$ M karvakrola*

Prethodno je dokazano da 3  $\mu$ M GABA inhibiše kontrakcije izazvane različitim agonistima nAChR *A. suum*, ali da pri tome ne dolazi do promene bazalnog tonusa ispitivanih preparata. Za nas je bilo značajno da ispitamo efekte GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane prethodno testiranim agonistima nikotinskog receptora kako bi utvrdili razlike u pojedinačnim efektima i prirodu njihove interakcije. U kontrolnoj seriji kontrakcija vrednosti pirantela su iznosile  $EC_{50} = 8.44$  nM sa  $E_{max} = 1.52$  g. U prisustvu 3  $\mu$ M GABA vrednosti su bile  $EC_{50} = 28.11$  nM i  $E_{max} = 1.38$  g. Povećanje srednje efektivne koncentracije bez smanjenja maksimalnog efekta je karakteristika dejstva kompetitivnih antagonista što ne bi trebalo da bude slučaj sa GABA jer ona deluje na gabaergičke receptore dok je pirantel nikotinski agonista. Istovremenom inkubacijom 3  $\mu$ M GABA i 100  $\mu$ M karvakrola dobijena je dvostruko veća vrednost srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50} = 44.64$  nM), dok je maksimalni efekat ( $E_{max} = 0.47$  g) smanjen za jedan gram. Vrednost  $EC_{50}$  za pirantel povećana je više od 5.3 puta, sa smanjenjem  $R_{max}$  za 69%. Očigledno da karvakrol potencira inhibitorne efekte GABA pojačavajući nekompetitivne karakteristike njenog antagonističkog dejstva. Ovo može da ukaže na činjenicu da GABA deluje i presinaptički odnosno stimulišući inhibitorne interneurone čiji efekat dominira u odnosu na aktivnost ekscitatornih interneurona. Sa druge strane, dejstvo karvakrola kao nekompetitivnog antagoniste pirantela može da se objasni zasebnim mestom vezivanja na nikotinskom acetilholinskom receptoru. Kombinacija

GABA i karvakrola je visoko signifikantno inhibirala sve testirane koncentracije pirantela, za razliku od njihovih pojedinačnih aplikacija, što se može tumačiti izrazitom sinergističkom interakcijom.

Sličnu interakciju dobili smo i posle primene morantela. U kontrolnoj seriji kontrakcija, morantel je imao vrednosti  $EC_{50}$  od 3.72 nM a  $E_{max}$  je iznosila 1.16 g. Inkubacija sa 3  $\mu$ M GABA izazvala je povećanje srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50} = 5.60$  nM) i smanjenje maksimalnog efekta ( $E_{max} = 0.99$ ). Međutim, kombinacija GABA i karvakrola povećala je vrednost  $EC_{50}$  (7.94 nM), a  $E_{max}$  se smanjila na samo 0.39 g.  $EC_{50}$  za morantel povećana je 2.1 puta, sa smanjenjem  $R_{max}$  66%. I ovde je kombinacija GABA i karvakrola visoko signifikantno inhibirala kontrakcije izazvane morantelom pri čemu je efekat očigledno nekompetitivan što nas upućuje na isti zaključak kao u prethodnom ispitivanju.

Isti protokol smo primenili i na befinijum gde su u ispitivanjima u kontrolnoj seriji dobijene vrednosti  $EC_{50} = 0.62$   $\mu$ M sa  $E_{max} = 2.20$  g. Nakon aplikacije 3  $\mu$ M GABA vrednost  $EC_{50}$  befinijuma se povećala na 0.96  $\mu$ M sa  $E_{max}$  koja nije promenjena (2.18 g). Međutim, kombinacija GABA i karvakrola je dvostruko povećala vrednost  $EC_{50}$  befinijuma (1.40  $\mu$ M), dok se  $E_{max}$  smanjila za više od jednog grama (0.89 g).  $EC_{50}$  za befinijum povećan je 2.3 puta, uz smanjenje  $R_{max}$  za 60%. Statističkom analizom ustanovljeno je da je kombinovana inkubacija sa dve pomenute supstance visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane befinijumom.

Generalno kao rezime ovog dela ispitivanja možemo da iznesemo činjenicu da se GABA u relativno niskoj koncentraciji ponaša kao kompetitivni i nekompetitivni antagonista pirantela, morantela i befinijuma što može biti posledica kako je već rečeno njenog delovanja u sinapsama između interneurona i motoneurona. Sa druge strane karvakrol pre svega ispoljava efekte nekompetitivnog antagoniste, što možemo da objasnimo činjenicom da je klasifikacija nikotinskog receptora nematoda izvršena u toku elektrofizioloških ispitivanja receptora na vrećastom delu mišićne ćelije askarisa. Martin i Robertson (2007) su uspeli da identifikuju tri različita nikotinska acetilholinska receptora koja se aktiviraju različitim holinergičkim antihelminticima. Kakva je uloga nikotinskih agonista u sinapsama ekscitatornih interneurona i motorneuroma još uvek nije poznato.

Bez obzira na ovu konstataciju vrlo je očigledno da karvakrol izrazito pojačava inhibitorne efekte GABA što može biti direktno iskorišćeno za kombinovanu terapiju bilo sa lekovima GABA agonistima (piperazin) bilo sa modulatorima nikotinskog receptora nematoda (derkvantel, monepantel). Jasno se uočava da inhibitorni efekat karvakrola ne zavisi od vrste nikotinskog agoniste i da se karvakrol vezuje na neko specifično mesto na receptoru nematoda. Sinergistički efekat karvakrola i GABA je vrlo sličan sinergističkom efektu derkvantela i abamektina, što direktno može biti iskorišćeno u farmakoterapiji parazitskih infekcija životinja i ljudi.

### **Ispitivanje mehanizma dejstva monepantela (derivat aminoacetonitrila) i njegova interakcija sa karvakrolom na neuromišićnom preparatu *A. suum***

#### ***Uticaj monepantela na izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom***

Kao predstavniku najnovije grupe antihelmintika, o monepantelu se do sada govorilo kao alosteričnom modulatoru koji izaziva spazam somatskih mišića nematoda dovodeći do paralize, spazmične kontrakcije prednjeg dela farinksa i smrti parazita (Kaminsky i sar., 2008). Mi smo ispitali interakciju monepantela sa nikotinskim acetilholinskim receptorom *A. suum*. U kontrolnoj seriji dozno-zavisnih kontrakcija izazvanih acetilholinom (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ) dobijena je vrednosti  $\text{EC}_{50}$  ACh od 7.55  $\mu\text{M}$  sa  $E_{\text{max}}$  od 1.46 g. Nakon inkubacije preparata od pet minuta sa 1  $\mu\text{M}$  monepantela vrednosti su bile za  $\text{EC}_{50} = 11.95 \mu\text{M}$  i  $E_{\text{max}} = 1.50 \text{ g ACh}$ . Ovakav efekat monepantela (povećanje srednje efektivne koncentracije za 1.58 puta bez promene maksimalnog efekta) ukazuje na kompetitivni antagonizam koji on ispoljava u odnosu na ACh. Kada smo iste preparate inkubirali sa tri puta višom koncentracijama monepantela vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je porasla na 16.29  $\mu\text{M}$  ili za 2.15 puta, a  $E_{\text{max}}$  smanjen na 1.1 g.

U narednoj seriji ispitivanja testirali smo efekte 10  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  monepantela na kontrakcije izazvane acetilholinom. Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je bila 5.34  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}} = 1.89 \text{ g}$ . Posle inkubacije sa 10  $\mu\text{M}$  monepantela  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je porasla za 3.39 puta dok je  $E_{\text{max}}$  opao na 1.12 g. Posle inkubacije sa 30  $\mu\text{M}$  monepantela,  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je porasla na 23.05  $\mu\text{M}$  (porast od 4.31 puta), dok je  $E_{\text{max}}$  opao na 0.53 g. Na osnovu objavljenih rezultata Abongwa i sar. (2017), i naših rezultata možemo

konstatovati da monepantel deluje kao selektivni antagonista nikotinskog acetilholinskog receptora *A. suum* čiji efekat zavisi od koncentracije i ukazuje na mogućnost alosterične modulacije ovog receptora. Monepantel je u gore navedenom ispitivanju ispoljio nekompetitivni antagonizam u odnosu na *Asu*-ACR-16 i *Ode* levamizol senzitivni i *Ode* pirantel/tribendimidin senzitivni nACh receptor koji su eksprimovani na ovocitima žabe. Međutim u našem ispitivanju on ispoljava i karakteristike kompetitivnog antagoniste nAChR, što ukazuje na multipla mesta delovanja i heterogenu populaciju ove vrste receptora u neuromišićnom sistemu parazitskih nematoda.

#### *Izometrijske kontrakcije izazvane acetilholinom u prisustvu monepantela i karvakrola*

Posle ovakvih rezultata dejstva monepantela na kontrakcije izazvane ACh značajno je bilo da utvrdimo interakciju niskih koncentracija monepantela sa karvakrolom za koga smo prethodno utvrdili da deluje kao antagonista nikotinskog receptora nematoda. U kontrolnoj seriji  $EC_{50}$  acetilholina je iznosila 13.13  $\mu$ M, a  $E_{max}$  1.59 g. Nakon toga inkubacija sa 100  $\mu$ M karvakrola povećala je vrednost  $EC_{50}$  acetilholina na 19.20  $\mu$ M, a  $E_{max}$  od 1.32 g ACh. Ovi rezultati su bili u saglasnosti sa našim prethodnim ispitivanjima dejstva karvakrola. Inkubacija preparata sa 1  $\mu$ M monepantela povećala je vrednost  $EC_{50}$  acetilholina za preko 2  $\mu$ M (15.86  $\mu$ M), a maksimalni efekat je smanjen za 0.34 g ( $E_{max}=1.25$  g). Kombinacija karvakrola i monepantela ispoljila je sinegističko inhibitorno dejstvo pa je  $EC_{50}$  acetilholina porasla tri puta u odnosu na kontrolni nalaz, dok je maksimalni efekat smanjen za 50 %. Sami po sebi karvakrol i monepantel nisu signifikantno inhibirali kontrakcije izazvane sa ACh, međutim njihova kombinacija je ispoljila visoko signifikantan inhibitorni efekat. Ova kombinacija je ispoljila karakteristike kompetivnog i nekompetitivnog antagonizma u odnosu na kontraktilno dejstvo ACh što možemo da objasnimo specifičnim alosteričnim mestom vezivanja u odnosu na ACh i alosteričnom modulacijom nAChR. S obzirom na sve veći nivo rezistencije na monepantel ova kombinacija bi pouzdano mogla da pojača njegovo antinematodno dejstvo i spreči razvoj rezistencije kod parazita.

**Ispitivanje dejstva karveola na neuromišićnom preparatu *A. suum***

U literaturi je opisano da karveol inhibira aktivnost  $\alpha 7$  nikotinskog receptora sisara eksprimovanog na ovocitu žabe. Isto tako, dokazano je da su karveol indukovane inhibicije nezavisne od membranskog potencijala i ne mogu se poništiti povećanjem koncentracije acetilholina. U skladu sa funkcionalnim eksperimentima, dalje studije su pokazale da ciklični monoterpeni poput karveola mogu da interaguju sa alostričnim mestom koje se nalazi u  $\alpha 7$  transmembranskom domenu (Lozon i sar., 2016). Sa obzirom na hemijsku sličnost sa karvakrolom (oba jedinjenja potiču od izopentil pirofosfata i sintetišu se pomoću terpenске sintetaze, veoma slične molekulske mase, isti položaj reaktivne hidroksilne grupe) bilo je značajno da ispitamo da li karveol deluje na nikotinski receptor *A. suum*. Kao i u prethodnim ispitivanjima, testiran je efekat karveola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ). Kontrolna vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina bila je 15.97  $\mu\text{M}$ , a  $\text{E}_{\text{max}} = 1.38$  g. Nakon toga preparat je inkubiran 5 minuta sa karveolom i posmatran je efekat na koncentracije izazvane istim koncentracijama ACh. U prisustvu karveola vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je smanjena na 6.63  $\mu\text{M}$ , a  $\text{E}_{\text{max}}$  povećana na 1.51 g. Posle ispiranja karveola iz vodenog kupatilca u poslednjoj seriji  $\text{EC}_{50}$  je opala na 6.14  $\mu\text{M}$  sa maksimalnim efektom koji je nastavio da raste do 1.71 g. Statistička analiza je pokazala da 10  $\mu\text{M}$  karveola signifikantno pojačava kontrakcije izazvane sa 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$  ACh. Ovi naši rezultati ukazuju da karveol signifikatno potencira kontrakcije što je kvalitativno potpuno drugačiji nalaz u odnosu na karvakrol. Potenciranje dejstva ACh može da bude posledica direktne ili indirektne interakcije sa nikotinskim receptorom. Indirektno dejstvo je vrlo moguće vezano za uticaj na neke druge jonske kanale, na primer kalcijumske. Ovakvu reakciju su opisali Trailovic i saradnici (2005) koji su efekat ACh potencirali primenom neuropeptida AF2. Kao druga mogućnost, direktno dejstvo karveola je s obzirom na njegovu hemijsku sličnost sa karvakrolom lakše objašnjivo i podrazumevalo bi vezivanje za specifično mesto na nAChR nematoda. To mesto vezivanja je verovatno drugačije od mesta vezivanja karvakrola jer ove dve supstance i pored velike sličnosti izazivaju dijametralno suprotne efekte na istom efektornom organu odnosno mišićnoj ćeliji parazita. Na osnovu hemijske strukturne

razlike karvakrola i karveola, može se zaključiti da konformaciona sloboda molekula karveola - nije prisutna kod karvakrola. Karveol ima veću konformacionu slobodu, ima 2 hiralna centra (C1 i 5), dok karvakrol ni jedan hiralni centar. Ovo predstavlja hipotezu da je potreban planarni molekul fiksne konformacije za efekte koje ispoljava. Sa druge strane, aromatičnost karvakrola sigurno doprinosi većoj interakciji sa ciljnim mestom, za razliku od karveola, budući da su  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -katjon i  $\pi$ -"-steking" interakcije identifikovane da učestvuju u reakcijama vezivanja ligand-receptor.

U svakom slučaju ova interakcija zahteva detaljnija ispitivanja, a sposobnost karveola da pojačava kontraktilni efekt acetilholina može biti iskorišćena u pojačavanju dejstva lekova agonista nikotinskog receptora nematoda (tetarhidropirimidina i imidazotiazola) i neutralisanja rezistencije parazita.

### **Ispitivanje dejstva mentola na neuromišićnom preparatu *A. suum***

Biljni terpenoidi su strukturno raznolika grupa i glavni su sastojci esencijalnih biljnih ulja. Oni se uveliko koriste u medicinske svrhe i kao aditivi u proizvodnji hrane. U ranijim studijama, pokazano je da ciklični monoterpeni poput mentola moduliraju funkcionalne osobine različitih jonskih kanala, uključujući voltažno-zavisne Na<sup>+</sup> kanale, K<sup>+</sup> jonske kanale i voltažno-zavisne Ca<sup>2+</sup> kanale (Amato i sar., 2014). Ispitivanje mentola je započelo izvođenjem kontrolne serije kontrakcija izazvanih acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Dobijene su vrednosti EC<sub>50</sub> od 12.93  $\mu$ M, i E<sub>max</sub> koja je iznosila 1.62 g. Inkubacija preparata sa 100 nM mentola uticala je na smanjenje vrednosti EC<sub>50</sub> ACh na 10.82  $\mu$ M sa povećanjem vrednosti E<sub>max</sub> na 1.90 g. U kontroli nakon ispiranja mentola, EC<sub>50</sub> se smanjila na 8.68  $\mu$ M dok se E<sub>max</sub> još malo povećao na 1.98 g. Statistička analiza je pokazala da mentol visoko signifikantno stimuliše kontrakcije izazvane svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh (\*\**p*=0.001, \*\*\**p*=0.0007, \*\*\**p*=0.0003, \*\*\*\**p*<0.0001, \*\*\*\**p*<0.0001) i da taj njegov efekat ostaje posle ispiranja inkubirajuće tečnosti. Poređenjem sa kontrolnim kontrakcijama posle ispiranja visoka signifikantnost je izražena počev od 10-100  $\mu$ M ACh (\*\*\**p*=0.001, \*\*\*\**p*<0.0001, \*\*\*\**p*<0.0001). Publikovani rezultati nedvosmisleno pokazuju da mentol u primenjenoj koncentraciji od 100 nM ispoljava potencirajući agonistički efekat na kontrakcije izazvane acetilholinom na neuromišićnom preparatu

*A.suum.* Takođe, mora se napomenuti da mentol u primenjenoj koncentraciji samostalno nije dovodio do kontrakcija, tako da se ovde radi o alosteričnom dejstvu na nikotinski acetilholinski receptor nematoda. Dobijeni rezultati kandiduju mentol za sinergistu u kombinaciji sa lekovima agonistima nikotinskog acetilholinskog receptora nematoda.

*Ispitivanje mehanizma delovanja i međusobne interakcije između mentola i monepantela na neuromišićnom preparatu A. suum*

Na osnovu do sada objavljenih rezultata ispitivanja, za monepantel se pretpostavlja da je alosterični nekompetitivni antagonista nikotinskog receptora nematoda. Sa druge strane mentol je ispoljio potencirajući efekat na kontrakcije u čijoj osnovi verovatno leži alosterična modulacija nikotinskog acetilholinskog receptora. U našem publikovanom istraživanju (Abongwa i sar., 2018) monepantel je u koncentracijama 1 i 3  $\mu\text{M}$  izazvao dozno-zavisno smanjenje maksimalnih kontrakcija sa povećanjem vrednosti  $EC_{50}$  ACh. Kao i kod mnogih drugih farmakološki aktivnih supstanci nalazimo da je način delovanja monepantela kompleksan i da je lek aktivan na više nAChR podtipova (Abongwa i sar., 2018). Sa druge strane mentol 100 nM potencira efekat ACh, smanjujući njegovu  $EC_{50}$  i povećavajući vrednosti maksimalne kontrakcije ( $E_{\text{max}}$ ).

Da bi detaljnije ispitali efekte ove dve supstance imali smo mogućnost da testiramo njihovu interakciju na neuromišićnom preparatu *A.suum.* Kontrakcije smo izazvali rastućim koncentracijama ACh i dobili  $EC_{50}=15.86 \mu\text{M}$  i maksimalni efekat kontrakcije  $E_{\text{max}}=2.12 \text{ g}$ . Zatim smo preparate inkubirali sa 100 nM mentola 5 minuta kada je vrednost  $EC_{50}$  acetilholina smanjena na 12.71  $\mu\text{M}$ , a maksimalni efekat povećan na 2.42 g. U sledećoj seriji izvršena je inkubacija sa 1  $\mu\text{M}$  monepantela i vrednost  $EC_{50}$  dobijena na taj način iznosila je 20.57  $\mu\text{M}$ , dok je maksimalni efekat smanjen na 1.53 g. Posle ispiranja monepantela srednja efektivna koncentracija ACh i maksimalni efekat su skoro potpuno dostigli kontrolnu vrednost ( $EC_{50}=16.09 \mu\text{M}$ ,  $E_{\text{max}} = 2.20 \text{ g}$ ).

U našem ispitivanju ispoljena su dva potpuno različita efekta na istom neuromišićnom preparatu, potencirajući mentola i inhibitorni monepantela. O mehanizmu dejstva monepantela smo već prethodno diskutovali, dok je za dalju analizu potencirajućeg efekta mentola potrebno sprovesti ispitivanje njegove interakcije sa agonistima različitih tipova nikotinskog acetilholinskog receptora nematoda. Međutim,

naša ispitivanja svakako ukazuju na vrlo efikasnu interakciju mentola sa agonistima nikotinskog receptora i monepantela sa antagonistima nikotinskog receptora, što predstavlja potencijalno značajnu platformu za razvoj novih kombinovanih terapija parazitskih infekcija.

### **Ispitivanje stepena preživljavanja adultnih oblika *Caenorhabditis elegans* u prisustvu timola i karvakrola**

Neparazitski alternativni model za istraživanja *C. elegans* je slobodnoživeća nematoda koja se u prirodi nalazi u gornjim slojevima zemljišta, a može da se uzgaja i u posebnim laboratorijskim uslovima (Marsh i May, 2012). U populaciji ove nematode dominiraju samooplodni hermafroditi sa retkom pojavom mužjaka koji imaju specifične morfološke karakteristike. Pomenute nematode su prvi put usvojene kao laboratorijski model od strane Sydney Brenner-a pre više od 40 godina, što je rezultiralo dobijanjem Nobelove nagrade za fiziologiju/medicinu 2002. godine. Svakako se mora pomenuti da je u ovom delu Evrope, prvi put u Laboratoriji za Farmakodinamiku korišćen *C. elegans* kao alternativni model za istraživanja potencijalno novih antihelminatika. U međuvremenu, *C. elegans* se počeo koristiti kao model za proučavanje širokog spektra bioloških fenomena, dok je u ovoj disertaciji korišćen da se ispita antinematodni efekat odabranih aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja. Mnogi autori navode da postoje sličnosti i razlike između parazitskih i neparazitskih nematoda u strukturi i građi nikotinskog i GABA receptora. Za ovo ispitivanje bilo je posebno značajno da se ispita efekat odabranih supstanci koje deluju na različite tipove nikotinskog acetilholinskog receptora. Naime, kod velike nematode svinja, *A. suum*, dokazana su tri tipa nAChR na membrani mišićne ćelije: L-tip, N-tip i B-tip. Na osnovu publikovanih rezultata očigledno je da kod parazitskih nematoda, u pogledu farmakoloških karakteristika, postoji manja razlika između različitih tipova nikotinskog receptora, nego kod slobodnoživeće nematode *C. elegans* (Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b). Nematodni nAChR, naročito oni koje se nalaze na neuromišićnoj sinapsi, su važno mesto delovanja antihelminatika poput levamizola, pirantela, tribendimidina, monepantela i derkvantela (Wolstenholme, 2011). Na osnovu naših prethodnih rezultata koji pokazuju da terpenoidi deluju preko nikotinskog receptora, ispitivali smo



stepen preživljavanja adultnih oblika ove nematode nakon inkubacije sa rastućim koncentracijama terpenoida nakon 24 h i 48 h. Analiza stepena preživljavanja *C. elegans* je ključna za proučavanje fizioloških procesa poput starenja, imuniteta i otpornosti na stres (Park i sar., 2017). Većina ispitivanja preživljavanja *C. elegans* traje relativno kratko vreme, tako na primer test otpornosti traje svega nekoliko dana, dok najduže traju testovi starenja i do nekoliko nedelja (Amrit i sar., 2014). Mi smo se opredelili da u ovom ispitivanju testiramo efekte timola i karvakrola. U našem istraživanju timol je ispoljio dozno i vremenski zavisani letalni efekat za odrasle oblike *C. elegans*. U čvrstim podlogama sa adultnim oblicima *C. elegans* inkubiranih sa timolom vrednost srednje letalne koncentracije (LC<sub>50</sub>) iznosila je 117.9 nM timola nakon 24 h od zasejavanja (95% interval pouzdanosti iznosio je 114.0-121.9 nM) (Marjanović i sar., 2018). U ovom istraživanju posebno smo pratili efekat timola na faringelno pumpanje. Dobijeni rezultati pokazuju da je mehanizam faringelanog pumpanja u potpunosti bio zaustavljen posle 48 sati inkubacije sa timolom. U kontrolnim netretiranim pločama preživljavanje *C. elegans* iznosilo je 100%. U literaturi postoje podaci o antihelmintičkom efektu timola kod ovaca posle primene doze od 250 mg/kg. Uzorci fecesa za analizu su prikupljeni direktno iz rektuma životinja 0, 7 i 14 dana od aplikacije. Pre samog tretmana, a na početku oglada larve su utvrđene u fekalnim uzorcima ovaca i identifikovane kao *Haemonchus spp.* (90%), *Trichostrongilus spp.* (7%) i *Oesophagostomum spp.* (3%). Timol je u ovom ispitivanju smanjio broj izlučenih jaja helminata po gramu fecesa za 59.8% (André i sar., 2017).

U daljem toku istraživanja testiran je uticaj karvakrola na preživljavanje *C. elegans*. Naime, u ovom delu ispitivanja karvakrol je pokazao veću antinematodnu efikasnost nego timol. Vrednost LC<sub>50</sub> karvakrola za adultne oblike *C. elegans*, nakon 24 sata inkubacije iznosila 53.03 nM (95% interval pouzdanosti od 53.65 do 60.61 nM), dok je posle 48 sati inkubacije njegov LC<sub>50</sub> iznosio 33.83 nM (95% interval pouzdanosti 32.09 do 35.66 nM) (Marjanović i sar., 2018). Uginuća *C. elegans* nisu zabeležena u kontrolnim Petri šoljama. Analizirajući hranjive podloge tretiranih nematoda u periodu između 24 i 48 sati, zapaženo je da se faringealno pumpanje *C. elegans* usporava i postepeno zaustavlja. Ovakvi naši rezultati su u saglasnosti sa podacima Lei i saradnika (2010) koji su ispitivali doznu i vremensku zavisnost nematocidnog efekta karvakrola i

timola, i dokazali da pomenute supstance u primenjenoj koncentraciji od 670  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) dovode do mortaliteta 99 % do 100 % ispitivane populacije *C. elegans*.

Dobijeni rezultati ukazuju da nematocidni efekat karvakrola nastaje zbog interakcije sa nikotinskim acetilholinskim receptorom (nAChR) koji se nalazi u neuromišićnom sistemu nematoda. Pokazano je da se karvakrol ponaša kao nAChR antagonista na nervnomišićnim preparatima *Ascaris suum* (Trailović i sar., 2015). Ovaj efekat bi bio objašnjenje za prestanak motiliteta koji se uočava kod *C. elegans* nakon što biva izložen dejstvu karvakrola. S druge strane, u periodu između 24 i 48 časa inkubacije sa karvakrolom faringealno pumpanje se usporava i zaustavlja pre samog prestanka kretanja nematoda. Postoji mogućnost da karvakrol deluje preko jedne vrste nAChR pod nazivom ACR-16, koji je većinom smeštena i aktivna u farinksu nematode. Postojanje ovog homomernog receptora je dokazano (Abongwa i sar., 2018), ali precizna uloga u kontrakcijama farinksa još uvek nije do kraja ispitana.

Naši rezultati u istraživanjima na *C. elegans*, ukazuju na jasnu doznu i vremensku zavisnost antinematodnog efekta timola i karvakrola. Međutim, za kliničku primenu aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja, neophodno je ispitati delotvornost njihovih mikroinkapsuliranih formulacija. Kontrolisano oslobađanje aktivnih sastojaka koji vode poreklo iz biljaka, u pojedinim delovima gastrointestinalnog sistema domaćina omogućilo bi ciljanu primenu većih efektivnih koncentracija, dosta izraženiji antinematodni efekat koji bi isključio potrebu za povećanjem primenjene doze u terapiji parazitskih infekcija.

### **Ispitivanje uticaja terpenoida na kontrakcije dijafragme pacova metodom električne poljne stimulacije (EFS)**

#### ***Ispitivanje uticaja karvakrola na kontrakcije dijafragme izazvane EFS***

Da bi se potvrdila selektivnost dejstva karvakrola kao potencijalnog antihelmintika, ispitani su njegovi efekti na kontrakcije dijafragme pacova izazvane EFS. Osnovni princip na osnovu koga se zasniva primena antiparazitskih lekova jeste njihova selektivna toksičnost, gde oni ispoljavaju letalno dejstvo za parazite, a pri tome ne deluju na domaćine. Većina antiparazitskih lekova fiziološki ne prolazi krvno-moždanu barijeru u organizmu sisara i ne ulazi u CNS. U literaturi se navodi da se

agonisti nikotinskog receptora nematoda vezuju za nikotinski receptor na motornoj ploči sisara, gde se kao jedan od najvažnijih neželjenih efekata ispoljava upravo poremećaj kretanja, ataksija, tremor, otežano disanje, poremećaj ritma srčanog rada, zastoj srca i dr. (Adams, 2001). Da bi ispitali uticaj karvakrola na nikotinski receptor na motornoj ploči koristili smo model stimulacija neuromišićnog preparata dijafragme pacova. Metoda EFS (električne poljne stimulacije) omogućava stimulaciju neuromišićnog preparata, pri čemu električno polje određenih parametara dovodi do oslobađanja ACh iz holinergičkih nervnih završetaka na motornoj ploči, njegovo vezivanje za postsinaptički nAChR i kontrakcije izolovane dijafragme. Metoda je detaljno opisana za sisarske preparate (Seeger i sar., 2007; Trailović i sar., 2011). Ovakve kontrakcije često se nazivaju i indirektne jer nastaju kao posledica oslobađanja ACh u sinaptičku pukotinu na motornoj ploči. Direktno izazvane kontrakcije nastaju kao posledica dejstva električnog polja na kontraktilnu mašinu (aktin/miozin struktura) i neosetljive su na dejstvo antagonista nikotinskog receptora. U ovom istraživanju ispitan je uticaj rastućih koncentracija karvakrola na indirektne kontrakcije izolovane dijafragme izazvane konstantnim parametrima električnog polja (EFS u paketima po 5 kontrakcija na svakih 30 sekundi, širina impulsa 10  $\mu$ s; frekvencija 50 Hz; napon 30 V; trajanje impulsa 2 s, sa pauzom od 5 minuta između paketa). Preparat je inkubiran u rastućim koncentracijama karvakrola, zatim stimulisan sa EFS. Posle svakog paketa kontrakcija testirana koncentracija je ispirana i preparat je inkubiran u narednoj višoj koncentraciji. Na kraju serije testiran je efekat 100  $\mu$ M mekamilamina koji je dokazani antagonist različitih tipova nikotinskog receptora sisara. U literaturi se navodi da je mekamilamin antagonist različitih tipova nikotinskog receptora sisara, koje blokira kompetitivnim ili nekompetitivnim mehanizmom (Papke i sar., 2001). Testiranje je otpočelo kontrolnom serijom kontrakcija sa EFS, a zatim je izvršena inkubacija sa različitim koncentracijama karvakrola u trajanju od 5 minuta i posmatrane su kontrakcije sa istim parametrima polja kao i kontrolna serija.

Testirane koncentracije karvakrola od 10-300  $\mu$ M nisu signifikantno uticale na kontrakcije dijafragme izazvane sa EFS što je ukazalo na izostajanje interakcije sa postsinaptičkim nAChR na motornoj ploči. Pored posmatranja uticaja na ukupan intenzitet kontrakcija za nas je bilo interesantno da proverimo i potencijalnu interakciju karvakrola sa presinaptičkim receptorima. Kod vertebrata postoje dva glavna tipa

nAChR: neuromišićni i neuronski tip. **Neuronski tip** nikotinskog receptora nalazi se u CNS i autonomnim ganglijama. Sa druge strane opisano je da je **mišićni tip** receptora lokalizovan na neuromišićnim sinapsama skeletnih mišića i stimulacijom ovih receptora dolazi do mišićne kontrakcije. Na postsinaptičkoj mišićnoj membrani identifikovana su tri podtipa nAChR: fetalni mišićni –  $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ , adultni mišićni –  $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$  i neuronski –  $\alpha 7$  subtip nAChR (Trailović i sar., 2011). Pored klasičnog mišićnog tipa nAChR koji sadrži  $\alpha 1$  subjedinicu, neuromišićna sinapsa sadrži presinaptički  $\alpha 2\beta 3$  neuronski tip nAChR. Ovaj tip receptora je odgovoran za pojačano oslobađanje ACh (autoreceptori). To znači da ACh aktivacijom ovih autoreceptora može pojačati svoje sopstveno oslobađanje (presinaptička modulacija, odnosno autoregulacija). Kada izostane ovaj efekat tokom neuromišićne blokade (pojava se označava kao tetanično slabljenje - engl. „*tetanic fade*“), smatra se da je to posledica inhibicije navedenog presinaptičkog autoreceptora na nervnom završetku (Trailović i sar., 2011). U našem ispitivanju mekamilamin je pored signifikantne inhibicije kontrakcija izazvanih sa EFS izazvao i tetanično slabljenje. Ovi podaci su u saglasnosti sa istraživanjima Trailović i saradnika (2011) koji navode da mekamilamin primenjen u koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$ , inhibira 2/3 maksimalnih kontrakcija dijafragme sisara, izazvane električnom poljnom stimulacijom (EFS – *Electrical Field Stimulation*), i istovremeno ispoljava i snažno tetanično slabljenje (*tetanic fade*). Ovakav efekat mekamilamina je posledica njegove sposobnosti da blokira i neuronski i mišićni tip nikotinskog receptora sisara. U našem ispitivanju je slične karakteristike mekamilaminu u odnosu na tetanično slabljenje izazvalo 100 i 300  $\mu\text{M}$  karvakrola. Ove koncentracije nisu uticale na ukupne kontrakcije izolovane dijafragme, ali su očigledno izazvale tetanično slabljenje što ukazuje na potencijalnu interakciju sa neuronskim tipom nikotinskog receptora. Mada je u našim ispitivanjima karvakrol ispoljio nematocidni efekat u koncentracijama od oko 50 nM protiv *C. elegans*, Abdel-Rahman i sar. (2013) su publikovali da karvakrol svoju nematocidnu aktivnost protiv parazitskih nematoda ispoljava u koncentraciji od 0.67  $\mu\text{M}$ . Činjenica da karvakrol deluje na centralne neuronske nikotinske receptore morala je biti detaljnije ispitana. Jos jedan nalaz koji nismo prethodno spomenuli odnosi se na činjenicu da je 300  $\mu\text{M}$  karvakrola dovelo do povećanja bazalnog tonusa preparata koji se normalizovao odmah posle ispiranja preparata dijafragme.

***Ispitivanje uticaja karveola na kontrakcije dijafragme pacova izazvane EFS***

U prethodnom ispitivanju prikazan je mehanizam dejstva karveola koji je pokazao potencirajući efekat na kontrakcije izazvane ACh na neuromišićnom preparatu parazitske nematode *A. suum*. Sledeći korak u testiranju ove supstance bio je da se ispita selektivnost dejstva karveola na nikotinski receptor na modelu kontrakcija dijafragme primenom metode električne poljne stimulacije. Kao i u prethodnom ispitivanju sa karvakrolom, i ovde je testiran efekat rastućih koncentracija karveola na kontrakcije dijafragme sa EFS (10, 30, 100, 300 i 1000  $\mu$ M). Na kraju serije kontrakcija preparat je inkubiran sa mekamilaminom u koncentraciji od 100  $\mu$ M. Parametri stimulacije su bili kao i u ispitivanju karvakrola (EFS u paketima po 5 kontrakcija na svakih 30 sekundi, širina impulsa 10  $\mu$ s; frekvencija 50 Hz; napon 30 V; trajanje impulsa 2 s, sa pauzom od 5 minuta između paketa). Prvo je urađena kontrolna serija, a zatim serije kontrakcija posle inkubacije sa ispitivanim rastućim koncentracijama karveola. Karveol nije imao signifikantnog uticaja na amplitudu kontrakcije dijafragme. Izostanak pojave tetaničnog slabljenja ukazuje na različit mehanizam dejstva na nikotinski receptor u odnosu na karvakrol. Rezultati ukazuju na izostajanje interakcije sa neuronskim nikotinskim receptorom kod sisara. Mekamilamin je kao i u prethodnom ispitivanju signifikantno smanjio amplitudu kontrakcije i doveo do tetaničnog slabljenja.

***Ispitivanje uticaja karvakrola i monepantela na kontrakcije dijafragme izazvane EFS***

U našim prethodno opisanim istraživanjima više koncentracije karvakrola dovode do povećanja bazalnog tonusa, a da pri tome ne utiču na amplitudu kontrakcija izazvanih sa EFS. U ovom delu istraživanja ispitali smo efekte 100  $\mu$ M karvakrola i 1  $\mu$ M monepantela na kontrakcije dijafragme pacova izazvane sa EFS. Posle kontrolne serije kontrakcija izazvanih paketom EFS (paket po 5 kontrakcija na svakih 30 sekundi, širina impulsa 10  $\mu$ s; frekvencija 50 Hz; napon 30 V; trajanje impulsa 2 s, sa pauzom od 5 minuta između paketa) preparate izolovane dijafragme smo inkubirali sa 100  $\mu$ M karvakrola i kao u prethodnom delu istraživanja primetili povećanje bazalnog tonusa

bez pojave tetaničnog slabljenja. Nakon toga aplikovan je monepantel i preparat je inkubiran 5 minuta, kada osim normalizacije bazalnog tonusa drugih promena u parametrima kontrakcija nije bilo. Međutim, kada smo preparat inkubirali istovremeno sa 100  $\mu\text{M}$  karvakrola i 1  $\mu\text{M}$  monepantela povećanje bazalnog tonusa je izostalo, a amplituda kontrakcija ostala je nepromenjena u odnosu na kontrolu. Ovakvi naši rezultati ukazuju na činjenicu da je regulacija bazalnog tonusa vezana za neki drugi receptorski sistem ili jonske kanale na koje očigledno i monepantel i karvakrol deluju, a koji nisu pod regulacijom mišićnog nikotinskog acetilholinskog receptora.

### **Ispitivanje uticaja karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova**

U cilju ispitivanja potencijalnih neželjenih efekata odabranih terpenoida na organizam sisara testirali smo efekte karveola na izolovanom ileumu pacova. Izolovani ileum pacova je model za ispitivanje uticaja različitih agenasa na motilitet creva. Fiziološke karakteristike nervnih struktura gastrointestinalnog sistema sisara dobro su poznate. Često se ova struktura naziva enteralni nervni sistem i sastoji se od visoko organizovane grupacije neurona koja se opisuje kao treći deo autonomnog nervnog sistema. Naime, enteralni nervni sistem se čine: Mienterični pleksus (*Auerbachov pleksus*) i Submukozni pleksus (*Meisnerov pleksus*). Neuroni ovog sistema primaju preganglijska vlakna parasimpatikusa i postganglijska vlakna simpatikusa. Senzorna vlakna potiču iz samog zida creva. Smatra se da parasimpatički i simpatički sistem imaju samo regulatorno dejstvo na enteralne pleksuse. Ovakav stav se opravdava činjenicom da u slučaju potpunog isključivanja ove dve strukture nema remećenja fiziološke funkcije creva. Dokazano je da se u crevu nalazi veliki broj biološki aktivnih supstanci koje vrše transmittersku ili imaju modulatornu ulogu u njihovoj funkciji. Veliki broj lekova i drugih supstanci koje deluju na crevne transmitere (serotonin, supstanca-P, vazointestinalni peptid-VIP, azotni oksid, ACh, kateholamini, i sl.), istovremeno menjaju i funkciju gastrointestinalnog sistema (Katzung i sar., 2011).

U narednom ispitivanju korišćen je karveol za koga smo prethodno dokazali da na neuromišićnim preparatima nematode potencira kontrakcije. Sa druge strane, na preparatima dijafragme pacova karveol nije imao uticaja na kontrakcije.

***Ispitivanje efekta karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvanih acetilholinom***

Kontrolna serija kontrakcija ileuma izazvana rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100  $\mu\text{M}$ ), pokazala je da neuromišićni preparat ileuma odgovara dozno-zavisnim kontrakcijama i da je  $\text{EC}_{50}$  ACh iznosi 10.44  $\mu\text{M}$ , a  $E_{\text{max}}$  3.09 g. Inkubacija preparata ileuma sa 100  $\mu\text{M}$  karveola imala je za posledicu smanjenje  $\text{EC}_{50}$  na 4.56  $\mu\text{M}$ , ali i smanjenje maksimalnog efekta na 2.37 g. Posle ispiranja karveola  $\text{EC}_{50}$  ACh je nastavio da opada i dalje je bio niži od kontrolne vrednosti, odnosno 3.95  $\mu\text{M}$ , ali je maksimalni efekat dostigao kontrolnu vrednost ( $E_{\text{max}}=3.15$  g). Statističkom analizom maksimalne amplitude kontrakcija pre i posle inkubacije sa karveolom dolazi se do podatka da karveol ne izaziva signifikantne promene ove vrednosti jer u testu poređenja srednjih vrednosti kontrakcija u ANOVA testu, nisu uočene statistički značajne razlike (interval pouzdanosti testa 95%,  $p<0.05$ ). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je karveol bezbedan za primenu jer u primenjenoj koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  nije pokazao signifikantan inhibirajući efekat na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastućim koncentracijama acetilholina.

***Ispitivanje efekta karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvanih električnom poljnom stimulacijom EFS***

EFS izaziva kontrakcije ileuma oslobađanjem ACh u mienteričnom pleksusu creva koji se nalazi između uzdužnih i kružnih mišićnih slojeva gastrointestinalnog sistema pacova. Za nas je bilo značajno da ispitamo uticaj karveola na kontrakcije koje nastaju pod dejstvom električnog polja određenih parametara koji oslobađaju ACh i na taj način dovode do kontrakcija glatke muskulature. Ispitivanje smo započinjali kontrolnom serijom kontrakcija i uvek smo koristili iste parametre stimulacije (EFS u paketima po 5 kontrakcija na svakih 60 sekundi, širina impulsa 2  $\mu\text{s}$ ; frekvenca 100 Hz; napon 45 V; trajanje impulsa 2 s, sa pauzom od 5 minuta između paketa). Posle početne kontrolne serije preparat je inkubiran sa 100  $\mu\text{M}$  karveola i ponovo stimulisan istim paketom. Na kraju je karveol ispiran i urađena je kontrolna serija kontrakcija.

Rezultati ANOVA testa u kome su poređene srednje vrednosti kontrakcija pokazuju da je karveol u koncentraciji od 100  $\mu$ M signifikantno smanjio maksimalni efekat kontrakcije izazvanih sa EFS u odnosu na kontrolne kontrakcije. Na osnovu pojave da se preparat ileuma u potpunosti oporavlja nakon ispiranja karveola, pretpostavljamo da ne postoji bilo kakav rezidualni ili ireverzibilni efekat. Mehanizam kojim karveol inhibiše kontrakcije ileuma pod dejstvom EFS zahteva detaljniju analizu uticaja ove supstance na muskarinske strukture u samom zidu creva.

### **Ispitivanje dejstva karvakrola na nervni sistem pacova izvođenjem Rota-rod testa**

Dunham i Miya (1957) su prvi put opisali Rota-rod test, koji je jedan od standardnih testova za procenu efekata leka (ili neke druge supstance) na nervni sistem pacova ili miševa. Rota-rod test se često koristi u ranim fazama razvoja lekova (Stemmelin i sar., 2008). Pomenuti test pruža brzu i jednostavnu prvu procenu da li ispitivana supstanca u terapijskim dozama ima bilo kakav uticaj na neuromišićnu koordinaciju kod ispitivanih životinja. U humanoj medicini komparativno ispitivanje Rota-rod testu je metod pokretne trake (engl. treadmill). Aparat za Rota rod se sastoji od kružnog valjka koji se okreće konstantnom ili relativno velikom brzinom (Bohlen i sar., 2008). Pojedini lekovi za koje je poznato da deluju na neuromuskularnu koordinaciju, poput benzodiazepina, smanjuju vreme održavanja životinje na rotirajućem valjku ili potpuno onemogućavaju životinje da izdrže Rota rod test (Rustay i sar., 2003). Najčešće se u testu procenjuju ukupno 4 različite doze ispitivane supstance, koje se aplikuju 60 minuta pre testa i diazepam koji se najčešće koristi kao referentna supstanca (Castagné i sar., 2009). Potencijalna neurotoksičnost ispitivane aplikovane supstance procenjuje se na osnovu sposobnosti životinje da se održe na rotirajućem valjku (Williams i Porsolt, 2007). U našem istraživanju koristili smo brzinu rotirajućeg valjka od 15 obrtaja u minuti (RPM) u toku 5 minuta trajanja testa. Pacovi na kojima je test obavljen prethodno su sedam dana trenirani na rota rod aparatu primenom gore navedenih parametara rotacije. Prva eksperimentalna grupa je na dan izvođenja testiranja dobila 200 mg/kg karvakrola peroralno, druga grupa 300 mg/kg karvakrola peroralno, treća grupa 400 mg/kg karvakrola peroralno, četvrta grupa je dobila 500 mg/kg karvakrola



peroralno, peta grupa je dobila 3 mg/kg diazepama intraperitonealno, dok je šesta grupa bila kontrolna. Karvakrol je aplikovan želudačnom sondom.

Dobijeni rezultati ispitivanja nesumnjivo ukazuju da karvakrol dozno-zavisno utiče na neuromišićnu koordinaciju pacova, ali samo 90 minuta nakon aplikacije. Posle 30 minuta karvakrol ne utiče na motornu koordinaciju tretiranih pacova. Srednja efektivna doza karvakrola koja remeti motornu koordinaciju pacova posle 90 minuta od njegove aplikacije iznosi 421.6 mg/kg. Kod tretiranih pacova nije bilo vidljivih simptoma depresije CNS-a niti bilo kakvih promena u spontanom kretanju na ravnoj podlozi. Dobijeni rezultati pokazuju da karvakrol narušava neuromišićnu koordinaciju nakon aplikacije veoma visokih doza, bez vidljive kliničke depresije CNS. Poremećaj koordinacije je očigledno posledica centralnih efekata karvakrola, jer ovaj monoterpenoid, na osnovu naših rezultata ne deluje na nAChR na motornoj ploči. Diazepam je u našem ispitivanju bio pozitivna kontrola. U literaturi se navode brojni efekti diazepama, a neki od njih su depresija CNS i mišićna relaksacija. Podaci o mehanizmu dejstva diazepama sugerišu da efekat ostvaruje povećanjem propustljivosti na membrani neurona za hloridne jone vezivanjem za stereo-specifične benzodiazepinske receptore na postsinaptičkom GABA neuronu unutar CNS. Diazepam pojačavajući inhibitorne efekte GABA dovodi do hiperpolarizacije i stabilizacije membrana nervnih ćelija. Diazepam značajno smanjuje vreme održavanja pacova na rotirajućem valjku i značajno produžava trajanje nepokretnosti pacova (Morimoto i Kito, 1994). Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodno citiranim rezultatima, jer je 30 minuta nakon intraperitonealne aplikacije diazepam izazvao padanje sa rotirajućeg valjka kod 50% tretiranih životinja.

## 7. Zaključci

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su mehanizmi antiparazitskog i toksičnog dejstva odabranih, potencijalno novih antihelminatika iz grupe terpenoidnih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja. Upoznavanje sa njihovim mehanizmima delovanja značajno će doprineti sprovođenju racionalne antiparazitske farmakoterapije i omogućiti uvođenje novih supstanci u terapiju nematodnih infekcija životinja i ljudi.

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata u istraživanjima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Terpenoidi alfa-pinen, p-cimen, kahveol, karnozol i cinamaldehyd ne ispoljavaju nikakve farmakološke efekte na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*.
2. Monoterpenoid karvakrol pokazuje osobine kompetitivnog/nekompetitivnog antagoniste nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) *Ascaris suum* i efikasno i signifikantno inhibira kontrakcije neuromišićnog preparata izazvane rastućim koncentracijama acetilholina.
  - 100  $\mu\text{M}$  karvakrola ne menja vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina ali smanjuje maksimalni kontraktilni efekat ( $\text{E}_{\text{max}}$ ) sa kontrolnih 2.53 g na 2.20 g.
  - 300  $\mu\text{M}$  karvakrola vrednosti  $\text{EC}_{50}$  acetilholina povećava tri puta (sa 8.87 na 27.71  $\mu\text{M}$  a  $\text{E}_{\text{max}}$  smanjuje sa 2.53 na 1.63 g.
  - Jedan deo inhibitornog dejstva karvakrol verovatno ostvaruje vezujući se za mesto na nAChR receptoru koje je različito od mesta vezivanja ACh.
3. Tiramin u koncentraciji od 300  $\mu\text{M}$  ne utiče na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom. Sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta ACh bez i u prisustvu tiramina su skoro potpuno poklopljene što ukazuje da tiramin (i tiraminski receptor) nema uticaja na lokomotorne funkcije *A. suum*.
4. Karvakrol potencira inhibitorne efekte GABA na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Ovde se radi o sinergističkom inhibitornom dejstvu GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane acetilholinom.

-Karvakrol (100  $\mu\text{M}$ ) i GABA (3  $\mu\text{M}$ ) nisu ispoljili isključivo efekte kompetivnog odnosno nekompetivnog antagoniste. Verovatno da kod nematoda zbog specifične uloge inhibitornih i ekscitatornih interneurona i aktivacije/inhibicije motoneurona postoji kombinovani antagonistički efekat, zavisno da li su u reakciju uključeni sinaptički ili ekstrasinaptičku nACh i GABA receptori.

**5.** Dejstvo piperazina i karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane acetilholinom je sinergističko:

-300  $\mu\text{M}$  piperazina je vrednosti  $\text{EC}_{50}$  acetilholina povećala sa kontrolnih 11.75  $\mu\text{M}$  na 13.24  $\mu\text{M}$  a maksimalni efekat ( $E_{\text{max}}$ ) smanjila sa kontrolnih 2.88 na 2.31g.

-Piperazin je za razliku od GABA ispoljio isključivo nekompetitivni antagonizam u odnosu na kontraktilni efekat ACh. Ovo je posledica činjenice da piperazin deluje samo na ekstrasinaptičke GABA receptore, dok efekat na inhibitorne interneurone izostaje, a samim tim i kompetitivna komponenta antagonizma.

-Karvakrol signifikantno potencira inhibitorne efekte piperazina što ukazuje na mogućnost primene ove kombinacije u terapijske svrhe.

**6.** U ispitivanju dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih pirantelom, morantelom i befinijumom (agonistima različitih tipova nAChR nematoda), karvakrol i GABA su ispoljili sinergističko inhibitorno dejstvo:

-100  $\mu\text{M}$  karvakrola je smanjio  $E_{\text{max}}$  pirantela za 29 %, morantela za 39 % i befinijuma za 12%.  $\text{EC}_{50}$  pirantela se povećala sa 4.97 na 17.05 nM (3.4 puta), morantela sa 7.59 na 22.45 nM (2.9 puta) i befinijuma sa 0.36 na 0.89  $\mu\text{M}$  (2.5 puta).

- 300  $\mu\text{M}$  karvakrola smanjilo je  $E_{\text{max}}$  pirantela za 71 %, morantela za 80 % i befinijuma za 75 %. Sa druge strane karvakrol je povećao vrednost  $\text{EC}_{50}$  pirantela 3.9 puta, morantela 3.2 puta i befinijuma 4.8 puta.

- Istovremenom inkubacijom 3  $\mu\text{M}$  GABA i 100  $\mu\text{M}$  karvakrola vrednost  $\text{EC}_{50}$  pirantela povećana je više od 5.3 puta, a  $R_{\text{max}}$  smanjen za 69%.  $\text{EC}_{50}$  za morantel povećana je 2.1 puta, sa smanjenjem  $R_{\text{max}}$  66%.  $\text{EC}_{50}$  za befinijum povećana je 2.3 puta, uz smanjenje  $R_{\text{max}}$  za 60%.

-GABA je u relativno niskoj koncentraciji potencirala pre svega nekompetitivnu komponentu antagonističkog dejstva karvakrola, što ukazuje da lekovi agonisti nACh receptora parazitskih nematoda deluju pre svega ekstrasinaptički, upravo tamo gde je dokazano prisustvo različitih tipova ovog receptora. Sa druge strane karvakrol je sam po sebi ispoljio najsnažniji inhibitorini efekt na kontrakcije izazvane morantelom, što ukazuje na potencijalno poseban tip nAChR na koji deluje morantel.

-Sinergistički efekat karvakrola i GABA je vrlo sličan sinergističkom efektu derkvantela i abamektina, što direktno može biti iskorišćeno u farmakoterapiji parazitskih infekcija životinja i ljudi.

**7.** Ispitivanja mehanizma dejstva monepantela (derivat aminoacidonitrila) na neuromišićnom preparatu *A. suum* pokazala su da:

-Monepantel 1  $\mu\text{M}$  dovodi do povećanja  $\text{EC}_{50}$  acetilholina za 1.58 puta bez promene  $E_{\text{max}}$  što ukazuje na kompetitivni antagonizam koji on ispoljava u odnosu na ACh.

-Tri puta viša koncentracija monepantela (3  $\mu\text{M}$ ) je vrednost  $\text{EC}_{50}$  acetilholina povećala 2.15 puta, a  $E_{\text{max}}$  smanjila za 25 %, što ukazuje na nekompetitivni antagonizam.

-Posle inkubacije sa 10  $\mu\text{M}$  monepantela,  $\text{EC}_{50}$  acetilholina je porasla za 4.31 puta, dok je  $E_{\text{max}}$  smanjen za 41 %.

-Inkubacija sa 30  $\mu\text{M}$  monepantela nije značajnije promenila  $\text{EC}_{50}$  acetilholina u odnosu na prethodnu seriju, ali je smanjila  $E_{\text{max}}$  za 78%.

-Monepantel ispoljava karakteristike kompetitivnog i nekompetitivnog antagoniste nAChR, što ukazuje na multipla mesta delovanja i heterogenu populaciju nikotinskog receptora u neuromišićnom sistemu parazitskih nematoda.

**8.** Kombinacija karvakrola (100  $\mu\text{M}$ ) i monepantela (1  $\mu\text{M}$ ) ispoljava sinergističko inhibitorno dejstvo na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, pa je  $\text{EC}_{50}$  acetilholina porasla tri puta, a maksimalni kontraktilni efekat je smanjen za 50 %. Sami po sebi karvakrol i monepantel u primenjenim koncentracijama nisu signifikantno inhibirali kontrakcije izazvane sa ACh, međutim njihova kombinacija je ispoljila visoko signifikantan inhibitorni efekat. S obzirom na sve

veći nivo rezistencije na monepantel ova kombinacija bi pouzdano mogla da pojača njegovo antinematodno dejstvo i spreči razvoj rezistencije.

**9.** Ispitivanje mehanizma dejstva karveola na neuromišićnom preparatu *A. suum* pokazalo je sledeće:

-10  $\mu$ M karveola signifikantno pojačava kontrakcije neuromišićnog preparata izazvane acetilholinom, direktnom ili indirektnom interakcijom sa nikotinskim receptorom. Ovaj efekt može biti iskorišćen za pojačavanje efekta svih lekova agonista nACh receptora.

**10.** U ispitivanjima mehanizma dejstva mentola na neuromišićnom preparatu *A. suum*:

-Testirana koncentracija mentola (100 nM) promenila je vrednost  $EC_{50}$  acetilholina sa kontrolnih 12.93  $\mu$ M na 10.82  $\mu$ M, dok je  $E_{max}$  povećan sa 1.62 g na 1.90 g. Mentol ispoljava potencirajući efekat na kontrakcije izazvane acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A. suum*.

-Dobijeni rezultati kandiduju mentol za sinergistu u kombinaciji sa lekovima agonistima nikotinskog acetilholinskog receptora nematoda.

**11.** U ispitivanju stepena preživljavanja adultnih oblika *C. elegans* u prisustvu terpenoida timola i karvakrola:

- Timol je ispoljio dozno i vremenski zavisni letalni efekat na adultne *C. elegans*. Vrednost srednje letalne koncentracije ( $LC_{50}$ ) timola iznosila je 117.9 nM nakon 24h i 62.89 nM posle 48h. Faringealno pumpanje se u potpunosti zaustavlja nakon 48 h inkubacije.

- Karvakrol je pokazao veću antinematodnu efikasnost u odnosu na timol.  $LC_{50}$  karvakrola nakon 24 sata, iznosila je 53.03 nM a 33.83 nM nakon 48h. Faringealno pumpanje potpuno prestaje u periodu između 24-48 h inkubacije.

**12.** Ispitivanje uticaja terpenoida na kontrakcije dijafragme pacova metodom električne poljne stimulacije (EFS) pokazalo je da:

-Rastuće koncentracije karvakrola (10, 30, 100 i 300  $\mu$ M) nisu ispoljile bilo kakve promene u amplitudi kontrakcija. Pojava tetaničnog slabljenja posle inkubacije sa 100 i 300  $\mu$ M ukazuje na presinaptički efekat karvakrola na neuronski tip nikotinskog acetilholinskog receptora sisara (autoreceptor).

Takođe, samo ove dve koncentracije karvakrola povećale su bazalni tonus preparata.

-Rastuće koncentracije karveola (10, 30, 100, 300 i 1000  $\mu\text{M}$ ) nisu imale uticaja na amplitudu kontrakcije, niti su izazvale tetanično slabljenje.

-Posle istovremene inkubacije izolovane dijafragme sa karvakrolom i monepantelom, nije dolazilo do povećanja bazalnog tonusa preparata.

**13.** Ispitivanje mehanizma delovanja terpenoida karveola na kontrakcije izolovanog ileuma pacova pokazalo je da:

-100  $\mu\text{M}$  karveola nesignifikantno inhibira kontrakcije ileuma pacova izazvane rastućim koncentracijama acetilholina.

-100  $\mu\text{M}$  karveola signifikantno smanjuje maksimalni efekat kontrakcije ileuma, bez uticaja na bazalni tonus.

**14.** Ispitivanje dejstva karvakrola na integrisanost nervnog sistema Rota-rod testom na pacovima pokazalo je da:

-Karvakrol dozno-zavisno utiče na neuromišićnu koordinaciju. Srednja efektivna doza karvakrola, utvrđena 90 minuta posle aplikacije iznosila je 421.6 mg/kg telesne mase.

-Primenjene doze karvakrola nisu izazvale bilo kakve znake kliničke depresije i nisu bili vidljivi bilo koji drugi centralni ili periferni toksični efekti.

Karvakrol, karveol, mentol i timol su na osnovu naših rezultata veoma ozbiljni kandidati za samostalnu primenu u antinematodnoj terapiji ili primenu u kombinaciji sa lekovima agonistima GABA receptora nematoda (avermektini, piperazin), agonistima nAChR (tetrahidropirimidini i imidazotiazoli) ili aminoacidonitrilima.

Testirani aktivni principi esencijalnih biljnih ulja su u našim ispitivanjima pokazali specifičan i jedinstven mehanizam dejstva koji im potencijalno omogućava visoku efikasnost, čak i kod nematoda rezistentnih na klasične antihelmintike. Test preživljavanja *C. elegans* ukazuje na dozno i vremenski zavisni efekat karvakrola i timola koji može biti adekvatno iskorišćen i proveren u kliničkim studijama. Sa druge strane u koncentracijama koje ispoljavaju jasno antinematodno dejstvo, aktivni principi esencijalnih biljnih ulja koje smo mi ispitivali nemaju značajnije farmakološke efekte na receptore sisara.

Saznanja o mehanizmima interakcije između potencijalno novih i postojećih antinematodnih lekova mogu pomoći u stvaranju terapijskih kombinacija koji deluju na različite podtipove nikotinskog receptora nematoda čineći terapiju efikasnijom i prevenirajući razvoj rezistencije.

Saznanje o postojanju višestrukih mehanizama delovanja pojedinih aktivnih principa poreklom iz biljaka nesumnjivo će pomoći u ublažavanju problema razvoja rezistencije na lekove koji se trenutno koriste u terapiji parazitskih oboljenja životinja i ljudi.

## 8. Literatura

1. Abdel-Rahman, F.H., Alaniz, N.M., Saleh, M.A., 2013. Nematocidal activity of terpenoids. *J Environ Sci Health B* 48 (1): 16-22.
2. Abongwa, M., Marjanović D.S., Tipton G.J., Zheng F., Martin R.J., Trailović M.S., Robertson A.P., 2018. Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8 (1), 36-42.
3. Abongwa, M., Martin R., Robertson A., 2017. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*, 67 (2), 137-152.
4. Abongwa, M., Buxton S.K., Courtot E., Charvet C.L., Neveu C., McCoy C.J., Verma S., Robertson A.P., Martin R.J., 2016. Pharmacological profile of *Ascaris suum* ACR-16, a new homomeric nicotinic acetylcholine receptor widely distributed in *Ascaris* tissues. *British Journal of Pharmacology*, 173 (16), 2463-2477.
5. Adams, R.H., 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8 th edition (Iowa University Press, Ames, IA), 947-980.
6. Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol. Rev.*, 89, 73–120.
7. Amato, A., Liotta, R., Mulè, F., 2014. Effects of menthol on circular smooth muscle of human colon: Analysis of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 295-301.
8. Amrit, F.R.G., Ratnappan, R., Keith, S.A., Ghazi, A., 2014. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods*, 68, 465-475.
9. André, W.P.P., Cavalcante, G.S., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L.D., Macedo, I.T.F., Paula, H.C.B., Morais, S.M., Melo, J.V., Bevilaqua, C.M.L., 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 26 (3): 323-330.
10. Ascher, P., Large, W.A., Rang, H.P., 1979. Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. *Journal of Physiology*, 295, 139–170.



11. Barros, L.A., Yamanak, A.R., Silva, L.E., Vanzeler, M.L.A., Braum, D.T., Bonaldo, J., 2009. In vitro larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecaecum* sp (Nematoda: Anisakidae). *Braz J Med Biol Res.* 42: 918-920.
12. Baser, K.H., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design.* 14 (29), 3106-3119.
13. Bowman, W.C., 2006. Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology,* 147, 277–286.
14. Bohlen, M., Cameron, A., Metten, P., Crabbe, J. C., Wahlsten, D. 2008. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. *Journal of neuroscience methods,* 178 (1), 10-14.
15. Bjørn, H., Hennessy, D.R., Friis, C., 1996. The kinetic disposition of pyrantel citrate and pamoate and their efficacy against pyrantel-resistant *Oesophagostomum dentatum* in pigs, *International Journal for Parasitology,* 26 (12), 1375-1380.
16. Burrows, R.B., 1958. The anthelmintic effect of bephenium on *Ancylostoma caninum*. *Journal of Parasitology,* 607-610.
17. Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology,* 148, 288–294.
18. Castagné, V., Moser, P., Porsolt, R.D., 2009. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 6.
19. Charvet, C.L., Robertson, A.P., Cabaret, J., Martin, R.J., Neveu, C., 2012. Selective effect of the anthelmintic bephenium on *Haemonchus contortus* levamisole-sensitive acetylcholine receptors. *Invertebrate Neuroscience,* 12, 43–51.
20. Choudhary, S., Marjanović, D.S., Wong, C.R, Zhang, X., Coats, J.R., Trailović, S.M., Martin, R.J., Robertson, A.P., 2018. Menthol acts as a positive allosteric modulator on nicotinic acetylcholine receptors. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance,* <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.12.005>.

21. Colquhoun, L., Holden-Dye, L., Walker, R. J., 1991. The Pharmacology of cholinceptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode *Ascaris Suum*. *Journal of Experimental Biology*, 158, 509-530.
22. Copp, F.C., Standen, O.D., Scarnell, J., Rawes, D.A., Burrows, R.B., 1958. A new series of antihelmintics. *Nature*, 181 (4603), 183.
23. Craighead, D.H., Alexander, L.M., 2016. Topical menthol increases cutaneous blood flow. *Microvascular Research*, 107, 39-45.
24. Dangolla, A., Bjorn, H., Willeberg, P., Barnes, E.H., 1997. Faecal egg count reduction percentage calculations to detect anthelmintic resistance in *Oesophagostomum* spp. in pigs. *Veterinary Parasitology*, 68, 127-142.
25. Dejadi, N. N., Souza, L. C., Oliveira, S. R. P., Neris, D. M., Rodolpho, J. M. A., Correia, R.O., 2014. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha piperita* L. *Immunobiology*, 8, 627–632.
26. Dunham, N.W., Miya, T. S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 46 (3), 208-209.
27. Ellis, M.D., Baxendale, F.P., 1997. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honeybee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *J Econ Entomol.* 90:1087-1091.
28. EMEA/MRL/531/98-FINAL, 1999. Piperazine, Summary report (1).
29. EMA/CVMP/351687/2016. Monepantel, Summary report.
30. Enan, E.E., 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 309–321.
31. European Pharmacopoeia, 6 th edition, 2007. Piperazine hydrate (Piperazinum hydricum), 2696-2697.
32. Faria, M., Oliveira, L., Timoteo, M.A., Lobo, M.G., Correia-De-Sá, P., 2003. Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing alpha 3 beta 2 subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse* ; 49: 77–88.
33. Farco, J.A., Grundmann, O., 2013. Menthol--pharmacology of an important naturally medicinal "cool". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13 (1), 124-131.

34. Fru, M.F., Puoti A., 2014. Acquired resistance to monepantel in *C. elegans*: What about parasitic nematodes? *Worm*, 3 (3) e 959416.
35. Gokbulut, C., Nolan, A.M., Mckellar, Q.A., 2001. Pharmacokinetic disposition and faecal excretion of pyrantel embonate following oral administration in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24, 77-79.
36. Gurney, A.M., Rang, H.P., 1984. The channel-blocking action of methonium compounds on rat submandibular ganglion cells. *British Journal of Pharmacology*, 82, 623–642.
37. Holden-Dye, L., Walker R.J. 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *Wormbook*, 1-29.
38. Holden-Dye, L., Joyner M., O'Connor V., Walker R.J. 2013. Nicotinic acetylcholine receptors: a comparison of the nAChRs of *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes. *Parasitology International*, 62 (6), 606-615.
39. Hosking, C.B., Griffiths, M.T., Woodgate, G.R., Besier, B.R., Le Feuvre, S.A., Nilon, P., Trengove, C., Vanhoff, J.K., Kaye-Smith, G.B., Seewald, W., 2009. Clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, compared with registered anthelmintics against gastrointestinal nematodes of sheep in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 87(11), 455-462.
40. Hosking, C.B., Kaminsky, R., Sager, H., Rolfe, F.P., Seewald, W., 2010. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 106, 529–532.
41. Hu, Y., Xiao, S.H., Aroian, V.R., 2009. The New Anthelmintic Tribendimidine is an L-type (Levamisole and Pyrantel) Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, 8, 499.
42. Hugot, J.P., Baujard, P., Morand, S., 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 3: 199-208.
43. Hurst, R., Rollema, H., Bertrand, D., 2013. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacol. Ther.*, 137, 22–54.
44. Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine*. 11(1): 77-82.

45. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: Pyranteli embonas – Pyrantel embonate.
46. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: Bephenii hydroxynaphthoas – Bephenium hydroxynaphthoate.
47. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: Morantel tartarate- Morantel tartarate hydrate.
48. Ivanović, S., 2013. Komparativno ispitivanje mehanizama antiparazitskog i toksičnog dejstva gabaerگیčkih i holinerگیčkih antihelmitika. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
49. James, C.E., Hudson, A.L., Davey, M.W., 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*, 25(7), 328-335.
50. Jayewardene, G., Ismail, M.M., Wijayaratanam, Y., 1960. Bephenium hydroxynaphthoate in treatment of ascariasis. *British Medical Journal*, 268-271.
51. Jin, T., 2010. Near-Infrared Fluorescence Detection of Acetylcholine in Aqueous Solution Using a Complex of Rhodamine 800 and p-Sulfonato-calixarene. *Sensors*, 10(3), 2438-2449.
52. Kabbani, N., Nordman, J.C., Corgiat, B.A., Veltri, D.P., Shehu, A., Seymour, V.A., Adams, D.J., 2013. Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *BioEssays*, 35, 1025–1034.
53. Kagira, J.M., Waruiru, R.M., Munyua. W.K., Kanyari P.W.N., 2003. Resistance to anthelmintics in commercial pig herds in Thika district, Kenya, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 58(1), 1-10.
54. Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor A.J., 2011. Basic and clinical pharmacology, 12th edition (McGraw-Hill).
55. Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Schorderet Weber, S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, P., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Maser, P., 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452, 176-180.
56. Kaminsky, R., Mosimann, D., Sager, H., Stein, P., Hosking, B., 2009. Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *International Journal for Parasitology*, 39, 443–446.

57. Kaplan, R.M., Storey, B.E., Vidyashankar, A.N., Bissinger, B.W., Mitchell, S.M., Howell, S.B., Mason, M.E., Lee, M.D., Pedroso, A.A., Akashe, A., Skrypec, D.J., 2014. Antiparasitic efficacy of a novel plant based functional food using an *Ascaris suum* model in pigs. *Acta Trop.* 139:15-22.
58. Karadzovska, D., Seewald, W., Browning, A., Smal, M., Bouvier, J., Giraudel, J. M., 2009. Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 359–367.
59. Komuniecki, R., Law, W.J., Jex, A., Geldhof, P., Gray, J., Bamber, B., Gasser, R.B., 2012. Monoaminergic signaling as a target for anthelmintic drug discovery: receptor conservation among the free-living and parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 183 (1) : 1–7.
60. Kong, J., Lee, S.M., Moon, Y., Lee, S.G., Ahn, Y., 2007. Nematicidal activity of cassia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Journal of Nematology*, 39 (1), 31–36.
61. Köhler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336-345.
62. Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L., Skálová, L., 2014. Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*, 141 (13), 1686-1698.
63. Lei, J., Leser, M., Enan, E., 2010. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1062–1071.
64. Lozon, Y., Sultan, A., Lansdell, S.J., Prytkova, T., Sadek, B., Yang, K.H., Howarth, F.C., Millar, N.S., Oz, M., 2016. Inhibition of human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol. *European Journal of pharmacology*, 5 (776) , 44-51.
65. Marjanović, D.S., Bogunović, D., Milovanović, M., Marinković, D., Zdravković, N., Magaš, V., Trailović, S.M., 2018. Anthelmintic activity of carvacrol, thymol, cinnamaldehyde and p-cymen against the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* and rat pinworm *Syphacia muris*. *Acta veterinaria*, 68 (4), 445-456.
66. Marr, J.J., Nilsen T.W., Komuniecki R.W., 2003. *Molecular medical parasitology*, Academic press, London, 359-384.

67. Martin, R.J., Clark, C.L., Trailović, S.M., Robertson, A.P., 2004. Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*, *International Journal for Parasitology*, 34(9), 1083-1090.
68. Martin, R.J., Valkanov, M.A., Dale, V.M., Robertson, A.P., Murray, I., 1996. Electrophysiology of *Ascaris* muscle and anti-nematodal drug action. *Parasitology*, 113, 137-156.
69. Martin, R.J., Pennington, A.J., Duittoz, A.H., Robertson, S., Kusel, J.R., 1991. The physiology and pharmacology of neuromuscular transmission in the nematode parasite, *Ascaris suum*. *Parasitology*, 102, S41-58.
70. Martin, R.J., Murray, I., Robertson, A.P., Bjorn, H., Sangster, N., 1998. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use patch. *International Journal for Parasitology*, 28, 849-862.
71. Marsh, E. K., May, R. C. 2012. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and environmental microbiology*, 78 (7), 2075-2081.
72. Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchemo, G.E., 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, 7, 598.
73. Mejía, E.M., Fernández, Igartúa M.B., Schmidt, E.E., Cabaret, J., 2003. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? *Veterinary Research*, 34, 461-467.
74. Molander, L., Lunell, E., 2001. Pharmacokinetic investigation of a nicotine sublingual tablet. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56(11), 813-819.
75. Morovjan, G., Csokan, P., Makranszki, L., Abdallah-Nagy, E.A., Toth, K., 1998. Determination of fenbendazole, praziquantel and pyrantel pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 797, 237-244.
76. Nooney, J.M., Peters, J.A., Lambert, J.J., 1992. A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Journal of Physiology*, 455, 503-527.
77. Nguyen-Huu, T., Molgó, J., Servent, D., Duvaldestin, P., 2009. Resistance to D-tubocurarine of the rat diaphragm as compared to a limb muscle: influence of

- quantal transmitter release and nicotinic acetylcholine receptors. *Anesthesiology*, 110(5), 1011-1015.
78. Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y., 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*. 90(7): 710-5.
79. O'Neil, M.J., *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 14th Edn., Merck and Co., Inc, Whitehouse station, New Jersey, USA, 2006; 1060.
80. Papke, R.L., Sanberg, P.R., Shytle, R.D., 2001. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(2), 646–656.
81. Park, H. H., Jung, Y., Lee, S. V. 2017. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and cells*, 40 (2), 90-99.
82. Paterson, S., Barber, R., 2007. Experimental evolution of parasite life history traits in *Strongyloides ratti* (Nematoda). *Proc Biol Sci*. 274:146–174
83. Patel, T., Ishiujji, Y., Yosipovitch, G., 2007. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57 (5), 873-878.
84. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108 (5), 705-715.
85. Pirri, J.K., McPherson, A.D., Donnelly, J.L., Francis, M.M., Alkema, M.J., 2009. A tyramine-gated chloride channel coordinates distinct motor programs of a *Caenorhabditis elegans* escape response. *Neuron*, 62(4), 526-538.
86. Plumb, D.C., 2002. *Veterinary Drug Handbook*, 4th edition, Iowa State University Press/Ames, 1205-1208.
87. Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54, 259-268.
88. Puttachary, S., Trailović, S.M., Robertson, A.P., Thompson, D.P., Debra J. Woods, Martin, R.J., 2013. Derquantel and abamectin: Effects and interactions on isolated tissues of *Ascaris suum*, *Molecular&Biochemical Parasitology*, 188, 79– 86.
89. Qian, H., Martin, R.J., Robertson, A.P., 2006. Pharmacology of N-, L-, and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*.

- Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 20(14), 2606-2608.
90. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K., 2005. Farmakologija, peto izdanje (prvo srpsko izdanje), 137-142.
  91. Rickard, L.G., Zimmerman, G.L., Hoberg, E.P., Lockwood, P.W., Weber, D.W., Miller, R., 1989. Efficacy of the morantel sustained release trilaminar matrix against gastrointestinal nematodes in beef calves. *Veterinary Parasitology*, 33 (2), 125-33.
  92. Robertson, A.P., Clark, C.L., Martin, R.J., 2010. Levamisole and ryanodine receptors. I: A contraction study in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 171(1), 1-7.
  93. Robertson, A.P., Clark, C.L., Burns, T.A., Thompson, D.P., Geary, T.G., Trailović, S.M., Martin, R.J., 2002. Paraherquamide and 2-Deoxy-paraherquamide Distinguish Cholinergic Receptor Subtypes in *Ascaris* Muscle. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 302(3), 853-860.
  94. Robertson, A.P., Martin, R.J., 2007a. Ion-channels on parasite muscle: pharmacology and physiology. *Invertebrate Neuroscience*, 7, 209-217.
  95. Robertson, A.P., Martin, R.J., 2007b. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology*, 134, 1093-1104.
  96. Roepstorff, A., Bjørn, H., Nansen, P., 1987. Resistance of *Oesophagostomum* spp. in pigs to pyrantel citrate. *Veterinary Parasitology*, 24(3-4), 229-239.
  97. Rustay, NR, Wahlsten, D, Crabbe, JC., 2003. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res*, 141, 237–249.
  98. Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R., 2009. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 159, 49–54
  99. Sager, H., Bapst, B., Strehlau, G.A., Kaminsky R. 2012. Efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against adult stages of a multi-resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Parasitology Research*, 111 (5), 2205-2007.



- 100.Sales, N., Love S., 2016. Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*, 228, 193-196.
- 101.Sangster, N.C., Gill, J., 1999. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. *Parasitology Today*, 15 (4), 141-146.
- 102.Sant'anna, V., Vommaro, R.C., de Souza, W., 2013. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. *Experimental Parasitology*, 135 (1), 1-8.
- 103.Seeger, T., Worek, F., Szinicz, L., Thiermann, H., 2007. Reevaluation of indirect field stimulation technique to demonstrate oxime effectiveness in OP-poisoning in muscles in vitro. *Toxicology*, 233, 209–213.
- 104.Stemmelin, J; Cohen, C; Terranova, JP; Lopez-Grancha, M; Pichat, P; Bergis, O; Decobert, M; Santucci, V; Françon, D; Alonso, R; Stahl, SM; Keane, P; Avenet, P; Scatton, B; Fur, G; Griebel, G., 2008. "Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel treatment strategy for anxiety and depressive disorders". *Neuropsychopharmacology*. 33 (3): 574–87.
- 105.Stein, A.P., Rolfe, F.P., Hosking, C.B., 2010. The control of inhibited fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia* spp. in sheep in Australia with monepantel. *Veterinary Parasitology*, 169, 358–361.
- 106.Trailović, S., 2001. Ispitivanje mehanizama neurotoksičnog delovanja ivermektina. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
- 107.Trailović, S.M., Ivanović, R.S., Nedeljković Trailović Jelena, Robertson, A.P., 2010. Farmakološki receptori nematoda kao ciljna mesta delovanja antiparazitskih lekova. *Veterinarski glasnik*, 64(3-4), 253-264.
- 108.Trailović, S.M., Ivanović, S.R., Varagić, V.M., 2011. Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. *Research in Veterinary Science*, 91, 426–433.
- 109.Trailović, S.M., Robertson, A.P., Clark, C.L., Martin, R.J., 2002. Levamisole receptor phosphorylation: effects of kinase antagonists on membrane potential responses in *Ascaris suum* suggest that CaM kinase and tyrosine kinase regulate sensitivity to levamisole. *Journal of Experimental Biology*, 205(24), 3979-3988.
- 110.Trailović, S.M., Verma, S., Clark, C.L., Robertson, A.P., Martin, R.J., 2008. Effects of the muscarinic agonist, 5-methylfurmethiodide, on contraction and

- electrophysiology of *Ascaris suum* muscle. *International Journal for Parasitology*, 38(8-9), 945–957.
111. Trailović, S.M., Marjanović D.S., Nedeljković Trailović J., Robertson A.P., Martin R.J., 2015 Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitology Research*, 114 (8), 3059-3068.
112. Trailović, S.M., Zurovac Zorana, Gruborović Sanja, Marjanović D.S., Nedeljković Trailović Jelena., 2015. Presynaptic and postsynaptic regulation of muscle contractions in the ascarid nematode *Ascaris suum*: a target for drug action. *Journal of Helminthology*, 90 (6), 698-705.
113. Trailović, S.M., Marinković D., Nedeljković Trailović Jelena, Milovanović Mirjana, Marjanović D.S., Aničić M.R., 2015. Pharmacological and morphological characteristics of the muscular system of the giant liver fluke (*Fascioloides magna* – Bassi 1875). *Experimental Parasitology*, 159 (4), 136-142.
114. Trailović, S.M., Clark, C.L., Robertson, A.P., Martin, R.J., 2005. Brief application of AF2 produces long lasting potentiation of nAChR responses in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 139 (1), 51-64.
115. Tritten, L., Silbereisen, A., Keiser, J., 2011. In Vitro and In Vivo Efficacy of Monepantel (AAD 1566) against Laboratory Models of Human Intestinal Nematode Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5 (12), 1457.
116. Varagić, V.M., Milošević, M.P., 2008. *Farmakologija*, 22. prerađeno i dopunjeno izdanje, Elit Medica.
117. Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209 (3), 278-280.
118. Vercruyse, J., Dorny, P., Hilderson, H., Berghen, P., 1992. Efficacy of the morantel sustained release trilaminar bolus against gastrointestinal nematodes and its influence on immunity in calves. *Veterinary Parasitology*, 44 (1-2), 97-106.
119. Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P. R., Lopes, C. S., Coelho, M. G. P., Monteiro-Leal, L. H. 2007. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin (*Lamiaceae*) on trophozoites. *Exp. Parasitol.* 115, 25–31.

120. Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20 (10), 469-476.
121. Wolstenholme, A.J., 2011. Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 1 (1) 2-13.
122. Williamson, S.M., Robertson A.P., Brown L., Williams T., Woods D.J., Martin R.J., Sattelle D.B., Wolstenholme A.J., 2009. The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLOS Pathogen*, 5 (7), e 1000517.
123. Williams, A.R., Ramsay, A., Hansen, T.V., Ropiak, H.M., Mejer, H., Nejsum, P., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2015. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (*Cinnamomum verum*). *Sci Rep*. 5: 14791.
124. Williams, M., Porsolt R.D., 2007. CNS Safety Pharmacology. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1-13.
125. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacrol>
126. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carveol>
127. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/menthol>
128. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/piperazine>
129. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyrantel>
130. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/morantel>
131. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bephenium>
132. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/monepantel>
133. www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thymol>
134. www. <https://projects.ncsu.edu/nematode/A.suum>
135. www. [www.intechopen.com/nicotinic acetylcholine receptor](http://www.intechopen.com/nicotinic-acetylcholine-receptor)
136. Yang, J.Y., Kim, M.G., Lee, S.E., Lee, H.S., 2014. Acaricidal activities against house dust mites of spearmint oil and its constituents. *Planta Medica*, 80, 165-170.
137. Young, M.D., Jeffery, G.M., Freed, J.E., Morehouse, W., 1958. Bephenium, a new drug active against human hookworm. *Journal of Parasitology*, 611-612.

138. Yin, N., 2015. Silver nanoparticle exposure induces rat motor dysfunction through decrease in expression of calcium channel protein in cerebellum. *Toxicol Lett.* 2;237(2):112-20.
139. Zaia, MG, Cagnazzo, Td, Feitosa, KA., 2016. Anti-Inflammatory Properties of Menthol and Menthone in *Schistosoma mansoni* Infection. *Front Pharmacol.*, 7, 170.
140. Zdravković, N., 2016. Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *Staphylococcus aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
141. Zheng, F., Robertson A.P., Abongwa M., Yu E.W., Martin R.J., 2016. The *Ascaris suum* nicotinic receptor, ACR-16, as a drug target: four novel negative allosteric modulators from virtual screening. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6 (1), 60-73.
142. Zhang, L., Demain, A. L. (Eds.), 2005. *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, New York, USA.

## OBAVEZNI PRILOZI

### Biografija autora

Đorđe S. Marjanović je završio osnovnu školu u Valjevskoj Kamenici, a srednju školu u Valjevu, oba puta kao nosilac Vukove diplome. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisuje 2007. godine i završava isti 15.05.2013. godine kao najbolji student generacije sa prosečnom ocenom 9.71 stičući zvanje doktora veterinarske medicine odbranom diplomskog rada: „Reumatoidni artritis“. Doktorske akademske studije je upisao 2013. godine i položio planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9.73. Tokom studija bio je stipendista grada Valjeva, fonda za mlade talente 2007-2012, stipendista Ministarstva Prosvete i nauke za period od 2007-2012, stipendista Ministarstva omladine i sporta, Fond za mlade talente “DOSITEJA” za 2012. godinu. Od priznanja u toku studija nosilac je godišnjih nagrada za najboljeg studenta generacije Fakulteta veterinarske medicine od 2008-2013, Nosilac Povelje Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta Fakulteta Veterinarske Medicine (Student Generacije).

Tokom 2014. godine na Konkursu Ministarstva za nauku, prosvetu i tehnološki razvoj, kao najbolji kandidat na Fakultetu Veterinarske medicine predložen za stipendiju za doktorante kao istraživač pripravnik na projektu: "Razvoj biljnih lekova i biocida na bazi karvakrola, timola i cinamaldehida za primenu u veterinarskoj medicini, stočarstvu i proizvodnji hrane bez štetnih rezidua" (Projekat ev. br. TP 31087 rukovodilac Saša Trailović sa Fakulteta Veterinarske Medicine Univerziteta u Beogradu). U periodu od 2014-2016. godine bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja kao istraživač pripravnik na naučnom projektu Ministarstva nauke na Katedri za Farmakologiju i Toksikologiju Fakulteta Veterinarske Medicine Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Saše Trailovića. Od 2017. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na projektu TR 31087.

Đorđe Marjanović je bio učesnik projekta bilateralne saradnje između Republike Francuske i Republike Srbije (2016-2017), Fondacija Pavle Savić, 2016. godine boravak i rad u trajanju od 7 dana na Francuskom Nacionalnom Institutu. Takođe je učesnik u novom projektu Bilateralne saradnje sa Republikom Francuskom za period 2018-2020, projekat broj: 451-03-01963/2017-09/02 „Funkcionalna ispitivanja rezistencije na makrociklične laktone u parazita *Ascaris suum*“ . Do sada je kandidat Đorđe Marjanović objavio 3 rada iz M 21 kategorije, 3 rada iz M 22 kategorije i 2 rada iz M 23 kategorije uz brojne radove sa međunarodnih i domaćih skupova.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani Đorđe Marjanović

broj upisa 15/02

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

ISPITIVANJE MEHANIZMA ANTINEMATODNOG DEJSTVA ODABRANIH  
MONOTERPENOIDNIH I DITERPENOIDNIH AKTIVNIH SASTOJAKA  
ESENCIJALNIH BILJNIH ULJA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Đorđe Marjanović

Broj upisa: 15/02

Studijski program : Doktorske akademske studije

Naslov rada Ispitivanje mehanizma antinematodnog dejstva odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja

Mentor: Prof. dr Saša Trailović

Potpisani \_\_\_\_\_

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Prilog 3.**

#### **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje mehanizma antinematodnog dejstva odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.