

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Mr Saša R. Ivanović

**Komparativno ispitivanje mehanizama
antiparazitskog i toksičnog dejstva gabaergičkih
i holinergičkih antihelmintika**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mr Saša R. Ivanović

**Comparative study of mechanisms of
antiparasitic and toxic action of GABAergic and
cholinergic anthelmintics**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

dr Saša M. Trailović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

Komisija za odbranu:

dr Saša M. Trailović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

dr Milanka Jezdimirović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

dr Vitomir Ćupić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

dr Zoran Todorović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Medicinski fakultet

dr Zoran Kulišić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

Mesto i datum odbrane:

Beograd, _____

Izjava zahvalnosti

Ova doktorska disertacija finansirana je od strane projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod naslovom *„Razvoj biljnih lekova i biocida na bazi karvakrola, timola i cinamaldehida za primenu u veterinarskoj medicini, stočarstvu i proizvodnji hrane bez štetnih rezidua“*, čiji je rukovodilac prof dr Saša Trailović (projekat broj 31087).

Takođe, disertacija je podržana i od strane projekta: 09/1548, 332 160UÅ, koji finansira Kraljevina Norveške.

Saša R. Ivanović

Komparativno ispitivanje mehanizama antiparazitskog i toksičnog dejstva gabaergičkih i holinergičkih antihelminatika

Kratak sadržaj

Gabaergički i holinergički sistem u neuro-mišićnom sistemu parazitskih nematoda su glavna ciljna mesta delovanja antihelminatika. U okviru holinergičkog sistema nematoda, farmakološki značaj ima pre svega nikotinski-acetilholinski receptor (nAChR). S druge strane, GABA-receptor parazitskih nematoda je prvobitno označen kao glavno mesto dejstva avermektina i milbemicina. Međutim, vremenom se pokazalo da ovi lekovi deluju i na jedan potpuno nov, do tada neopisani glutamat-zavisni hloridni jonski kanal u farinksu nematoda. Pored toga, značajno je da neki aktivni principi etarskih ulja imaju dokazana antiparazitska svojstva, i da postoje indicije da deluju upravo preko ova dva receptorska sistema.

Osnovni problemi koji danas ugrožavaju antiparazitsku terapiju su razvoj rezistencije i često ispoljavanje toksičnih efekata antiparazitskih lekova. Da bi se bolje razumeli mehanizmi dejstva gabaergičkih i holinergičkih antihelminatika ispitali smo farmakološke karakteristike predstavnika ove dve grupe lekova na neuro-mišićnom preparatu velike nematode svinja *Ascaris suum*. Takođe, značajno je bilo komparativno ispitati razlike u dejstvu gabaergičkih i holinergičkih antihelminatika na odgovarajuće receptore sisara (ispitivanja su izvršena na izolovanoj dijafragmi i ileumu pacova) i na taj način analizirati mehanizme njihovih neželjenih efekata. U našim istraživanjima mereni su efekti kontrakcije ili relaksacije izolovanih preparata i odgovarajućim statističkim metodama obrađivani dobijeni rezultati (nelinearna regresija, ANOVA, t-tets).

Na osnovu rezultata dobijenih u ispitivanjima doneti su sledeći zaključci: **(1)** Agonisti L, N i B tipa nikotinskog-acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda, ispitivani na modelu neuro-mišićnog preparata *A. suum*, ispoljili su različitu efikasnost. Najvišu efikasnost u prvoj grupi ispitivanih agonista, ispoljio je pirantel (agonista L-tipa nikotinskog receptora $EC_{50}=0.010\mu M$, $E_{max}=2.5g$), zatim befinijum (agonista B-tipa nikotinskog receptora $EC_{50}=0.37\mu M$, $E_{max}=2.7g$) i na kraju acetilholin (endogeni neurotransmiter), agonista sva tri tipa L, N i B nikotinskog receptora ($EC_{50}=6.12-6.45\mu M$, $E_{max}=1.71-2.07g$). Najvišu efikasnost u drugoj grupi ispitivanih agonista nikotinskog receptora ispoljio je tribendimidin (najverovatnije agonista L-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=0.064\mu M$, $E_{max}=1.29g$), zatim levamizol (agonista L-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=0.34\mu M$, $E_{max}=0.68g$) i na kraju nikotin (agonista N-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=4.99\mu M$, $E_{max}=1.07g$). **(2)** Nikotinski-acetilholinski receptor *A. suum*, na koji deluju tribendimidin i nikotin ispoljava osobine oba tipa nAChR sisara: a) karakteristike mišićnog tipa nAChR sisara, jer je osetljiv pre svega na pankuronijum ali i na tubokurarin; b) karakteristike neuronskog tipa nAChR sisara, jer je osetljiv pre svega na mekamilamin ali i na heksametonijum. **(3)** GABA izaziva dozno-zavisnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*, sa vrednošću srednje EC_{50} od $7.40\mu M$, dok piperazin relaksaciju izaziva sa EC_{50} od $331\mu M$. Receptor preko koga GABA i piperazin ostvaruju relaksaciju *A. suum* različit je od $GABA_A$ receptora sisara jer je neosetljiv na bikukulin (specifični antagonist $GABA_A$ receptora). **(4)** Ivermektin i moksidektin sami po sebi ne dovode do relaksacije neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Ivermektin ne potencira relaksaciju koju izaziva GABA. Međutim, ivermektin dovodi do relaksacije samo kada je aplikovan posle GABA ili na neuro-mišićnim preparatima *A. suum* sa velikom amplitudom spontane aktivnosti (spontane kontrakcije i relaksacije od oko 0.5g). Ivermektin za svoje dejstvo najverovatnije zahteva prethodnu aktivaciju GABA-zavisnog hloridnog kanala. **(5)** Karvakrol u koncentracijama od 100 i $300\mu M$, izaziva dugotrajnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Karvakrol signifikantno potencira relaksaciju koju izaziva GABA i signifikantno inhibiše dozno-zavisne kontrakcije izazvane sa ACh, pomerajuću vrednost EC_{50} ACh sa kontrolnih $5.22\mu M$, na $13.88\mu M$ i $22.72\mu M$. Karvakrol smanjuje maksimalni kontraktilni efekat ACh sa kontrolnih 3.1g na 2.50g i 1.96g. Ovde se verovatno radi o klasičnom nekompetitivnom fiziološkom antagonizmu, koji karvakrol ispoljava u odnosu na ACh. **(6)** Ni jedna kombinacija različitih parametara električne poljne stimulacije (EFS) (10 do 100Hz, 0.01-1.0ms, 5 do 30V, od 2.0s do kontinuirane stimulacije), ne izaziva indirektnu stimulaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum* (kontrakcije su neosetljive na mekamilamin). Objašnjenje može biti veća osetljivost mišićne kontraktilne mašine na EFS u odnosu na nerve koji oslobađaju ACh. Kontrakcije *A.*

suum dobijene sa EFS su ipak bile osetljive na 10 i 30 μ M GABA, što se može objasniti snažnom hiperpolarizacijom mišićnih i nervnih ćelija askarisa koju GABA izaziva. (7) GABA u koncentraciji od 1 μ M udvostručuje vrednost EC₅₀ ACh sa 4.42 μ M na 10.94 μ M, bez značajnije promene E_{max}. Ivermektin 300nM, ne menja značajnije vrednost EC₅₀ ACh (10.26 μ M u odnosu na kontrolnih 8.09 μ M), ali smanjuje vrednost E_{max} za 0.5g. Kada se primene zajedno, GABA i ivermektin povećavaju vrednost EC₅₀ ACh sa 8.28 μ M na 50.13 μ M i smanjuju vrednost E_{max} sa 2.51g na 1.90g. Kombinacija GABA i ivermektina ispoljava visoko signifikantnu inhibiciju dejstva ACh u svim koncentracijama u kojima je on primenjen, pri čemu je efekat kombinacije bio veći od njihovih pojedinačnih dejstava. (8) Piperazin u koncentraciji od 100 μ M ne menja vrednost EC₅₀ acetilholina (10.76 μ M u odnosu na kontrolnih 9.47 μ M) ali smanjuje vrednost E_{max} za skoro 1g (sa 4.38g na 3.45g). Kada se piperazinu doda ivermektin 300nM, vrednost EC₅₀ acetilholina se i dalje ne menja, ali se E_{max} smanjuje do 2.73g. Smanjivanje maksimalnog efekta bez promene EC₅₀ ostvaruju nekompetitivni antagonisti, kako se piperazin i ivermektin mogu označiti u odnosu na dejstvo ACh. (9) Agonisti nikotinskog receptora nematoda - levamizol, befinijum i pirantel, deluju antagonistički na kontrakcije izolovane dijaframe pacova izazvane sa EFS. EC₅₀ levamizola iznosi 53.83 μ M, befinijuma 54.47 μ M i pirantela 5.53 μ M. Sva tri leka su ispoljila i presinaptički efekat, levamizol u koncentracijama višim 30 μ M, befinijum u koncentracijama višim od 10 μ M i pirantel u koncentracijama iznad 5 μ M. Tribendimidin nije ispoljio bilo kakvo dejstvo na kontrakcije izolovane dijafragme u koncentracijama do 300 μ M. (10) Agonisti GABA receptora - piperazin (30 do 3000 μ M) i moksidektin (10 do 30 μ M) nisu ispoljili bilo kakav efekat na kontrakcije izolovane dijafragme izazvane EFS. (11) Agonisti nikotinskog receptora nematoda tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel (1 do 100 μ M), ne ispoljavaju bilo kakvo dejstvo na tonus izolovanog ileuma pacova. Primenjeni u koncentracijama od 10 i 100 μ M ne menjaju srednju vrednost kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS. Agonisti GABA receptora nematoda, piperazin (30 do 1000 μ M) i moksidektin (1 do 100 μ M), ne ispoljavaju bilo kakvo dejstvo na tonus izolovanog ileuma pacova, niti menjaju srednju vrednost kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS. (12) Karvakrol (10, 30 i 100 μ M) ne menja srednju vrednost kontrakcija dijafragme pacova izazvanih sa EFS. Međutim, najviša testirana koncentracija dovodi do izvesnog tetaničnog slabljenja, što ukazuje na potencijalni presinaptički efekat karvakrola. Na izolovanom ileumu pacova, karvakrol (300 i 1000 μ M) ne utiče na kontrakcije izazvane sa EFS.

*

* *

Izvedeni zaključci ukazuju da pojedini agonisti nAChR nematoda ispoljavaju veoma različitu efikasnost na neuro-mišićnom preparatu *A. suum* i da ta efikasnost zavisi od podtipa receptora na koji agonist deluje (L, B ili N). Kombinacija lekova agonista različitih podtipova nAChR nematoda mogla bi da predstavlja potpuno nov prilaz lečenju parazitskih infekcija u odnosu na klasičnu terapiju samo jednim lekom.

Tribendimidin na osnovu naših ispitivanja predstavlja veoma potentni i potencijalno koristan lek u veterinarskoj medicini. Istovremeno on ne deluje na periferne holinergičke i GABA-ergičke nervne strukture sisara, što ukazuje na visoku bezbednost njegove primene kod domaćina.

GABA-ergički makrolidni antihelmintici, na osnovu naših rezultata, sami po sebi ne izazivaju relaksaciju mišića askarisa, ali posle dejstva GABA, ispoljavaju relaksantno dejstvo. Očigledno da je za ovaj njihov efekat potrebna aktivacija hloridnog kanala, čije otvaranje reguliše GABA. Piperazin sa druge strane, sam po sebi izaziva relaksaciju ali najverovatnije ne deluje na isti receptor kao i ivermektin i milbemicini. Međutim, zajedno sa njima ispoljava izraziti nekompetitivni antagonizam u odnosu na kontrakcije izazvane sa ACh i to možda može da bude nova kombinacija lekova u farmakoterapiji parazitskih infekcija.

Na osnovu rezultata o dejstvu karvakrola u našim istraživanjima i hemijskih karakteristika ovog jedinjenja prirodnog porekla, gotovo da možemo da tvrdimo da je karvakrol veoma ozbiljan kandidat za potencijalni antihelmintički lek. On bi se mogao primenjivati samostalno ili u kombinaciji sa recimo GABA-agonistima čije antiparazitsko dejstvo pojačava (kako smo u našim ispitivanjima pokazali).

III

Na kraju, svi ispitivani lekovi su ispoljili slab ili gotovo nikakav toksični potencijal na modelu izolovane dijafragme i ileuma pacova. Ukoliko ne prolaze krvno-moždanu barijeru (što za sve njih važi u fiziološkim okolnostima) i zbog toga ne deluju na centralne GABA i holinergičke strukture, njihova toksičnost za domaćina je veoma niska, jer na periferne nikotinske i GABA strukture deluju tek u izuzetno visokim koncentracijama (koje daleko nadmašuju terapijske).

Ključne reči:

antiparazitici, mehanizam dejstva, toksičnost, GABA agonisti, holinergički agonisti, karvakrol, tribendimidin

Naučna oblast: Veterinarska medicina
Uža naučna oblast: Farmakologija i toksikologija
UDK: 619:615.284

Comparative study of mechanisms of antiparasitic and toxic action of GABAergic and cholinergic anthelmintics

Summary

GABAergic and cholinergic systems in the neuromuscular system of the parasitic nematodes are the main target of action for anthelmintic drugs. In the nematode cholinergic system pharmacological importance has primarily nicotinic-acetylcholine receptor (nAChR). On the other hand, the GABA-receptor was originally identified as the main site of action for the Avermectins and Milbemicins. However, later was shown that these drugs work on a new, previously never described glutamate-gated chloride ion channel, located in the nematode pharynx.

The most important problems that are endangering the success of antiparasitic therapy are the development of resistance in the parasites and often occurrences of the toxic effects of antiparasitic drugs in host. In the order to elucidate the mechanisms of action of GABAergic and cholinergic anthelmintic, we examined the pharmacological characteristics of the representatives of these two groups of drugs in the isolated nerve-muscle preparation of large pig nematode *Ascaris suum*. Also, it was important to examine comparatively differences in the effects of cholinergic and GABAergic anthelmintic on the corresponding receptors in mammals (investigations were performed on isolated rat diaphragm and ileum), and thus to analyze the mechanisms of their adverse effects. In presented investigations we measured the effects of contraction or relaxation on isolated nematode or mammalian preparations and analyzed the results by using appropriate statistical methods (non-linear regression, ANOVA, t-test).

Based on the results obtained in our investigations the following conclusions may be presented:

(1) Agonists of L, N and B type of nematode nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) studied on a model of neuromuscular preparations of *A. suum*, showed variable efficacy. Highest efficiency in the first group of tested agonists has pyrantel (agonist of L-type nAChR, $EC_{50}=0.010 \mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=2.5\text{g}$), then buphenium (agonist of B-type nAChR, $EC_{50}=0.37\mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=2.7\text{g}$) and at the end acetylcholine (an endogenous neurotransmitter, agonists of all three types of receptors L, N and B, $EC_{50}=6.12-6.45\mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=1.71-2.07\text{g}$). Highest efficiency in the second group of nicotinic receptor agonists has been demonstrated by tribendimidine (probably agonist of L-type nAChR, $EC_{50}=0.064\mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=1.29\text{g}$), followed by levamisole (agonist of L-type nAChR, $EC_{50}=0.34\mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=0.68\text{g}$) and at the end nicotine (an agonist of N-type nAChR, $EC_{50}=4.99\mu\text{M}$, $E_{\text{max}}=1.07\text{g}$).

(2) Nicotinic acetylcholine receptor of *A. suum*, that acting tribendimidine and nicotine, exhibit characteristics of both types of mammalian nAChRs: a) the characteristics of mammalian muscle type of nAChR, because it is sensitive primarily to pancuronium but also to tubocurarine, and b) the characteristics of neuronal nAChRs of mammals, because it is sensitive primarily to mecamylamine but also to hexamethonium.

(3) GABA induced a dose-dependent relaxation of *A. suum* neuromuscular preparation, the value of the mean EC_{50} was $7.40\mu\text{M}$, while piperazine causes relaxation with EC_{50} of $331\mu\text{M}$. Receptor through which GABA and piperazine exhibit relaxation of *A. suum* is different from mammalian $GABA_A$ receptor, because it is insensitive to bicuculine (specific mammalian $GABA_A$ receptor antagonist).

(4) Ivermectin and moxidectin by themselves do not lead to the relaxation of neuromuscular preparation of *A. suum*. Furthermore, ivermectin does not potentiate the relaxation caused by GABA. Ivermectin induces relaxation only when is administered after GABA or in the neuromuscular preparations of *A. suum* with high amplitude of spontaneous activity (spontaneous contraction and relaxation about 0.5g). Therefore, ivermectin for its action requires prior activation of GABA-dependent chloride channels.

(5) Carvacrol 100 and $300\mu\text{M}$, causes long-term relaxation of neuromuscular preparation of *A. suum*. Carvacrol significantly potentiates relaxation caused by GABA and significantly inhibits the dose-dependent contractile effects of ACh, shifting the EC_{50} value from control $5.22\mu\text{M}$ to the $13.88\mu\text{M}$ and $22.72\mu\text{M}$, respectively. Carvacrol reduced the maximum contractile effect of ACh from control 3.1g to the 2.50g and 1.96 g, respectively. Therefore, this is probably a classical non-competitive physiological antagonism, which carvacrol manifests by itself in relation to ACh.

(6) Neither one combination of different parameters of Electrical Field Stimulation (EFS) (10Hz to 100Hz, 0.01-1.0ms, 5 to 30V, from 2.0 sec. to continuous stimulation), do not causes indirect stimulation of the *A. suum*

Based on the effects of carvacrol in our research and chemical characteristics of this compound of natural origin, we can conclude that carvacrol is a serious candidate for a potential antihelmintic drug. It could be applied alone, or in combination with GABA agonists whose antiparasitic effect increases (as we showed in our investigations).

Finally, all tested drugs are exhibited little or no toxic potential in the models of rat isolated diaphragm and ileum. If they do not pass the blood-brain barrier (which is evidenced for all of them under physiological conditions), and therefore does not affect the central GABA and cholinergic structures, their toxicity for host is very low, because peripheral nicotinic and GABA structures they affect only in extremely high concentrations (which far exceed therapeutic).

Key words:

antiparasitics, mechanism of action, toxicity, GABA agonists, cholinergic agonists, carvacrol, tribendimidine

Scientific field: Veterinary medicine

Specific scientific field: Pharmacology and Toxicology

UDC: 619:615.284

Sadržaj

1.	Uvod.....	1 str
2.	Pregled literature.....	3
3.	Ciljevi i zadaci rada.....	48
4.	Materijal i metod rada.....	51
5.	Rezultati.....	58
	5.1. Komparativno ispitivanje efekata dve grupe antihelmintika, agonista nikotinskog-acetilholinskog receptora nematoda na neuro-mišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i>	58
	5.2. Komparativno ispitivanje efekata antagonista nikotinskog receptora heksametonijuma i mekamilamina (dominantno deluju na neuronski tip receptora sisara) i tubokurarina i pankuronijuma (dominantno deluju na mišićnin tip receptora sisara) u odnosu na dejstva tribendimidina i nikotina na neuro-mišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i>	72
	5.3. Komparativno ispitivanje efekata GABA i predstavnika tri grupe antihelminitika GABA-agonista na neuro-mišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i> : a) avermektina (ivermektina); b) milbemicina (moksidektina); c) pirazina (piperazin).....	82
	5.4. Ispitivanje interakcije GABA sa lekovima GABA-agonistima.....	89
	5.5. Ispitivanje mehanizma dejstva karvakrola (aktivne supstance esencijalnih biljnih ulja) na neuro-mišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i>	91
	5.6. Ispitivanje dejstva antagonista nikotinskog-acetilholinskog receptora i agonista GABA receptora na kontrakcije neuro-mišićnog preparata <i>Ascaris suum</i> izazvanih poljnom stimulacijom.....	97
	5.7. Ispitivanje interakcije GABA i nikotinskih agonista na neuro-mišićnom preparatu <i>Ascaris suum</i>	100
	5.8. Ispitivanja efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovane dijafragme pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS).....	109
	5.9. Ispitivanja efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovanog ileuma pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS).....	117
	5.10. Ispitivanje efekata karvakrola na kontrakcije izolovane dijafragme i ileuma pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS).....	122
6.	Diskusija.....	124
7.	Zaključci.....	155
8.	Literatura.....	162

1. Uvod

Infekcije parazitskim nematodama kod životinja i ljudi prouzrokuju značajne zdravstvene probleme, koji u nekim slučajevima dovode i do letalnog ishoda. U veterinarskoj medicini ova vrsta infekcija, pored ostalog, nanosi velike ekonomske gubitke usled smanjenog prirasta telesne mase, poremećaja imunskog statusa, povećanja prijemljivosti za druge bolesti i uopšte slabljenja proizvodnih karakteristika obolelih životinja.

Potreba za razvojem novih vrsta antinematodnih lekova, pre svega namenjenih za suzbijanje masovnih infekcija, nametnuta je postojanjem: (i) relativno ograničenog broja trenutno raspoloživih antihelmintika, (ii) jako velikim brojem inficiranih životinja i ljudi, (iii) potrebom za rekurentnim tretmanom zbog visokih stopa reinfekcije i dinamike životnog ciklusa parazita, i (iv) čestom pojavom rezistencije parazita na aktuelne antihelmintike.

Dve najznačajnije grupe savremenih antihelmintika su lekovi koji selektivno deluju na nervno-mišićni sistem nematoda: agonisti GABA receptora i agonisti nikotinskog receptora nematoda. Mada su osnovni principi njihovih delovanja poznati, veliki deo mehanizama i reakcija koje ovi lekovi pokreću u organizmu nematoda i sisara, još uvek nisu potpuno definisani. Avermektini deluju na GABA receptor nematoda (koji je najverovatnije sličan GABA_A receptoru sisara) i na glutamat-zavisni hloridni kanal (GluCl), koji postoji samo u farinksu nematoda. Sa druge strane, nikotinski agonisti efekat ostvaruju vezujući se za nikotinski receptor nematoda na njihovim nervno-mišićnim sinapsama. Ovaj receptor je opet, po svojim karakteristikama (osetljivost na specifične antagoniste) sličniji centralnom-neuronskom nikotinskom receptoru sisara, nego nikotinskom receptoru sisara na motornoj ploči.

Farmakoterapija parazitskih infekcija, kako u veterinarskoj tako i u humanoj medicini je već duže vreme u specifičnoj vrsti "krize". Više od 25 godina (od uvođenja avermektina u kliničku praksu 1985. godine), ne pojavljuje

se nova vrsta lekova, koja bi umanjila problem vezan pre svega za rezistenciju parazita, ali i za prevazilaženje neželjenih i toksičnih dejstava postojećih lekova. Može se samo konstatovati vrlo mala korist od pojave ciklooktadepsipectida, koji su našli primenu jedino kod mačaka, ili skorije sintetisanih aminoacetonitrila i paraherkvamida koji još uvek nisu opravdali velika očekivanja.

Detaljnija istraživanja mehanizama dejstava postojećih antiparazitskih lekova i definisanje njihove selektivne toksičnosti, omogućila bi poboljšanje antiparazitske efikasnosti i izostajanje neželjenih efekata. Poboljšanje antiparazitske efikasnosti moglo bi se postići kombinovanom primenom lekova agonista različitih podtipova istog receptora (nikotinskog ili GABA). Ovakav prilaz terapiji bi istovremeno umanjio potrebu za korišćenjem visokih doza antiparazitika, a samim tim i smanjio njihovu toksičnost za domaćina.

Da bi se detaljnije utvrdila priroda neželjenih i toksičnih dejstava antihelminitika, bilo je značajno ispitati dejstvo gabaerģičkih i holinerģičkih lekova na odgovarajuće receptore domaćina (sisara). To se pre svega odnosi na periferne nerve strukture, jer ovi lekovi u vrlo malom stepenu prolaze krvno-moždanu barijeru i dospevaju u CNS.

2. Pregled literature

2.1. Farmakoterapija parazitskih infekcija životinja

Parazitske infekcije domaćih životinja dovode do smanjene produktivnosti, poremećaja opšteg zdravstvenog stanja, a ponekad i do uginuća životinja. Za terapiju ovih infekcija koriste se antiparazitski lekovi, čije delovanje može biti *parazitostatsko* (reverzibilno) ili *parazitocidno* (ireverzibilno). Prema mestu delovanja antiparazitski lekovi se dele na *antiiektoparazitike* i *antiendoparazitike*, dok se antiendoparazitici dele na antinematodne (antihelminthici), antitreematodne i anticestodne lekove.

Antinematodni lekovi (antihelminthici) su lekovi koji deluju nematocidno, odnosno ubijaju nematode ili nematostatski, kada onesposobljavaju i parališu nematode, posle čega one bivaju izbačene iz organizma domaćina peristaltičkim pokretima creva ili kontrakcijom glatke muskulature respiratornih puteva. Koji od dva pomenuta dejstva (nematocidni ili nematostatski) će ispoljiti antinematodni lek, zavisi od: mehanizma njegovog dejstva, primenjene doze, vrste i razvojnog stadijuma parazita.

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 laktoni
 - Avermektini (ivermektin, abamektin, doramektin, selamektin)
 - Milbemicini (moksidektin).

Početakom XX veka, za terapiju nematodnih infekcija životinja koristili su se: bakar sulfat, različita jedinjenja arsena i neki alkaloidi (kao što je nikotin), ali su svi oni imali vrlo ograničenu aktivnost protiv parazita gastrointestinalnog trakta i uz to vrlo često izrazito toksično delovanje na samu životinju.

Fenotiazin je prvi sintetski antihelmintik. Sintetisan je 1885. godine, ali su njegovu antinematodnu aktivnost Harwood i saradnici otkrili 1938. godine. Ovo je predstavljalo izuzetno veliki napredak u dotadašnjoj terapiji nematodnih infekcija preživara i konja. Međutim, limitirajući faktor je i dalje predstavljala visoka toksičnost, zbog čega je fenotiazin kod svinja imao sasvim ograničenu primenu, a kontraindikaciju primene kod pasa, mačaka i ljudi. Od svih vrsta životinja kod kojih je fenotiazin primenjivan (ovce, goveda, koze, konji, živina), najveći broj slučajeva toksičnog delovanja, pa čak i uginuća, zabeležen je kod konja. Pojava široko-spektralnih antihelmintika tokom 60-tih godina prošlog veka, značajno je smanjila primenu fenotiazina. Danas se ovaj lek vrlo retko koristi.

Piperazin je drugi antinematodni lek iz grupe heterocikličnih jedinjenja. Ranih 1900-tih godina prvobitno je bio korišćen u terapiji gihta ljudi, zbog svoje osobine da vrlo dobro rastvara mokraćnu kiselinu. Njegova antihelmintička aktivnost ostala je nepoznata sve do 1950. godine. Nakon toga sintetisani su brojni derivati, a prvenstveno različite soli piperazina (citrati, adipati). Svi derivati piperazina ispoljili su dobru aktivnost protiv gastrointestinalnih nematoda većine vrsta domaćih životinja. Za razliku od fenotiazina, soli piperazina su pokazale široke granice bezbednosti kod svih vrsta životinja. To su potvrdila i toksikološka ispitivanja, pa tako akutna peroralna LD₅₀ piperazina za miševu iznosi 11,4 g/kg telesne mase. Piperazin je zbog toga mogao da se primenjuje i kod sasvim mladih životinja (npr. teladi starosti 4 nedelje), bez ikakvih neželjenih efekata. Ovakva visoka selektivna toksičnost piperazina samo za helminte, objašnjava se mehanizmom njegovog dejstva. Piperazin je agonista GABA receptora, koji postoje i kod vertebrata i kod helminta. Međutim, kod vertebrata GABA kao inhibitorni neurotransmiter

funkcioniše uglavnom u CNS-u, a kod invertebrata na neuro-mišićnoj sinapsi. Uz to se farmakološke osobine GABA receptora vertebrata i helminta značajno razlikuju (Adams, 2001).

Benzimidazoli (*albendazol*, *mebendazol*, *fenbendazol*).- Potreba za antihelmintikom sa širokim spektrom dejstva, visokim stepenom efikasnosti, širokim granicama bezbednosti i mogućnošću da se aplikuje na različite načine, dovela je do ispitivanja koja su obuhvatila nekoliko stotina jedinjenja benzimidazola. Prvo jedinjenje iz ove grupe koje je u visokoj meri ispunilo sve navedne uslove bio je *tiabendazol*. Tokom ranih 1960-tih godina, tiabendazol se veoma intenzivno primenjivao u čitavom svetu protiv gastrointestinalnih parazita kod različitih vrsta životinja (ovce, goveda, koze, svinje, konji, ptice) i ljudi. Nakon uspeha tiabendazola, sproveden je opsežni program ispitivanja sa ciljem da se strukturnom modifikacijom ovog leka razvije grupa srodnih lekova sa sličnim ili boljim osobinama. Od nekoliko stotina sintetisanih jedinjenja, samo nekolicina je odabrana za dalje ispitivanje i razvoj, pre svega na osnovu njihove bezbednosti i efikasnosti. To su: *albendazol*, *kambendazol*, *fenbendazol*, *flubendazol*, *mebendazol*, *oksfendazol*, *oksibendazol*, *parbendazol* i *tiofanat*. Pored delovanja na odrasle oblike parazita, benzimidazoli deluju još i larvicidno i ovcidno. Mehanizam njihovog delovanja zasniva se na vezivanju za tubulin nematoda, čime se prekida njegova polimerizacija u mikrotubule. Usled oštećenja mikrotubula nastaje blokada u transportu sekretornih granula i drugih, važnih subcelularnih jedinjenja, kao što je glukoza. Benzimidazoli imaju mnogo veći afinitet za tubulin nematoda, nego sisara. Međutim, taj afinitet se može promeniti ukoliko u organizmu sisara postoje ćelije koje su u intenzivnoj deobi. To se pre svega odnosi na graviditet životinja u početnoj fazi. Zbog potencijalnog embriotoksičnog i teratogenog efekta, albendazol je kontraindikovano kod goveda i ovaca u prvih 45 dana graviditeta (Adams, 2001).

Imidazotiazoli (*levamizol*, *tetramizol*).- Najvažniji predstavnik ove grupe antihelmintika je *levamizol*. Ovaj lek je nastao iz *dl*-tetramizola, koji predstavlja racemsku smešu dva optički aktivna izomera: *l*-tetramizol (*levamizol*) i *d*-

tetramizol. U kliničku praksu je 1966. godine prvo bio uveden *dl*-tetramizol (poznat samo i kao tetramizol), a tek kasnije i njegov aktivni *l*-izomer, odnosno levamizol (Adams, 2001).

Na osnovu mehanizma dejstva, levamizol (kao i tetramizol) spada u grupu klasičnih holinomimetičkih antihelmintika, za koje je dokazano da deluju kao ligandi nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda. Ovoj grupi pripadaju još i tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel), dok organofosfatni antihelmintici (danas gotovo potpuno van upotrebe) efekat ostvaruju povećavajući koncentraciju endogenog acetilholina na receptorima. Nikotinski acetilholinski receptor se nalazi na somatskim mišićnim ćelijama nematoda i odgovoran je za koordinaciju kretanja parazita. Holinomimetički antihelmintici deluju kao i acetilholin, endogeni neurotransmiter, ali nisu osetljivi na enzim acetilholin-esterazu koja razlaže acetilholin. Generalizovano dejstvo lekova na somatske mišiće parazita izaziva spastičnu paralizu. Efekat levamizola se može potpuno blokirati mekamilaminom ili paraherkvamidom, za koje je dokazano da su specifični blokatori nAChR nematoda (Trailović i sar., 2010; Adams 2001; Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b;).

U poređenju sa benzimidazolima, levamizol i tetramizol imaju mnogo uže granice sigurnosti. Tako na primer, kod tetramizola se sigurnosne granice procenjuju u rasponu koji je za 2 do 6 puta veći u odnosu na terapijsku dozu 15mg/kg telesne mase, dok su kod levamizola ovi siguronosni parametri duplo viši od izvornog jedinjenja (tetramizola). Zbog toga je i pojava simptoma trovanja bila mnogo češća posle primene tetramizola. Klinički znaci toksičnog dejstva navedenih lekova, slični su znacima trovanja organofosfatima: pojačana salivacija i lakrimacija, podrhtavanje glave, tremor muskulature, otežano disanje i umerena razdražljivost (Adams, 2001).

Tetrahidropirimidini (pirantel, morantel, oksantel).- Pirantel je u kliničku praksu uveden 1966. godine, inicijalno za primenu protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Kasnije je započela i njegoa primena kod goveda, svinja, konja i pasa. Američka uprava za hranu i lekove (*US Food and Drug*

Administration - FDA) odobrila je primenu ovog leka kod poslednje tri navedene vrste životinja. Kao i lekovi iz grupe imidazotiazola, i tetrahidropirimidini po mehanizmu dejstva pripadaju holinomimetičkim antihelminticima koji deluju kao ligandi nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda.

Što se tiče granica sigurnosti, uopšteno posmatrano soli pirantela ne ispoljavaju bilo kakve toksične efekte kod životinja sve do približno sedmostrukog prekoračenja preporučene terapijske doze. Akutna peroralna LD₅₀ pirantel-tartarata za miševe iznosi 175mg/kg telesne mase, a za pacove 170mg/kg telesne mase. Kod pasa, akutna peroralna LD₅₀ pirantel-tartarata je čak 690mg/kg telesne mase (138 puta veća od terapijske doze). Pirantel je bezbedan za primenu kod konja i ponija svih starosnih kategorija, uključujući i ždrebac na sisi, kao i kod gravidnih kobila. Kod goveda tretiranih pirantel-tartaratom u dozi od 200mg/kg telesne mase (8 puta veća doza od preporučene), zapažena je pojava ataksije. Životinje nešto bolje podnose pirantel-pamoat od pirantel-tartarata (Adams, 2001).

Organofosfatna jedinjenja (dihlorvos, kumafos, trihlorfon).- Organofosfatna jedinjenja su prvo korišćena kao pesticidi, odnosno kao antiektoparazitici. Tek posle toga je ustanovljeno da imaju antihelmintičku aktivnost, pa je započela njihova primena u svojstvu antihelmintika. Organofosfati su inhibitori enzima acetilholinesteraze. Kao posledica inhibicije ovog enzima, dolazi do nakupljanja endogeno oslobođenog acetilholina, odnosno njegovog produženog dejstva na nikotinskim receptorima neuro-mišićne sinapse parazita, što ishodno dovodi do njegove spastične paralize. Zbog veoma uskih granica sigurnosti, usled nedovoljne selektivnosti u inhibiciji enzima acetilholinesteraze parazita, ova grupa jedinjenja danas se pominje samo u istorijskom kontekstu, dok im je klinička primena gotovo u potpunosti napuštena.

Makrociklični laktoni: avermektini (ivermektin, abamektin) i milbemicini (moksidektin).- Avermektini i milbemicini su grupa hemijski srodnih jedinjenja, nastala fermentacijom aktinomiceta *Streptomyces avermitilis* i *Streptomyces*

hygroscopicus. Svrstani su u grupu makrocikličnih laktonskih derivata, odnosno makrolida, ali za razliku od ostalih makrolidnih antibiotika avermektini i milbemicini nemaju antibakterijsko niti antifungalno dejstvo, već isključivo antiparazitsko. Njihov antiparazitski spektar delovanja obuhvata nematode i artropode.

Ivermektin spada u avermektine, koji su proizvod fermentacije aktinomicete *Streptomyces avermitilis*. Ovu gljivicu je iz uzoraka zemlje u Japanu 1975. godine izolovao istraživački tim iz Tokija. Iz produkata fermentacije *Streptomyces avermitilis* izolovane su dve komponente, nazvane A i B (označene kao A1, A2 i B1, B2), od kojih je svaka imala dva homologa a i b. Pokazalo se da komponente A1a, A2a, B1a i B2a dominiraju u fermentacionoj smeši, dok je prisustvo komponenti A1b, A2b, B1b i B2b bilo značajno manje. Najveće interesovanje privukao je abamektin, koji se sastoji iz smeše dva homologa avermektina B1a i avermektina B1b.

Ivermektin je dobijen polusintetski iz abamektina, njegovom hidrogenizacijom. Vrlo brzo posle preliminarnih ispitivanja predstavljen je široj svetskoj javnosti kao lek koji će doneti brojne novine u farmakoterapiji parazitskih bolesti životinja i ljudi. U farmakterapiju parazitskih bolesti, pre svega životinja, ovaj lek je zaista uneo puno novina: visoku efikasnost protiv nematoda i parazitskih artropoda u jako malim dozama; najčešće se primenjuje jednokratno: peroralno, parenteralno ili lokalno (spolja); posle primene ispoljava visoku efikasnost, kako protiv endoparazita tako i protiv ektoparazita; rezistencija se razvija relativno retko. Sve to imalo je za posledicu da je ivermektin jedan od najčešće korišćenih antiparazitika u veterinarskoj medicini.

Međutim, gotovo istovremeno sa ekspanzijom njegove primene, počeli su da se javljaju određeni problemi, pre svega vrlo česta neželjena i toksična dejstva. Klinički izveštaji o takvim osobinama ivermektina najčešće opisuju poremećaje CNS-a tretiranih životinja u kojima dominira različit stepen depresije. To je značilo da kod sisara ivermektin pod nedovoljno razjašnjenim okolnostima prolazi krvno-moždanu barijeru, prodire u CNS, vezuje se za

GABA-receptore i dovodi do depresije. Odmah su identifikovane i neke rase pasa pa i goveda kod kojih su najčešće zabeležena neželjena dejstva, sa objašnjenjem da su genetski predisponirane zbog veće propustljivosti krvno-moždane barijere. Međutim, sve ovo je dovedeno u pitanje kada se pojavila mogućnost da ivermektin u organizmu sisara ima multipla dejstva. Takva pretpostavka je bazirana na činjenici da je kod invertebrata otkrivena nova vrsta hloridnog kanala – glutamat-zavisnog i ivermektin osetljivog, koji predstavlja glavno ciljno mesto dejstva ivermektina kod parazita. Iz evolutivno primitivnog glutamat-zavisnog hloridnog jonskog kanala, najverovatnije se u složenijim organizmima razvilo više vrsta različitih hloridnih kanala.

Svi makrolidni antinematodni lekovi su agonisti GABA receptora. Pored toga oni pojačavaju endogeno oslobađanje ove inhibitorne aminokiseline, kao i njeno vezivanje za GABA receptore. Takođe, 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).

Tribendimidin.- Tribendimidin je jedini novi antinematodni lek koji je u poslednjih 30 godina uveden u humanu kliničku praksu. Po svojoj hemijskoj strukturi tribendimidin predstavlja simetrični diamidinski derivat *amidantela* i spada u grupu antihelmintika širokog spektra delovanja. Razvijen je u Kineskom Nacionalnom Institutu za parazitske bolesti tokom osamdesetih godina prošlog veka. Od strane Kineske državne uprave za hranu i lekove, 2004. godine je dobio dozvolu za humanu upotrebu i za ulazak u fazu kliničkih ispitivanja. Godine 2009. je prošao IV fazu kliničkih ispitivanja u Kini. Laboratorijska i klinička ispitivanja su pokazala da je tribendimidin efikasan u suzbijanju infekcija izazvanih različitim vrstama nematoda, uključujući i *Ascaris lumbricoides*, vrste iz familije *Ancylostomatidae*, *Strongyloides stercoralis*, sa ispoljenom efikasnošću od 92-96%, 52-90% i 55%. Osim jasnog antinematodnog

dejstva, tribendimidin je takođe pokazao *in vivo* efikasnost protiv trematoda i pantljičara.

Tribendimidin je agonista nikotinskih receptora. Ispitivanja koja su rađena sa tribendimidin-rezistentnim nematodama pokazala su da kod njih postoji ukrštena rezistencija na levamizol i pirantel, koji su takođe nikotinski agonisti. Genetičkim ispitivanjima je dokazano da rezistenciju na sva tri leka prouzrokuju promene u istoj grupi gena. Sve ovo potvrđuje originalnu pretpostavku da tribendimidin ima isti mehanizam delovanja kao levamizol i pirantel. Kao i ova dva leka, i tribendimidin u svom delovanju preferira L subtip nikotinskih receptora nematoda (Hu i sar., 2009).

Paraherkvamid.- Paraherkvamid spada u grupu novijih antihelmintika. Ova supstanca je fermentacioni produkt gljivice *Penicillium paraherquii*. Antihelmintička svojstva paraherkvamida prvi put su identifikovana 1990. godine, kod infekcije sa *Trichostrongylus colubriformis*. Antihelmintičko delovanje ostvaruje paralizom nematoda, bez uticaja na ATP, što je ukazivalo da ne deluje negativno na metabolizam parazita. U početku ispitivanja ovog leka, interesantan je bio nalaz da se kod pasa kao toksični efekat javlja prolapsus trećeg očnog kapka. Ovo stanje je inače često kod antagonizovanja neuronskih nAChR. Kasnije je i zaista dokazano da paraherkvamid i njegov derivat 2-deoksi-paraherkvamid deluju kao antagonisti nematodnih nAChR i sisarskih neuronskih nAChR.

Farmakološke analize su pokazale da oba jedinjenja ispoljavaju efekte tipičnih kompetitivnih antagonista nikotinskog receptora na nervno-mišićnom sistemu *Ascaris suum*. Paraherkvamid i 2-deoksi-paraherkvamid ne utiču na potencijal mišićne membrane, već samo antagonizuju efekte endogeno oslobođenog acetilholina, kao i bilo kog aplikovanog (egzogenog) nikotinskog agoniste (Robertson i sar., 2002).

Paraherkvamid i 2-deoksi-paraherkvamid ne antagonizuju podjednako dejstva svih nikotinskih agonista. Pokazano je da ove dve supstance razlikuju subtipove nikotinskih receptora prisutnih na mišićnoj membrani nematoda.

Tako, paraherkvamid na membrani mišićne ćelije *A. suum*, pokazuje veći afinitet za L subtip nikotinskih receptora. Samim tim on ispoljava jače antagonističko delovanje za levamizol i pirantel, nego za nikotin ili befinijum, koji kao agonisti deluju na N, odnosno B subtip nikotinskih receptora. Nasuprot tome, 2-deoksi-paraherkvamid pokazuje veći afinitet ka B subtipu nikotinskih receptora i najjače antagonizuje efekat befinijuma (Robertson i sar., 2002; Robertson i sar., 2007b).

Aminoacetonitrili (monepantel).- Holinergički receptori nematoda su i dalje atraktivna ciljna mesta za antinematodne lekove, a u prilog tome govori i činjenica da najnovija klasa antihelmintika, nazvana *aminoacetonitrili (AAD)*, deluje upravo na nikotinski receptor. AAD su klasa jedinjenja male molekulske mase, koji se relativno lako dobijaju alkilovanjem fenola hloracetonom. Do sada je sintetisano preko 600 jedinjenja sa različitim ariloksi- ili aroil- grupama u aminoacetonitrilnom jezgru.

Visoka efikasnost aminoacetonitrila dokazana je kod preživara. Aminoacetonitrili efikasno eliminišu četvrti larveni stadijum (L4) *Haemoncus contortus* kod ovaca i *Cooperia oncophora* kod krava, već posle jednokratne primene doze od 20mg/kg telesne mase. 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 ispoljili nisku toksičnost kod glodara i preživara. Peroralna letalna doza derivata aminoacetonitrila kod pacova iznosi preko 2g/kg telesne mase. Ispitivanja podnošljivosti različitih AAD, takođe su pokazala da se radi o jedinjenjima koja sisari dobro podnose.

Monepantel je prvi lek iz grupe AAD koji je odobren za kliničku upotrebu u veterinarskoj medicini (Kaminsky i sar., 2008; Kaminsky i sar., 2009; Sager i sar., 2009; Hosking i sar., 2009; Hosking i sar., 2010; Trailović i sar., 2010; Stein i sar., 2010;).

Kao i kod ostalih hemioterapijskih sredstava, i kod antiparazitika, a samim tim i kod antinematodnih lekova, najbitniji preduslov za njihovu primenu jeste selektivna toksičnost. To podrazumeva toksično delovanje leka na organizam parazita, bez značajnijeg štetnog delovanja na sam organizam domaćina. Selektivna toksičnost antinematodnih lekova zasniva se na razlikama u fiziologiji domaćina i parazita, specifičnostima enzimskih procesa, kao i karakteristikama farmakoloških receptora, koji su ciljno mesto dejstva leka. Ove razlike rezultat su filogenetske udaljenosti domaćina i parazita.

O stepenu i vrstama neželjenih i toksičnih dejstava antinematodnih lekova koji oni ispoljavaju na životinjama, ukratko je bilo reči u dosadašnjem delu, u okviru svake grupe lekova.

Međutim, pored toksičnosti, veoma važan problem vezan za primenu antinematodnih lekova predstavlja i rezistencija. Ova dva faktora se često međusobno uslovljavaju, u smislu da rezistencija parazita nameće potrebu za primenom viših doza lekova, a to onda dovodi do veće incidencije toksičnih dejstava na životinjama.

Uopšteno, pod rezistencijom parazita podrazumeva se smanjenje efikasnosti antihelmintičkih lekova protiv vrsta parazita koje su inače osetljive na te lekove. Primena ove definicije međutim, ima dve otežavajuće okolnosti. Prvo, polazi se od činjenice da je osetljivost određene populacije parazita na neki antihelmintik poznata, a što nije uvek slučaj. Nekada smanjena osetljivost parazita na antihelmintik nije posledica realnog razvoja rezistencije, već nekih intraspecijskih varijacija kao što su: pol parazita, različiti stadijum razvoja, geografske varijacije, pojava da ista vrsta parazita parazitira u različitim domaćinima (vrstama životinja). Takođe, ukoliko procenjivanje efikasnosti antihelmintika nije standardizovano, može doći do pogrešne interpretacije rezultata. Druga, vrlo važna činjenica odnosi se na to da je rezistencija često uslovljena promenama na genetskom nivou, a ti genetski mehanizmi razvoja rezistencije još uvek nisu dovoljno dobro razjašnjeni. Najraniji izveštaji o antihelmintičkoj rezistenciji, vezani su za parazite kod ovaca i konja. Danas

međutim, ona praktično postoji kod svih vrsta životinja koje se stavljaju u intenzivnu proizvodnju, a takođe i kod čoveka. Sumirano, ta rezistencija je prikazana u tabeli 1 (Sangster i sar., 1999).

Tabela 1. Rezistencija parazita na različite vrste antihelmintika

Domaćin i parazit	Antihelmintik
svinja <i>Oesophagostomum spp.</i>	pirantel, benzimidazoli, ivermektin
konj <i>mare strongilide</i>	fenotiazin, piperazin, pirantel, benzimidazoli
čovek <i>Schistosoma spp.</i>	hikanton, prazikvantel
ovca <i>Trichostrongylus spp.</i>	imidazotiazoli, naftalofos, benzimidazoli, avermektini/milbemicini, klosantel
<i>Fasciola hepatica</i>	benzimidazoli, triklabendazol, klosantel
goveda <i>Trichostrongylus spp.</i>	benzimidazoli, ivermektin

Razvoj rezistencije parazita na antiparazitske lekove objašnjava se nekim od sledećih procesa: (i) promenom molekularne strukture target mesta, čime lek više ne prepoznaje mesto vezivanja u parazitu; (ii) promenama u procesu metabolizma leka u parazitu, koje mogu da inaktiviraju ili uklanjaju lek ili da posle aplikacije sprečavaju njegovu aktivaciju; (iii) promenama u distribuciji leka u parazitu koje onemogućavaju dospevanje leka do ciljnog mesta; (iv) amplifikacijom target gena koja prevazilazi efekte leka (Wolstenholme i sar., 2004; James i sar., 2009; Köhler, 2001).

Mehanizmi uključeni u razvoj rezistencije prema nekoliko glavnih grupa antihelmintika, prikazani su u tabeli 2 (Wolstenholme i sar., 2004).

Tabela 2. Mogući mehanizmi razvoja rezistencije prema nekoliko glavnih grupa antihelmintika

Grupa antihelmintika	Mehanizam rezistencije
Benzimidazoli	<u>β-tubulin izotip 1 mutacije:</u> F200Y, F167Y <u>β-tubulin izotip 2 mutacije:</u> F200Y, F167Y, delecija. Promena metabolizma i/ili preuzimanja hranljivih materija
Avermektini i Milbemicini	Mutacija na GluCl i/ili GABA-R genima; Prekomerna ekspresija P-glikoproteina
Imidazotiazoli – Levamizol	Promene na nAChR

Na antihelmintike koji deluju kao agonisti nikotinskog receptora (vidi tabelu 2, levamisol), rezistencija nastaje između ostalog i promenama na nivou nAChR. Te promene obuhvataju: promenu broja receptora (redukcija broja receptora) ili receptorsku modifikaciju (promena mesta vezivanja leka na receptoru usled supstitucije aminokiselina). Pored ova dva navedena mehanizma, rezistencija na holinergičke agoniste može biti uzrokovana još i promenom u translokaciji leka u parazitu (povećan metabolizam ili ekskrecija) i post-receptorskoj modifikaciji (Robertson i sar., 2007b).

U ispitivanju rezistencije na antihelmintike koji deluju kao agonisti GABA receptora, praćeno je vezivanja radioaktivno obeleženog ivermektina za ćelijske membrane rezistentnih *Haemonchus contortus*. Ova ispitivanja su ukazala da rezistencija na ivermektin ne nastaje promenom mesta za koje se lek vezuje na parazitu, već se značaj pridaje genu koji determiniše sintezu P-glikoproteina kod parazita rezistentnih na avermektine. Tako je opisano da se osetljivost pojedinih ivermektin- i moksidektin-rezistentnih nematoda može povećati ako se istovremeno sa navedenim lekovima primene blokatori glikoproteinskih transportnih sistema (Molento i Prichard, 1999). Većina istraživača je generalno saglasna da se rezistencija na ivermektin kod nematoda i artropoda stvara mutacijom gena koji determinišu sintezu P-glikoproteinske pumpe ili gena koji determinišu sintezu glutamat-zavisnog hloridnog kanala, odnosno GABA-zavisnog hloridnog kanala (Fox, 2006).

Osim promena u samim parazitima, pojavi rezistencije značajno mogu doprineti i drugi faktori. U te faktore spadaju: kinetika leka u organizmu tretirane životinje, subdoziranje leka, brži metabolizam određenih antihelmintičkih lekova kod nekih vrsta životinja (koze) ili produžena perzistencija leka u organizmu (Sangster i sar., 1999).

U vezi rezistencije parazita, takođe je važno istaći da je njen trend kretanja teško predvidljiv. Možda su najbolji primeri za to relativno brz razvoj rezistencije *Haemonchus contortus* na ivermektin, nasuprot koga stoji odsustvo rezistencije kod *Trichostrongylus columbiformis* na isti ovaj lek, iako se radi o dve

bliske vrste parazita. Takođe, rezistencija na levamizol se relativno ređe javlja kod *H. contortus* u poređenju sa *T. columbiformis*. Ipak, na osnovu dosadašnjih ispitivanja rezistencije parazita u veterinarskoj medicini, može se konstatovati da se kod parazita sa kratkim, direktnim razvojnim ciklusom, rezistencija na antihelmintike češće razvija nego kod parazita sa kompleksnijim razvojnim ciklusom. Kod ovih drugih, postoji nekoliko stadijuma u razvojnom ciklusu, a smatra se da faktori spoljašnje sredine umanjuju tendenciju ka razvoju rezistencije (Sangster i sar., 1999).

Kod životinja koje kraći ili duži vremenski period tokom godine provode na paši (ovce, koze, goveda, konji), rezistencija nematoda je u manjem ili većem stepenu registrovana prema svim grupama antihelmintika širokog spektra dejstva: benzimidazolima (albendazol, mebendazol), imidazotiazolima (levamizol), tetrahidropirimidinima (pirantel, morantel) i makrocikličnim laktonima (ivermektini, milbemicini) (Sangster i sar., 1999).

U poređenju sa preživarima, rezistencija nematoda svinja prema antihelmintičkim lekovima je manje prisutna pojava. Intenzivna proizvodnja svinja podrazumeva isključivo zatvoreni sistem držanja („*indoor operation*“), pa je zbog toga spektar infekcije ograničen, a takođe je redukovana i prevalenca infekcije helminatima (Dangolla i sar., 1997; Kagira i sar., 2003). Ipak, prema antihelminticima koji su se intenzivno koristili kod svinja, vremenom je došlo do smanjenja osetljivosti pa i do razvoja rezistencije. Tako na primer, rezistencija na pirantel i levamizol, prvi put je identifikovana kod svinja u Danskoj krajem 80-tih i početkom 90-tih godina prošlog veka, kod *Oesophagostomum quadrispinulatum* i *O. dentatum* (Roepstorff i sar., 1987; Bjørn i sar., 1990).

Pregledom literature može se zaključiti da osim podataka o smanjenoj osetljivosti *Oesophagostomum spp.* na ivermektin, nema radova o postojanju rezistencije drugih vrsta endoprazita svinja na ovaj lek (Kagira i sar., 2003; Borgsteede i sar., 2007). Na to ukazuju i brojne studije u kojima je ispitivana klinička efikasnost ivermektina, a koje kao rezultat imaju vrlo visoku efikasnost

ovog leka (100%-tnu ili nešto nižu) protiv *A. suum*, *Metastrongylus spp.*, *Strongyloides ransomi*, *Trichuris suis* i dr. (Alva-Valdes i sar., 1989; Barth i sar., 1996; Drag i sar., 1998; Ayoade i sar., 2003; Chavhan i sar., 2009).

Međutim, nasuprot ovakvom nalazu kod svinja, rezistencija nematoda preživara je raznovrsnija i znatno raširenija pojava u svetu. Tako na primer, rezistencija na ivermektin u kliničkim uslovima dokumentovana je kod *Haemonchus contortus* ovaca i koza u Južnoj Africi, Brazilu i SAD, a rezistencija *Haemonchus contortus* i *Trichostrongylus columbiformis* kod ovaca u Australiji (Prichard, 1994). Postoje izveštaji o rezistencija *Cooperia oncophora* na ivermektin, kod pašnih goveda u Argentini (Fiel i sar., 2001). Takođe, u Argentini, druga grupa autora je izvestila i o postojanju rezistencije nematoda kod goveda držanih u farmskim uslovima. U zaključku ove studije se navodi da je *Cooperia oncophora* istovremeno ispoljila rezistenciju na avermektine i benzimidazole, a *Cooperia punctata*, *Ostertagia ostertagi* i *Haemonchus placei* rezistenciju samo na bezimidazole (Mejía i sar., 2003).

Prvi izveštaj o rezistenciji gastrointestinalnih nematoda na ivermektin, kod prirodno inficiranih teladi u Meksiku, izneli su Encalada Mena i saradnici (2008).

Što se tiče rezistencije *ektoparazita* svinja na ivermektin, za sada u literaturi nema izveštaja o postojanju ovakve vrste rezistencije. Sa druge strane, u humanoj medicini je 2004. godine prvi put dokumentovana *in vivo* i *in vitro* rezistencija *Sarcoptes scabiei* na ivermektin. Kod dva pacijenta sa višestrukim recidivima krustozne šuge ("norveška šuga"), koji su u predhodnih 4 odnosno 4,5 godine dobili 30 odnosno 58 doza ivermektina, objektivno je dokazana rezistencija šugaraca na ovaj lek (Currie i sar., 2004).

Kod domaćih životinja, prvi izveštaj o rezistenciji *ektoparazita* na ivermektin datira iz 2001. godine, a odnosi se na rezistenciju krpelja *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* kod goveda u Brazilu (Martins i Furlong, 2001). Ovi autori su *in vitro* dokazali ukrštenu rezistenciju *R. microplus* na

doramektin, ivermektin i moksidektin. Kasnije su (2006. godine) ovu vrstu rezistencije na teritoriji iste zemlje potvrdili i Klafke i saradnici (2006).

Prema najnovijim literaturnim podacima, rezistencija na *Rhipicephalus microplus* identifikovana je i na tri farme goveda u Meksiku, što je prvi izveštaj ovakve vrste za tu zemlju (Perez-Cogollo i sar., 2010).

2.2. Karakteristike agonista nikotinskog i GABA receptora

Na početku pregleda literature data je podela antinematodnih lekova na osnovu njihove hemijske strukture. Druga, vrlo česta podela koja se sreće u literaturi i na kojoj su koncipirana i ova istraživanja, odnosi se na podelu antinematodnih lekova na osnovu mehanizma dejstva na:

Agoniste nikotinskog receptora

- Nikotin
- Imidazotiazoli (levamizol)
- Tetrahidropirimidini (pirantel)
- Kvaternarna amonijumova jedinjenja (befinijum)
- Tribendimidin

Agoniste GABA receptora

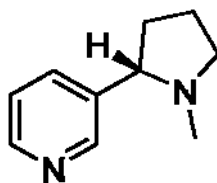
- Avermektini (ivermektin)
- Milbemicini (moksidektin)
- Pirazini (piperazin)

2.2.1. Agonisti nikotinskog receptora

Nikotin.- Nikotin je tečni prirodni alkaloid, po kome je i grupa holinergičkih receptora dobila naziv – nikotinski receptori. Ovaj alkaloid se sintetiše u korenu, a zatim akumulira u listovima biljke duvan (*Nicotiana tabacum*). U suvim listovima ove biljke nalazi se u koncentraciji od 0,5 do 8%. Istorijski počeci primene antiparazitika (insekticida) u XIX veku, vezani su upravo za ovo jedinjenje. Danas je njegova upotreba gotovo potpuno potisnuta od strane drugih, bezbednijih insekticida. Američka agencija za zaštitu prirodne sredine (US EPA), u 2008. godini zabranila je dalju registraciju pesticida na bazi nikotina, a od 2014. godine na snagu stupa i potpuna zabrana prometa ovakvih preparata. Međutim, treba reći da se danas kao insekticidi koriste sintetska jedinjenja slična nikotinu (neonikotinoide), koja imaju daleko veću selektivnu

toksičnost od prirodnog nikotina. Predstavnik ove grupe je insekticid imidakloprid.

Nikotin je beli prašak rastvorljiv u vodi. Njegova hemijska formula je $C_{10}H_{14}N_2$, a molekulska masa 162,26g/mol. Strukturna formula nikotina prikazana je na slici 1.

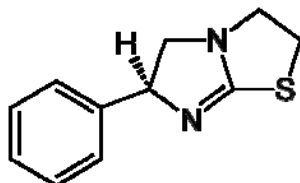


Slika 1. Strukturna formula nikotina

U formi slobodne baze (kada je najvećim delom nejonizovan), nikotin se brzo resorbuje iz respiratornog trakta, gastrointestinalnog trakta i sa površine kože i sluzokoža. Posle resorpcije, nikotin prelazi u krv i sa afinitetom od 5% se vezuje za proteine krvne plazme. Studije pokazuju da posle intravenske aplikacije ^{14}C -obeležnog nikotina, on vrlo brzo distribuira u mozak. U mozgu miševa se može identifikovati već 1 minut od intravenske aplikacije. Slični rezultati su dobijeni i pozitronskom emisijom tomografijom mozga majmuna, nakon intravenske aplikacije ^{11}C -obeležnog nikotina (IPCS INCHEM, Nicotine). Farmakokinetička ispitivanja sprovedena na ljudima, pokazuju da nikotin posle primene sublingvalnih tableta (2mg nikotona), dostiže maksimalnu koncentraciju u krvnoj plazmi (C_{max}) od 14,4ng/ml (Molander i Lunell, 2001). Volumen distribucije nikotina kod životinja iznosi prosečno 1,0L/kg, a kod ljudi 2,0L/kg kod pušača cigareta i 3,0L/kg kod nepušača. Prosečno poluvreme eliminacije iznosi 2 sata (IPCS INCHEM, Nicotine).

Levamisol.- Levamisol je širokospektralni antihelmintik, koji se koristi u kontroli endoparazita životinja i ljudi. Ovaj lek se primenjuje peroralno ili parenteralno, a kod goveda i dermalno. U zavisnosti od vrste domaćih životinja i parazita protiv kojih se primenjuje, doze levamisola se kreću od 5 do 40mg/kg t.m. U humanoj medicini se primenjuje jednokratno, u dozi od 2,5mg/kg t.m. (IPCS INCHEM, Levamisole, WHO Food Additives Series 27).

Levamisol je beli kristalni prašak, dobro rastvorljiv u vodi i etanolu. Njegova hemijska formula je $C_{11}H_{12}N_2S$, a molekulska masa 240,8. Strukturna formula levamizola prikazana je na slici 2 (International Pharmacopoeia, 2011. *Levamisole hydrochloride*).



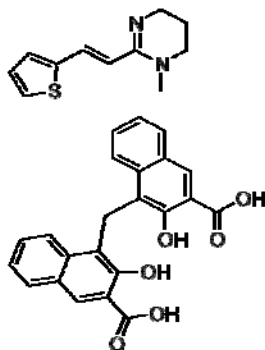
Slika 2. Strukturna formula levamizola

Farmakokinetička ispitivanja levamizola rađena su kako na eksperimentalnim životinjama, tako i na različitim vrstama domaćih životinja (ovce, svinje, goveda, živina) (IPCS INCHEM, Levamisole, WHO Food Additives Series 27). Kada je levamisol aplikovan ovcama u dozi od 7,5mg/kg t.m., na tri različita načina: subkutano, peroralno i intraruminalno, postignute maksimalne koncentracije leka u plazmi iznosile su 3,1; 0,7 i 0,8 μ g/ml (Bogan i sar., 1982). Posle jednokratne peroralne (10mg/kg) i intramuskularne doze (7,5mg/kg) 3 H-levamizola kod svinja, maksimalne koncentracije u krvnoj plazmi koje ovaj lek postiže iznose 1,34 μ g/ml posle peroralne i 1,82 μ g/ml posle intramuskularne aplikacije. Nakon dostizanja ovih maksimalnih koncentracija dolazi do njihovog laganog monoeksponencijalnog opadanja (Galtier i sar., 1983).

S obzirom na to da je levamisol indikovao i za primenu u humanoj medicini, određeni broj farmakokinetičkih podataka odnose se i na njegovu kinetiku u organizmu ljudi. Tako na primer, kod ljudi koji su tretirani jednokratnom peroralnom dozom levamizola od 1, 10 ili 50mg, maksimalna koncentracija leka u krvnoj plazmi bila je proporcionalna primenjenim dozama i zabeležena je 1 sat posle primene leka. Srednje koncentracije leka izmerene u plazmi iznosile su 25,5 \pm 8,8ng/ml i 119 \pm 42ng/ml, posle doza od 10 i 50mg. Koncentracija leka u krvnoj plazmi dobijena posle doze od 1mg nije bila statistički validna. Detekcioni limit analitičke metode u ovoj studiji iznosio je 5ng/ml (IPCS INCHEM, Levamisole, WHO Food Additives Series 33).

Pirantel.- Pirantel, zajedno sa oksantelom i morantelom, pripada antihelminticima grupe tetrahidropirimidina. Dostupan je u obliku dve soli: tartarata i pamoata (označava se još i kao embonat).

Hemijska formula pirantel-pamoata (embonata) je $C_{11}H_{14}N_2S, C_{23}H_{16}O_6$, a molekulska masa 594,7. Strukturna formula je prikazana na slici 3 (International Pharmacopoeia, 2011. *Pyrantel embonate*).



Slika 3. Strukturna formula pirantela

Pirantel-pamoat (embonat) je žuti kristalni prašak, rastvorljiv u dimetil-sulfoksidu a praktično nerastvorljiv u vodi. Nasuprot tome, pirantel-tartarat je donekle u vodi rastvorljiv. Dve pomenute soli pirantela imaju i dosta različite farmakokinetičke osobine, a posledično i različitu potencijalnu toksičnost za domaćina. Tako na primer, pirantel-pamoat (embonat) se slabo resorbuje iz digestivnog trakta i najvećim delom nepromenjen eliminiše iz organizma fecesom. Pirantel-tartarat, koji je rastvorljiviji u vodi, posle peroralne primene resorbuje se brzo i opsežno iz creva monogastričnih životinja (Plumb, 2002; Gokbulut i sar., 2001).

Kod konja, kojima je jednokratno peroralno primenjen pirantel-pamoat (embonat) u dozi od 13,3mg/kg t.m., maksimalna koncentracija leka u krvnoj plazmi (C_{max}) iznosila je $0,09 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$, a postignuta je za $7,5 \pm 1,41\text{h}$ (t_{max}) (Gokbulut i sar., 2001).

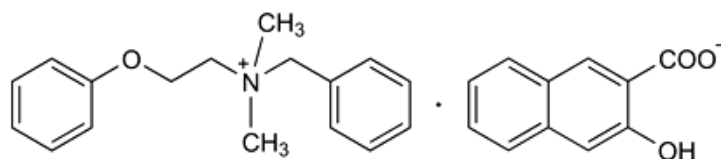
Kod pasa, posle jednokratno peroralno primenjenog pirantel-pamoata (embonat) u dozi od 10mg/kg t.m., maksimalna koncentracija leka u krvnoj

plazmi (C_{max}) iznosila je 311,8ng/ml, a postignuta je za 1,5 sat od primene leka (Morovjan i sar., 1998).

U farmakokinetičkim ispitivanjima kod svinja takođe su određivani maksimalna koncentracija leka u krvnoj plazmi (C_{max}) i vreme za koje se ta maksimalna koncentracija postiže (t_{max}). Obe soli pirantela (citrat i pamoat) primenjene su jednokratno peroralno, u dozi od: 22,0mg/kg t.m. (pirantel-citrat) i 32,84mg/kg t.m. (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}) (Bjorn i sar., 1996).

Befinijum.- Befinijum je kao antihelmintik uveden u praksu 1959. godine i primenjivao se kod ljudi, domaćih i laboratorijskih životinja protiv intestinalnih nematoda. Njegova aktivnost bila je jače izražena protiv nematoda koje parazitiraju zakačene za mukoza creva, u poređenju sa nematodama koje parazitiraju slobodne u lumenu creva. Preporučeni dozno-vremenski režim za rutinski tretman životinja iznosio je 20-25mg/kg t.m., jednokratno, a kod težih infekcija 50mg/kg t.m. jednokratno ili dve ponovljene doze od 20-25mg/kg t.m. Efikasnost befinijuma protiv nematoda koje parazitiraju zakačene za mukoza creva, bila je visoka i iznosila 99 do 100% (Burrows, 1958; Copp i sar., 1958; Jayewardene i sar., 1960).

Befinijum je kristalni prašak, žute do zelenkasto-žute boje. Praktično je nerastvorljiv u vodi, etru i benzenu, a rastvorljiv u etanolu. Njegova hemijska formula je $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_4$, a molekulska masa 443,5. Strukturna formula befinijuma prikazana je na slici 4 (Martindale The Extra Pharmacopoeia, 1982; International Pharmacopoeia, 2011, *Bephenium hydroxynaphthoate*).



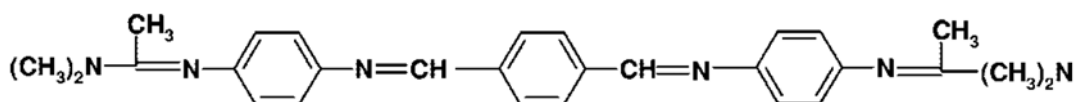
Slika 4. Strukturna formula befinijuma

Befinijum se vrlo slabo resorbuje iz digestivnog trakta, što se između ostalog može zaključiti i na osnovu njegovih visokih vrednosti LD₅₀ za peroralni način aplikacije. Tako na primer, kod miševa LD₅₀ za intraperitonealni način aplikacije iznosi 72mg/kg t.m. a za peroralni način aplikacije čak 1000mg/kg t.m. Kod majmuma, peroralna doza od 317mg/kg t.m. befinijum-hlorida ili 500mg/kg t.m. befinijuma u obliku hidroksinaftoata ili embonata, aplikovanih 5 dana nedeljno tokom 5 uzastopnih nedelja, ne dovode do značajnih promena u različitim tkivima. Međutim, posle intravenske primene, efekti leka su značajno izraženi. Zabeleženi su kratkotrajni pad krvnog pritiska kod pasa i mačaka, a takođe dolazi i do pojave bradikardije. Befinijum ispoljava i efekat blokade nekih ganglija. Intenzivna midrijaza zabeležena je kod mačaka, a kod pasa salivacija i dijareja. Na moguće dejstvo befinijuma na centralni nervni sistem ukazuju emetički efekat kod pasa, kao i respiratorna insuficijencija, koja je u letalnim ishodima bila i uzrok smrti (Young i sar., 1958).

Pored nikotina s jedne strane, i levamizola i pirantela s druge strane, i befinijum indukuje mišićnu kontrakciju preko posebnog subtipa nikotinskog receptora (B subtip). Iako se ovaj subtip nikotinskih receptora parazitskih nematoda označava upravo po befinijumu (B subtip), i danas pored intenzivnih elektrofizioloških ispitivanja, molekularna građa befinijum-senzitivnih receptora još uvek nije determinisana (Charvet i sar., 2012).

Befinijum je zabranjen od strane US FDA, ali se u nekim zemljama van SAD nalazi u prometu.

Tribendimidin.- Tribendimidin je širokospektralni antihelmintik, razvijen tokom 1980-tih godina u Kineskom nacionalnom institutu za parazitske bolesti. Supstanca je u formi žutog kristalnog praška, koji se dobro rasvara u hloroformu, slabije u dimetilformamidu, a sasvim slabo u apsolutnom alkoholu, metanolu i acetonu. Tribendimidin je nerastvorljiv u vodi. Njegova hemijska formula je C₂₈H₃₂N₆, a molekulska masa 452,60. Strukturna formula tribendimidina prikazana je na slici 5.



Slika 5. Strukturna formula tribendimidina

Što se tiče toksičnosti, vrednosti LD_{50} tribendimidina kod miševa iznose: $950 \pm 207 \text{ mg/kg}$ za peroralni način aplikacije i $277 \pm 27 \text{ mg/kg}$ t.m. za intraperitonealni način aplikacije. Kod pacova akutna peroralna LD_{50} tribendimidina je čak $2001 \pm 79 \text{ mg/kg}$ t.m.

Farmakokinetičke studije tribendimidina rađene su uglavnom na pacovima. Tako na primer, posle jednokratne peroralne primene tribendimidina kod pacova, u dozama od 45 ili 150 mg/kg t.m., maksimalne koncentracije ovog leka u krvnoj plazmi (C_{max}) iznosile su 171 i 381 ng/ml . Vremena za koja se postižu ove vrednosti C_{max} su 1,16, odnosno 1,78 sati (t_{max}). Dva sata posle peroralne primene tribendimidina pacovima u dozi od 45 mg/kg t.m., redosled organa u koje distribuira ovaj lek je sledeći: slezina, pluća, želudac, creva, srce, jetra, bubrezi, mišići, mozak i masno tkivo. Vezivanje ovog leka za proteine krvne plazme je preko 80%. Eliminacija se primarno odvija putem urina. Posle 48 sati od peroralne primene, kumulativna količina tribendimidina ekskretovana urinom odgovara vrednosti 51,5% od peroralno unetog leka.

Kod pacijenata koji su tribendimidin dobijali jednokratno peroralno u dozama od: 200mg (deca), 300mg (kod infekcija sa *A. lumbricoides*), 400mg (infekcije nematodama koje parazitiraju pričvršćene za sluzokožu creva) ili u dnevnoj dozi od 400mg tokom tri uzastopna dana (*T. trichura* infekcija), nije bilo poremećaja u rutinskim testovima krvi i urina, funkcijama jetre i bubrega i elektrokardiogramu (ECG). Samo blagi i tranzitorni neželjeni efekti koji su zabeleženi, obuhvatili su: vrtoglavicu (2,7%, 15/553), glavobolju (0,9%, 5/553), abdominalni bol (0,9%, 5/553), nauzeju (0,9%, 5/553) i dijareju (0,5%, 3/553). Ukupna stopa neželjenih efekata kod ljudi tretiranih tribendimidinom iznosila je 6,0% (33/553), što je znatno niže od 9,3% (34/364) koliko je zabeleženo sa

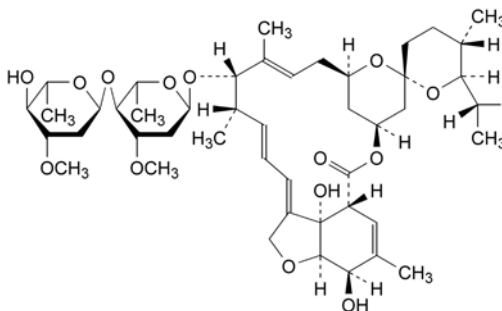
istom dozom albendazola. Ova razlika ima statističku značajnost (Shu-Hua i sar., 2005; Keiser i sar., 2007).

2.2.2. Agonisti GABA receptora

Ivermektin.- Ivermektin je u veterinarsku kliničku praksu prvi put uveden 1981. godine. Do danas je ostao jedan od najčešće primenjivanih antiparazitskih lekova u čitavom svetu, čija je visoka efikasnost dobro poznata i opisana u literaturi.

Ivermektin je endo- i ekto-antiparazitik širokog spektra delovanja. Primljen peroralno ili parenteralno efikasan je protiv odraslih i larvenih oblika (IV stadijum) nematoda gastrointestinalnog i respiratornog trakta, kao i artropoda domaćih i divljih životinja, životinja u zoovrtovima i kućnih ljubimaca. Ivermektin ne deluje na cestode i trematode (Trailović, 2001).

Ivermektin je beli ili žuto-beli kristalni prašak, neznatno higroskopan. Praktično je nerastvorljiv u vodi, a rastvorljiv u alkoholu. Strukturna formula ivermektina prikazana je na slici 6 (European Pharmacopoeia, 2007, *Ivermectin*).



Slika 6. Strukturna formula ivermektina

Visoku antiparazitsku aktivnost ivermektin ispoljava čak i ako se primeni u vrlo niskim dozama. Aktivnost mu se održava kroz duži vremenski period posle samo jednokratne aplikacije. Govedima se daje jednokratno supkutano ili peroralno u dozi od 0,2mg/kg t.m., a može se primenjivati i spolja (*pour on*), u dozi od 0,5mg/kg. Kod ovaca ovaj antiparazitik se primenjuje peroralno ili parenteralno (s.c.) u dozi od 0,2mg/kg. Konjima se ivermektin daje

peroralno u obliku gela ili solucije u dozi od 0,2mg/kg, a svinjama parenteralno (s.c.) 0,3mg/kg i peroralno u dozi od 0,4mg/kg ili 0,1mg/kg, tokom 7 dana (Trailović, 2001).

Posebno je interesantna primena ivermektina kod pasa. Psi su jedna od najugroženijih, odnosno najosetljivijih vrsta životinja, u pogledu ispoljavanja neželjenih i toksičnih efekata ovog makrolidnog antiparazitika. Ivermektin je kod pasa prvenstveno indikovano za preveniranje i lečenje infekcija sa *Dirofilaria immitis*. Primenjuje se peroralno u dozi $\geq 6\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., jednom mesečno. Ova doza ispoljava 100%-tnu efikasnost u eliminisanju infekcije srčanim crvom, delujući na larvene oblike III i IV stadijuma ovog parazita (Trailović, 2001).

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) predviđa ivermektin na listi lekova za humanu medicinu i to za lečenje helmintoza koje se prenose preko zemljišta (pre svega strongiloidoze), ali se u literaturi pre svega više pominje mogućnost efikasne primene ivermektina protiv šuge kod ljudi. Ivermektin se u poljoprivredi ne koristi kao pesticid, ali je njegov prirodni analog abamektin vrlo efikasan protiv mnogih biljnih insekata i grinja (Trailović, 2001).

Parenteralna aplikacija ivermektina prolongira njegovu apsorpciju u odnosu na peroralni način aplikacije, ali zato ima za posledicu više koncentracije u krvnoj plazmi, dužu aktivnost, a samim tim i bolju kliničku efikasnost ivermektina. U literaturi postoje dokazi da na nisku apsorpciju ivermektina posle p.o. aplikacije utiče P-glikoprotein, koji je između ostalog prisutan i u epitelu intestinuma. Tako na primer, kada se ivermektin aplikuje istovremeno sa blokatorom P-glikoproteina - *verapamilom*, maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}) i bioraspodivnost ivermektina se povećavaju, što dovodi i do povećanja antiparazitske efikasnosti.

Ivermektin je praktično nerastvorljiv u vodi, tako da njegova precipitacija u subkutisu (posle s.c. aplikacije) favorizuje prolongiranu apsorpciju sa injekcionog mesta, a samim tim i produženo prisustvo leka u krnoj plazmi. Male razlike u formulacijama preparata, mogu rezultirati znatnim promenama u antiparazitskoj efikasnosti ivermektina. Ova pojava je naročito

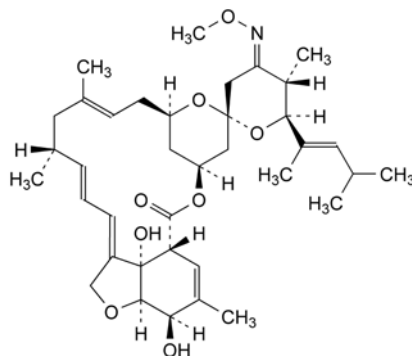
izučavana kod goveda. Tako na primer, apsorpcija ivermektina je mnogo opsežnija i brža sa vodenim vehikulumom – u poređenju sa vehikulumom koji sadrži kombinaciju propilen-glikol:glicerol-formal (60:40v/v). Kod ovog drugog nosača, biološki poluživot leka je duži, što prolongira i njegovu kliničku efikasnost.

Ivermektin aplikovan govedima s.c. ima perzistentni antihelmintički efekat protiv većine gastrointestinalnih nematoda, koji traje približno 10 dana, a protiv *Dictyocaulus viviparius* i duže, tokom 21 dana. Kod goveda, plazma koncentracija ivermektina od 0,5 do 1ng/ml optimalna je za antihelmintičku aktivnost protiv najvećeg broja gastrointestinalnih i plućnih nematoda. Plazma koncentracija od 0,5ng/ml, takođe kontroliše i infekciju štrkljevima (*Hypoderma spp*).

U poređenju sa govedima, kod ovaca ivermektin postiže niže koncentracije u krvnoj plazmi. Kod ove vrste životinja bioraspoloživost ivermektina posle s.c. načina aplikacije veoma varira: od 22% do čak 98,2%. Takođe, plazma koncentracije ivermektina su niže posle p.o. načina aplikacije u odnosu na s.c. način apikovanja. Dakle, kao i kod ostalih vrsta životinja, i kod ovaca, p.o. način primene ivermektina ima manju efikasnost i kraće trajanje dejstva protiv parazita.

Kod prasadi koja su s.c. tretirana ivermektinom, vrednosti C_{max} i AUC (*Area Under the Curve*) su signifikantno niže nego kod teladi. Smatra se da ovo stoji u korelaciji sa visokim stepenom distribucije i deponovanjem ivermektina u masnom tkivu svinja, što utiče na smanjenje plazma koncentraciju leka kod ove vrste životinja (Canga i sar., 2009).

Moksidektin.- Moksidektin je širokospektralni antiparazitski lek koji se koristi za kontrolu endo- i ekto-parazita ovaca, goveda i jelena.



Slika 7. Strukturna formula moksidektina

Moksidektin je beli ili bledo-žuti amorfni prašak. Praktično je nerastvorljiv u vodi, a dobro rastvorljiv u etanolu (96%). Njegova hemijska formula je $C_{37}H_{53}NO_8$, a molekulska masa 640,0. Strukturna formula moksidektina prikazana je na slici 7 (European Pharmacopoeia, 2007, *Moxidectin*).

Farmakokinetički parametri moksidektina kod ovaca su sledeći. Posle peroralne primene ^{14}C -moksidektina, u dozi od 0,2mg/kg t.m., vreme za koje ovaj lek postigne maksimalnu koncentraciju u krvnoj plazmi (t_{max}) je 9 sati, a maksimalna koncentracija (C_{max}) iznosi 9 μ g/kg. Nakon subkutane aplikacije moksidektina u istoj dozi (0,2mg/kg t.m.), t_{max} je 8 sati a C_{max} iznosi 12 μ g/kg.

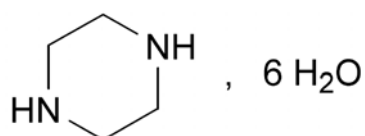
Kod goveda, posle s.c. aplikacije ^{14}C -moksidektina u dozi od 0,2mg/kg t.m., lek maksimalni pik u krvnom serumu postiže za 8 sati (t_{max}), a ta maksimalna koncentracija iznosi 60 μ g/kg.

Moksidektin je umereno toksičan posle peroralne i intraperitonealne aplikacije kod miševa i pacova. Akutna LD_{50} moksidektina kod miševa, za peroralni način aplikacije iznosi 84mg/kg t.m., a za intraperitonealni način aplikacije 86mg/kg t.m. Posle subkutanog aplikovanja moksidektin je manje toksičan, pa tako vrednost LD_{50} za ovaj način aplikacije kod miševa iznosi 263mg/kg t.m. Znaci toksičnog dejstva moksidektina kod pacova su: smanjena aktivnost, prostracija, tremor, depresija disanja, dijareja, hipersenzitivnost na zvuk i dodir, epistaksa. Kod goveda subkutano tretiranih moksidektinom, 10 puta većom dozom od preporučene (2mg/kg t.m.), uočava se blaga depresija i ataksija, koje relativno brzo nestaju. Kod trostrukog i petostrukog prekoračenja

terapijske doze, nisu zapaženi neželjeni efekti (IPCS INCHEM, Moxidectin, WHO Food Additives Series 36).

Piperazin.- Piperazin je antihelmintik koji se koristi u terapiji askaridoze svinja i živine (uključujući i nosilje). Takođe, primenjuje se i kod pasa, mačaka i konja.

To je bezbojni kristal u obliku ljuspica, dobro rastvorljiv u vodi i alkoholu. Njegova hemijska formula je $C_4H_{10}N_2 \cdot 6H_2O$, a molekulska masa 194,2. Strukturna formula piperazina prikazana je na slici 8 (European Pharmacopoeia, 2007, *Piperazine hydrate*).



Slika 8. Strukturna formula piperazina

Ovaj lek je dostupan u obliku nekoliko vrsta soli: citrat, adipat, fosfat, heksahidrat i dihidrohlorid. Svaka od navedenih soli sadrži različite količine piperazina (baze): citrat (35%), adipat (37%), fosfat (42%), heksahidrat (44%), hlorid (48%), dihidrohlorid (50-53%).

Posle peroralne primene, piperazin se brzo resorbuje iz proksimalnih partija digestivnog trakta. Kod prasadi, kojima je ^{14}C -piperazin-dihidrohlorid primenjen peroralno u dozi od 300mg/kg t.m. (ekvivalentno 154,5mg/kg t.m. piperazin baze), maksimalna koncentracija u plazmi (C_{max}) od 22,75µg/ml zabeležena je 1 sat od primene leka. Kod kokošaka nosilja, kojima je primenjena ista doza ^{14}C -piperazin-dihidrohlorida (300mg/kg t.m. - ekvivalentno 154,5mg/kg t.m. piperazin baze), pik plazma koncentracija (C_{max}) od 26,72µg/ml zabeležena je takođe 1 sat od primene leka (EMEA, 1999).

U pogledu toksičnosti, piperazin se smatra lekom sa širokim granicama sigurnosti. Akutna peroralna LD_{50} piperazin-adipata kod miševa iznosi 11,4g/kg t.m. Kod mačaka, znaci toksičnog dejstva javljaju se 24 sata posle peroralno unešene toksične doze. Ti znaci obuhvataju: povraćanje, slabost,

dispnoju, fascikulaciju mišića ušne školjke, depresiju, dehidrataciju, nistagmus, usporeni pupilarni refleksi (Plumb, 2002).

2.2.3. Aktivni sastojci esencijalnih biljnih ulja

Aktivni sastojci esencijalnih biljnih ulja su najobilnija alternativa klasičnim antiparazitskim lekovima. Ovakav status im je obezbeđen zahvaljujući veoma ubedljivim farmakološkim karakteristikama koje poseduju, izrazito niskoj toksičnosti za domaćina i izostanku rezidua u tkivima tretiranih životinja, što je za veterinarsku medicinu posebno važno. Biljke stvaraju esencijalna ulja kao produkte sekundarnog mebolizma a neki njihovi aktivni sastojci, kao što su monoterpenoidi timol, karvakrol ili diterpenoidi – eugenol, cinamaldehyd već imaju određeni farmakoterapijski značaj (Lei i sar., 2010). Dosta je proučavano insekticidno dejstvo timola i karvakrola kod voćne mušice. Na osnovu činjenice da su mutanti *Drosophila melanogaster* koji nemaju tiraminski receptor (TyrR) neosetljivi na ova dva monoterpenoida, može se konstatovati da je upravo ovaj receptor uključen u mehanizam njihovog dejstva (Enan i sar., 2005). U literaturi postoje i izvesni podaci o antinematodnim svojstvima aktivnih supstanci esencijalnih biljnih ulja. Camurca-Vasconcelos i saradnici (2007) i Kog i saradnici (2007) izveštavaju o nematocidnom dejstvu timola i karvakrola protiv *Haemonchus contortus* i *Bursaphelenchus xylophilus*. Posebno je interesantano istraživanje Lei i saradnika, (2010) koji su pokazali da timol i karvakrol u komparativnom *in vitro* ispitivanju sa mebendazolom ispoljavaju veću efikasnost protiv *A. suum*. Primenjeni u koncentraciji od 0.67mM izazivaju 99±1% i 100% letalitetu za ovog parazita. Sa druge strane mebendazol je u terapijskoj koncentraciji od 169mM, izazvao uginuće kod 95±3% tretiranih *A. suum*.

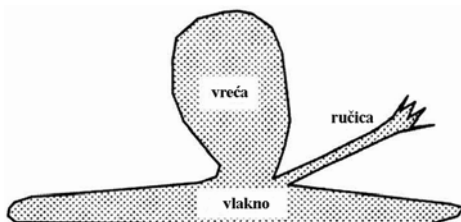
O mehanizmu antinematodnog dejstva timola i karvakrola se malo zna. Lei i saradnici (2010) su dokazali da ova dva aktivna principa esencijalnih biljnih ulja aktiviraju tiraminski receptor nematoda (*C. elegans*), čija je ekspresija

izvršena na ćelijama sisara. Pirri i saradnici (2009) su publikovali istraživanje da tiraminski receptor kod slobodnoživuće nematode *C. elegans* reguliše njeno kretanje aktivacijom specifičnog hloridnog kanala, što bi moglo da predstavlja ključ definisanja antinematodnog dejstva monoterpenoida.

2.3. Nervno-mišićni sistem nematoda

Ispitivanja mehanizama dejstva neurotransmitera i antihelmintičkih lekova, dominantno su rađena na dve vrste nematoda. Jedna vrsta je *Caenorhabditis elegans*, neparazitska nematoda dužine oko 1mm, koja slobodno živi u zemljištu, a druga je *Ascaris suum*, parazitska nematoda koja parazitira u tankim crevima svinja. *A. suum* predstavlja veoma dobar eksperimentalni model iz nekoliko razloga: relativno lako se može dobiti od svinja *post mortem* – na klanicama, njena veličina (dužina 20-30cm, prečnik oko 5mm) omogućava lakše seciranje u poređenju sa manjim nematodama, i na kraju, filogenetski je bliska sa drugim parazitskim nematodama, tako da i njih dobro reprezentuje.

Somatske mišićne ćelije *A. suum* imaju drugačiju strukturu u poređenju sa istom vrstom ćelija kod kičmenjaka. Kao što je prikazano na slici 9, mišićne ćelije askarisa poseduju 3 različita regiona: vretenasti ili vlaknasti, vrećasti i region ručice. Ovakva struktura uslovljena je njihovom funkcijom.

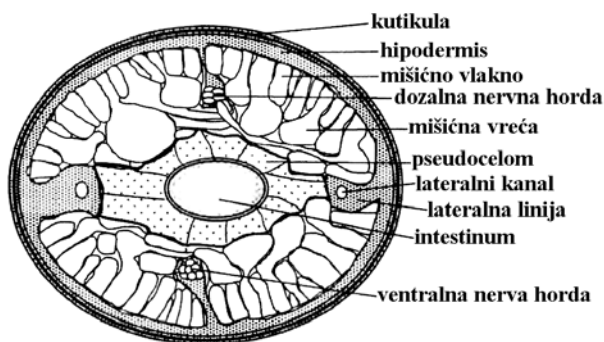


Slika 9. Različiti regioni mišićne ćelije *Ascaris suum*

Somatske mišićne ćelije *A. suum* raspoređene su longitudinalno u odnosu na osu tela i mogu se podeliti u dve grupe: dorzalnu i ventralnu. Dorzalna grupa mišićnih ćelija inervaciju dobija od motornog aksona poreklom iz dorzalne nervne vrpce, a ventralna grupa od motornog aksona poreklom iz ventralne nervne vrpce. Zbog ovakvog grupisanja mišićnih ćelija, talasi kontrakcija nematode propagiraju duž njenog tela dvodimenzionalno, u dorzo-ventralnoj ravni. To znači da se nematoda može kretati unapred i unazad.

Vretenasti deo mišićne ćelije sadrži aktin i miozin, te predstavlja kontraktilni deo ćelije. Aktin i miozin nematode raspoređeni su tako da formiraju prugavost mišića, kao i u skeletnoj muskulaturi kičmenjaka, s tom razlikom da u mišićima telesnog zida nematoda prugavost nije poprečna (perpendikularna) kao kod kičmenjaka. Umesto toga, mišić nematoda ima kosu prugavost, što daje mogućnost za brze kontrakcije.

Vrećasti deo mišićne ćelije sadrži jedro i bogat je glikogenom i mitohondrijama. Zbog toga funkcioniše kao energetska odeljak mišićne ćelije. Takođe, postoje i argumenti koji govore u prilog potpunoj ulozi vrećastog dela mišićne ćelije. Kod intaktnog parazita, vrećasti deo je ispupčen unutra, ka crevu parazita (Slika 10). Smatra se da turgor mišićne vreće daje potporu nematodi, delujući tako kao neka vrsta endoskeleta. Zbog restriktivnog broja ćelija kod nematoda, po završetku ćelijskih deoba rast parazita se nastavlja ćelijskom ekspanzijom. Kao rezultat toga sve ćelije nematoda su relativno velike. Tako na primer, kod adultnih *A. suum* mišićna vreća je prečnika 100-200 μ m, što recimo omogućava lako aplikovanje elektroda za elektrofiziološke studije.



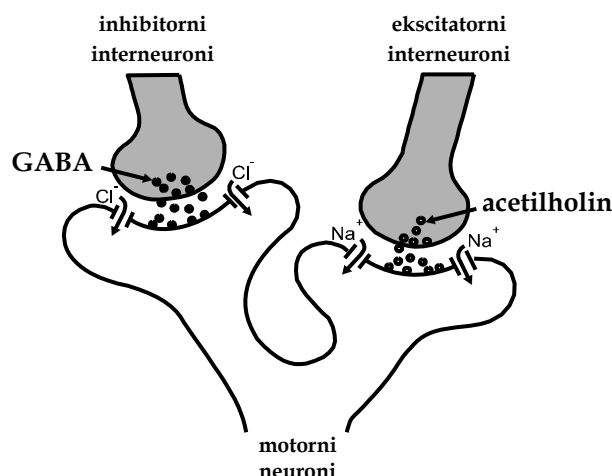
Slika 10. Poprečni presek *Ascaris suum* u predelu 4 cm od glavenog regiona

Mišićna ručica predstavlja vezu između mišićne ćelije i nervne horde. Neuro-muskularna integracija *A. suum* razlikuje se značajno od one koji postoji kod kičmenjaka po tome što mišićna ćelija nematode pravi projekciju prema neuronu, dok je kod kičmenjaka to obrnuto. Svaka mišićna ćelija nematode ima jednu ili više ručica koje se pružaju prema nervnoj vrpici u hipodermisu. Na svom završetku, mišićne ručice se granaju u nastavke koji se zatim udružuju sa

istim takvim nastavcima drugih ručica, gradeći sincicijum, odnosno funkcionalnu mrežu oko nervne vrpce. Individualno, nastavci ručica su međusobno povezani vrstom tesne veze (*tight junctions*) koja obezbeđuje električnu provodljivost između mišićnih ćelija. Sinapse postoje na vezama između terminalnog grananja mišićnih ručica i nerva.

Faringealna muskulatura.- Farinks adultne *A. suum* predstavlja jedna posebna grupa mišićnih ćelija (električno kuplovanih), koje formiraju mišićnu cev u predelu glavenog regiona. Oblik farinksa varira u zavisnosti od vrste nematode, a njegov osnovni zadatak je da hranljive materije iz okoline pumpa u crevo askarisa. Kod *A. suum* to je veliki organ, približne dužine 1cm, čiji je lumen je zatvoren kada su mišićne ćelije relaksirane, dok njihove kontrakcije otvaraju lumen (Marr i sar., 2003).

Nervni sistem A. suum.- Nervni sistem *A. suum*, kao i kod ostalih nematoda, je konzistentan i relativno jednostavan. Sastoji se od oko 300 neurona (senzornih i motornih) koji su najviše koncentrisani u glavenom i repnom regionu. U prednjem delu tela nematoda, oko farinksa, nalazi se cirkumfaringealni nervni prsten koji predstavlja neku vrstu primitivnog mozga. Od njega polaze dorzalna, lateralna i ventralna nervna vrpca, unutar longitudinalnih hordi. Mišićne ćelije dobijaju inervaciju od dorzalnog i ventralnog nerva, dok je lateralni nerv povezan sa ekskretornim kanalom. Najveći od ova tri nerva je ventralni (Marr i sar., 2003; Trailović, 2001). Između motoneurona i ventralne nervne vrpce nalaze se relejne ćelije ili interneuroni. GABA je neurotransmiter uključen u slanje inhibitornih impulsa iz interneurona u motoneurone. Ovo je bio ključ za objašnjenje mehanizma nematocidnog delovanja avermektina, pa su mnogobrojna elektrofiziološka ispitivanja dokazala da su oni agonisti za GABA-ergičke receptore. Avermektini, pa i ivermektin, potenciraju GABA efekte na sinapsama, i to tako što stimulišu presinaptičko oslobađanje GABA-e i povećavaju njeno postsinaptičko vezivanje za GABA-ergičke receptore (Slika 11).



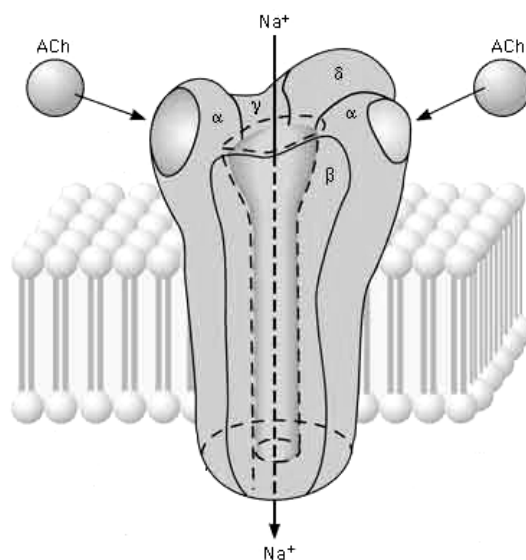
Slika 11. Mehanizam dejstva ivermektina na nervnoj sinapsi *Ascaris suum*

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. U prisustvu ivermektina hloridni kanal je otvoren i kada bi trebalo da bude zatvoren te joni hlora ulaze u ćeliju, iako bi trebalo da ulaze samo joni natrijuma. Motoneuron tako postaje negativno naelektrisan (niska električna rezistencija) i na taj način signali (inhibitorni i ekscitatorni) ne mogu biti registrovani u ćelijama recipijentima. Motoneuroni i mišićne ćelije su spremne za “akciju” ali ne dobijaju odgovarajući signal. Na taj način dolazi do paralize i smrti parazita (Trailović, 2001).

2.4. Karakteristike holinergičkih receptora i GABA receptora sisara i nematoda i mehanizmi dejstva njihovih agonista

2.4.1. Holinergički receptori sisara

Nikotinski receptori su tipični predstavnici jonskih kanala koje otvara ligand (ligand-zavisni jonski kanali; "ligand-gated ion channels"). Sastoje se iz ukupno 5 subjedinica, a oligomerna struktura (2α , β , γ , δ) poseduje dva mesta za vezivanje acetilholina. Da bi se receptor aktivirao potrebno je da se za njega vežu 2 molekula acetilholina (Slika 12).



Slika 12. Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR)

Kod vertebrata postoje dva glavna tipa nAChR: neuro-mišićni i neuronski tip. *Neuronski tip* nikotinskog receptora nalazi se u CNS i svim autonomnim ganglijama. S druge strane, *neuro-mišićni tip* receptora je lokalizovan na neuro-mišićnim sinapsama skeletne muskulature i stimulacija ovih receptora dovodi do mišićne kontrakcije. Na postsinaptičkoj mišićnoj membrani identifikovana su tri subtipa 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). Dakle, moguće je da kanal bude i pentamerni monomer, koga čine samo α -subjedinice. Kod vertebrata postoji najmanje 12 α -subjedinica i 3 β -subjedinice,

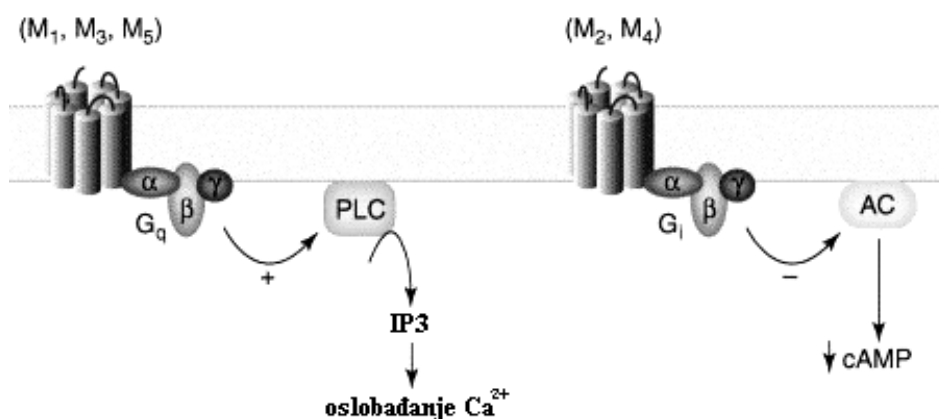
ali samo ograničeni broj njih gradi funkcionalne receptore. Tako na primer, samo subjedinice od $\alpha 7$ do $\alpha 12$ čine homomerni kanal (bez kombinacije sa β -subjedinicama). Različiti homomerni i heteromerni receptori imaju različite farmakološke karakteristike (Robertson i sar., 2007b).

Pored klasičnog mišićnog tipa nAChR koji sadrži $\alpha 1$ subjedinicu, neuro-mišićna sinapsa sadrži i presinaptički $\alpha 2\beta 3$ 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). Nasuprot tome, odsustvo ovog efekta tokom neuro-mišićne 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).

Acetilholin na nivou neuro-mišićne sinapse deluje tako što aktivira nikotinski receptor. Značajan je podatak da koncentracija ACh koja se oslobađa na neuro-mišićnim sinapsama vertebrata, može da dostigne koncentraciju i do 5mM (Puttacharya i sar., 2013). Aktivacija nikotinskog receptora ima za posledicu otvaranje natrijumovih jonskih kanala i nastanak brze depolarizacije, koja inicira generisanje akcionog potencijala u mišićnom vlaknu. U prisustvu funkcionalne acetilholinesteraze, u intaktnoj neuro-mišićnoj sinapsi, bilo koji molekul acetilholina uspe da aktivira najviše jedan nikotinski receptor, pre nego što biva razgrađen. Funkcija ovog enzima je upravo da ograniči koncentraciju acetilholina u sinaptičkoj pukotini i vreme prisustva acetilholina na postsinaptičkoj mišićnoj membrani, i tako spreči produženo delovanje neurotransmitera na nikotinskim receptorima. Ova ograničavajuća dejstva acetilholinesteraze su veoma važna, jer pod određenim uslovima i sam acetilholin može da izazove nervno-mišićnu blokadu. Do ove pojave dolazi kada je acetilholin na motornoj ploči prisutan u dovoljno visokoj koncentraciji (ACh veštački aplikovan u višim koncentracijama od fizioloških, inhibicija acetilholinesteraze). Pojava koja se u ovim uslovima javlja naziva se “blokada

depolarizacijom” i do nje dolazi usled produžene depolarizacije postsinaptičke mišićne membrane (Bowman, 2006; Rang i sar., 2005).

Muskarinski receptori pripadaju grupi receptora vezanih za G-protein (*G-protein-coupled receptors*), a ova grupa se nazivaju još i *metabotropni receptori*. G-protein vezani receptori predstavljaju monomere koji se sastoje od 7 transmembranskih segmenata. Jedna od intracelularnih petlji, veća je nego ostale i stupa u interakciju sa G-proteinom. Ovaj protein je membranski protein, koji se sastoji od 3 subjedinice (α, β, γ), pri čemu α -subjedinice poseduju aktivnost GTP-aze. Kada se molekul agoniste veže za muskarinski receptor, dolazi do konformacijskih promena, uključujući i citoplazmatski deo receptora. To za posledicu ima disocijaciju G-protein trimera, oslobađajući α -subjedinicu od $\beta\gamma$ -subjedinice. Ovo je “aktivna forma” G-proteina koji difunduje u membranu i može da se udruži sa različitim enzimima i jonskim kanalima, prouzrokujući aktivaciju ili inaktivaciju (slika 13). Do sada je otkriveno 5 različitih tipova muskarinskih receptora. Pri tome su tri tipa (M_1 – “nervni”; M_2 – “srčani”; M_3 – “glatkomišićni i žlezdani”) dobro ispitani i opisani. Za tipove M_4 i M_5 zna se da su lokalizovani u CNS-u, ali njihova uloga nije u potpunosti objašnjena.



Slika 13. Tipovi muskarinskih receptora

Aktivacija članova neparne grupe (M_1, M_3, M_5) muskarinskih receptora dovodi do stimulacije inozitol-fosfatnog puta (IP3 put), dok aktivacija

muskarinskih receptora parne grupe (M_2 , M_4) ima za posledicu inhibiciju enzima *adenilat-ciklaze* i smanjenje intracelularne koncentracije cAMP (Slika 13) (Rang i sar., 2005).

2.4.2. Holinergički receptori nematoda

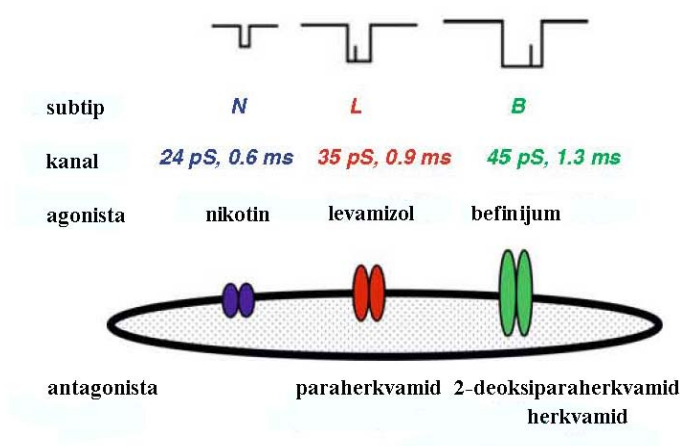
Smatra se da su nematode najniži evolutivni filum koji kao neurotransmiter koristi ACh (Colquhoun i sar., 1991). Glavne strukturne odlike nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) evolutivno su ostale dobro konzervirane, tako da sličnosti postoje čak i među filogenetski jako udaljenim organizmima, kao što su nematode i sisari. Drugim rečima, mišićni nAChR nematoda pokazuju farmakološke i biofizičke sličnosti sa jednim tipom nAChR vertebrata (neuronski tip). Ipak, između nAChR nematoda i sisara postoje i signifikantne farmakološke razlike, na kojima se upravo i zasniva selektivni terapijski efekat antinematodnih lekova (levamizol, pirantel), koji deluju na mišićne receptore nematoda, uz minimalni toksični efekat na mišiće životinje (domaćina parazita).

Nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) se nalazi na somatskim mišićnim ćelijama nematoda i odgovoran je za koordinaciju kretanja parazita. Holinomimetički antihelmintici deluju kao i acetilholin, endogeni neurotransmiter, s tom razlikom što nisu osetljivi na enzim acetilholinesterazu (AChE) koja razlaže acetilholin. Generalizovano dejstvo lekova na somatske mišićne parazita izaziva spastičnu paralizu. Na celularnom nivou, ova grupa antihelmintika dovodi do povećanja ulazne provodljivosti i posledične depolarizacije ćelije nastale otvaranjem neselektivnih katjonskih kanala. Na nivou pojedinačnih jonskih kanala, levamizol kao tipični predstavnik ove grupe lekova, otvara neselektivni katjonski kanal (provodljivost 18-50pS, vreme otvorenosti 1-5ms). Efekat levamizola se može potpuno blokirati mekamilaminom ili paraherkvamidom, za koje je dokazano da su specifični blokatori nAChR nematoda (Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b; Trailović i sar., 2010).

Svi nAChR su sastavljeni od 5 proteinskih subjedinica. Najznačajniji podaci o ovom receptoru su dobijeni ispitivanjima na *Torpedo californica* (električna raža), a pretpostavlja se da i nikotinski receptor nematoda ima vrlo sličnu strukturu. Nikotinski acetilholinski receptori (nAChR) sadrže dve (ili više) α -subjedinica i tri (ili manje) ne- α -subjedinica. One su postavljene u krug oko centralne pore, formirajući tako transmembranski jonski kanal. Jonsku poručine drugi transmembranski regioni (TM2) poreklom od svake subjedinice. Negativno naelektrisane amino-kiseline (glutamat, aspartat) u ovom TM2 regionu regulišu provodljivost kanala, njegovu katjonsku selektivnost i nivo propustljivosti za kalcijum (Robertson i sar., 2007a).

Za razliku od vertebrata, kod nematoda nije potpuno poznata stohiometrija nikotinskog receptora. Zna se da veći broj gena enkodira sintezu različitih subjedinica nikotinskog receptora nematoda i da one po raznolikosti nadmašuju subjedinice vertebrata. Ovo ukazuje na veliki diverzitet tipova nikotinskih receptora nematoda. Farmakološki gledano, nikotinski receptor nematoda je sličniji neuronskom tipu receptora vertebrata, jer je recimo neosetljiv na blokadu α -bungarotoksinom. Za razliku od vertebrata, kod adultnih nematoda je dokazano više tipova nAChR na mišićnim ćelijama (Robertson i sar., 2007a). Kod *Caenorhabditis elegans*, slobodno živeće nematode, mogu se diferencirati dve struje koje nastaju kada acetilholin otvori kanal: prva, nazvana nikotin-osetljiva struja, koja se može blokirati dihidro- β -eritroidinom, a preferira nikotin kao agonistu, i druga, nazvana levamizol-osetljiva struja, koja je neosetljiva na dihidro- β -eritroidin a preferira levamizol kao agonistu. Kod velike nematode svinja, *A. suum*, dokazana su tri tipa nAChR na mišićnoj membrani: L-tip (preferira levamizol i pirantel kao agonistu), N-tip (preferira nikotin i oksantel kao agonistu) i B-tip (preferira befinijum kao agonistu) (Slika 14). Levamizol aktivira L-tip kanala, ali u manjoj meri otvara i N i B-tip kanala. Befinijum pre svega otvara B-tip kanala, ali i L-tip, dok na N-tip ne deluje. 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).



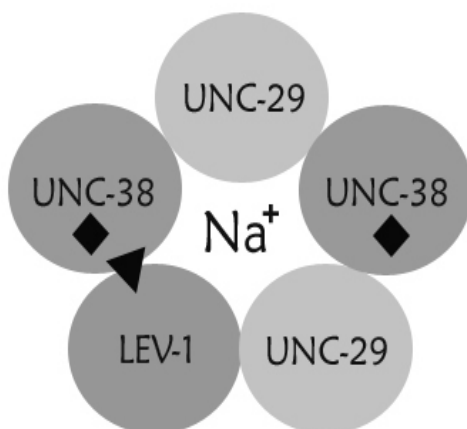
Slika 14. Subtipovi nAChR na mišićnim ćelijama *Ascaris suum*

Kao što se vidi, antihelmintici koji deluju kao agonisti nikotinskog receptora, pokazuju selektivnost za različite tipove nikotinskog receptora. Ovo je naročito važno imati u vidu prilikom kombinovanja različitih antihelmintika u terapiji parazitskih infekcija, kao i prilikom pojave rezistencije na jedan tip antihelmintika i izbora novog antihelmintika kojim će se takva infekcija tretirati. Među najčešće korišćenim holinergičkim antihelminticima su levamizol i pirantel. Oba leka imaju istu selektivnost za L-tip nikotinskog receptora nematoda, pa bi njihovo kombinovanje u terapiji bilo neopravdano, a levamizol-rezistentni mutanti će ispoljiti rezistenciju i na pirantel. Oksantel pokazuje drugačiju selektivnost u odnosu na pirantel, iako oksantel i pirantel po hemijskom sastavu pripadaju istoj grupi – tetrahidropirimidinima. Naime, oksantel pri svom delovanju preferentno aktivira N-tip nikotinskog receptora. Ova činjenica može objasniti drugačiji spektar antiparazitske aktivnosti oksantela, u odnosu na pirantel (Martin i sar., 2004).

Selektivnost za pojedine tipove nikotinskih receptora prisutna je i kod njihovih antagonista, kakvi su paraherkvamid i 2-deoksi-paraherkvamid (Slika 14). Paraherkvamid antagonizuje efekte L-selektivnih nikotinskih agonista

(levamizol, pirantel), dok 2-deoksi-paraherkvamid, specifično antagonizuje B-selektivne agoniste (befinijum) (Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b).

Na osnovu dosadašnjih saznanja konstruisan je model potencijalnog sastava jedne vrste nikotinskog receptora nematoda, prikazan na slici 15. Receptor se sastoji iz 5 proteinskih subjedinica koje okružuju centralnu jonsku poru. UNC-38 je subjedinica homologna α -subjedinici vertebrata, UNC-29 i LEV-1 su subjedinice homologne β -subjedinici vertebrata. Interfejs između α i ne- α subjedinice gradi mesto za vezivanje nikotinskih agonista (trougao). Analogno α -subjedinici vertebrata, svaka UNC-38 može da sadrži mesto vezivanja acetilholina (četvorougao) (Köhler, 2001).



Slika 15. Model nikotinskog receptora nematoda koga otvara acetilholin (◆) i levamizol (▲)

Jedno od osnovnih pitanja vezanih za sam mehanizam dejstva holinergičkih agonista je njihova selektivna toksičnost. Iz gore navedenog proizilazi da je levamizol puni agonist nAChR na mišićima nematoda. Osnovno pitanje je kako levamizol deluje na isti receptor u mišićima sisara. Elektrofiziološkim metodama ispitivanja (merenjima provodljivosti pojedinačnog kanala) ustanovljeno je da ovaj antiparazitik aktivira nikotinski acetilholinski receptor sisara. Međutim, otvaranje pojedinačnog kanala traje kraće u odnosu na efekat klasičnog neurotransmitera acetilholina i ne dolazi do serije otvaranja u obliku klastera, kada se primene više koncentracije leka.

Maksimalna struja koja nastaje posle otvaranja kanala levamizolom je svega 3% struje koju izazove acetilholin. Može se zaključiti da levamizol deluje kao slabi agonist nAChR sisara. Takođe, levamizol izaziva blokadu otvorenog kanala nAChR. Afinitet kojim izaziva blokadu (190 μ M, -70mV) je sličan kao i kod nematodnog receptora, što ukazuje na to da se radi o različitoj osetljivosti receptora nematoda i sisara prema levamizolu, iz koje onda proističu i razlike u kinetici otvaranja kanala. Poznato je da se α -subjedinica nAChR nematoda i sisara razlikuje. Kada se u nAChR sisara aminokiselina α Gly-153 zameni homolognom glutaminskom kiselinom nematoda, dolazi do signifikantnog povećanja osetljivosti nAChR sisara prema levamizolu. Ovo je pravo objašnjenje selektivnog dejstva levamizola na nikotinski receptor parazita, bez značajnijih efekata na nikotinske receptore domaćina (Rayes i sar., 2004).

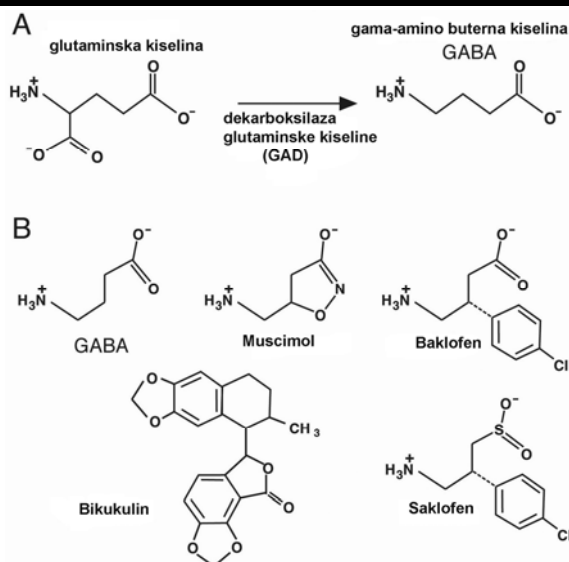
Ispitivanja sa proteinskim kinazama, odnosno njihovim inhibitorima, ukazala su na nove podatke, da i postreceptorska modifikacija može promeniti odgovor na lek i kao takva učestvovati u smanjenoj reakciji kod parazita koji su rezistentni na antiparazitik. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost da rezistencija 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).

Nikotinski receptor nematoda jeste najčešće razmatran kao ciljno mesto delovanja holinergičkih antinematodnih lekova. Međutim, poznato je da nematode poseduju i *muskarinske holinergičke receptore*. Kao i kod sisara, i kod nematoda 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. Detaljniji podaci o farmakologiji nematodnog muskarinskog receptora su ipak oskudni. Zato ove receptorske strukture zahtevaju dalja detaljna ispitivanja radi definisanja njihove uloge u nervno-mišićnom sistemu nematoda i utvrđivanja mogućnosti da budu iskorišćene u razvoju novih antinematodnih lekova (Trailović i sar., 2008; Trailović i sar., 2010).

2.4.3. GABA receptori sisara i nematoda

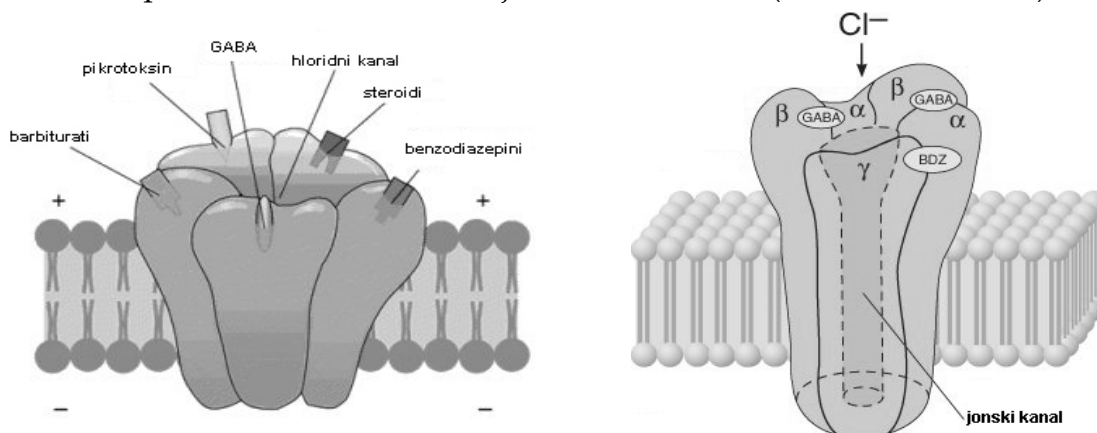
Kao što je rečeno, nematode su verovatno najniži evolutivni filum koji kao neurotransmiter koristi ACh (Colquhoun i sar., 1991). U odnosu na to, GABA je evolutivno još starija. Istraživanja su pokazala da je ona kao ne-proteinska aminokiselina evolutivno konzervisana još od nekih vrsta bakterija i biljaka i da je prvenstveno imala metaboličku ulogu. Pouzdano se zna da se kod biljaka i vertebrata GABA metaboliše u jednom kratkom metaboličkom putu, nazvanom GABA šant, jer u dva koraka predstavlja "bypass" ciklusa trikarbonskih kiselina (Bouche i Fromm, 2004). Kao signalni molekul, odnosno kao neka vrsta transmitera, GABA evolutivno takođe doseže daleko unazad. Kod nekih vrsta biljnih bakterija, uključujući i *Erwinia spp.*, identifikovani su specijalizovani receptori uključeni u signalizaciju posredstvom GABA-e, a koji su verovatno nastali tokom rane evolucije proteobakterija (Spurny i sar., 2012). Nadalje, kod hidrozoo (*Hydra vulgaris*), koje poseduju arhaični i najjednostavniji nervni sistem, dokazano je da GABA smanjuje izlaz impulsa iz njihovih različitih generativnih sistema od kojih zavisi funkcionisanje vitalnih procesa. Kod nekih pljosnatih crva (*plathelminthes*) kao što je *Gastrothylax crumenifer*, kod kojih se evolutivno prvi put pojavljuje primitivni centralni nervni sistem, GABA takođe ima inhibitorni efekat u pogledu neurotransmisije. Konačno, kod nematoda GABA predstavlja glavni inhibitorni neurotransmiter (Gou i sar., 2012).

GABA je glavni inhibitorni neurotransmiter u mozgu sisara. Nastaje iz glutamata, delovanjem dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD) (Slika 16).



Slika 16. (A) Sinteza GABA-e iz glutaminske kiseline, posredstvom enzima GAD; **(B)** Supstance koje deluju preko GABA receptora: *muscimol* je GABA_A agonista, a *baklofen* GABA_B agonista; *Bikukulin* je GABA_A antagonista, a *saklofen* GABA_B antagonista. GABA receptor invertebrata neosetljiv je na delovanje bikukulina (Jorgensen, 2005)

Dejstvo GABA-e se završava uglavnom njenim preuzimanjem od strane GABA-ergičkih neurona, a manjim delom i deaminacijom koju katalizuje GABA-transaminaza. Kod sisara postoje tri tipa GABA receptora: GABA_A, GABA_B i GABA_C receptor. GABA_A i GABA_C receptori su hloridni jonski kanali, dok je GABA_B po tipu metabotropni (*G protein-kuplovani*) receptor. Iako GABA_A i GABA_C receptori pripadaju istoj vrsti (ligand-zavisni jonski kanali; “*ligand-gated ion channels*”), između njih postoje farmakološke, molekularne i funkcionalne razlike. GABA_A je najčešći inhibitory receptor u mozgu, dok je GABA_C receptor lokalizovan u mrežnjači oka vertebrata (Lukasiewicz, 1996).



Slika 17. GABA_A receptor

Pored visoke efikasnosti i široke primene u terapiji parazitskih infekcija, ivermektin i drugi avermektini veliku pažnju privlače i zbog specifičnog antiparazitskog mehanizma delovanja, kao i veoma neuobičajenih neželjenih efekata kod domaćina. Mesto delovanja ivermektina je glutamat-zavisni Cl⁻ jonski kanal (GluClR) – koji postoji samo kod invertebrata, kao i GABA receptor (Trailović i sar., 2011). Dakle, GluClR ne postoji kod sisara, međutim on je evolutivno i strukturno povezan sa glicin-hloridnim kanalom sisara (Trailović i sar., 2007).

Za razliku od vertebrata, gde GABA primarno deluje u sinapsama CNS-a, kod invertebrata ona deluje na neuro-mišićnoj sinapsi. Posebno kod nematoda, GABA deluje na relaksaciju telesne muskulature, otvaranjem hloridnih kanala. GABA receptori invertebrata ne uklapaju se u klasifikaciju sisarskih GABA receptora (GABA_A, GABA_B, GABA_C), ali je ipak većina njih slična sisarskom GABA_A tipu receptora (Holden-Dye i sar., 1989; Trailović i sar., 2011).

Ivermektin i ostali avermektini ispoljavaju neželjene efekte koji su uglavnom povezani sa GABA-ergičkom neurotransmisijom. Najizraženiji neželjeni klinički efekti ivermektina, zabeleženi kod pasa, ovaca, svinja, konja i drugih vrsta životinja su: tremor, ataksija, CNS depresija i koma, koja često rezultira i uginućem. S druge strane, nema literaturnih podataka o neurotoksičnom dejstvu ivermektina kod ljudi, kod kojih je ovaj lek najčešće korišćen u terapiji filarioze. Ovo se objašnjava visokom efikasnošću p-glikoproteina, dobro konzervisanog humanog transmembranskog proteina, koji ima centralnu ulogu u limitiranom prelasku leka u moždano tkivo. Kod domaćih životinja, depresivni efekat ivermektina je veoma česta pojava i može uključivati više od jednog mehanizma.

Efekat ivermektina na sisarski GABA_A receptor obuhvata potenciranje dejstva GABA-e, kao i direktnu reverzibilnu aktivaciju receptora. Postoje takođe i mišljenja da avermektini deluju i preko mesta vezivanja benzodiazepina na GABA-receptorskom jonofornom kompleksu hloridnog

kanala. Ovo je potvrđeno posredstvom nekih karakteristika CNS depresije prouzrokovane ivermektinom, koje su bile vrlo slične poznatim efektima benzodiazepina. Pored toga, poznato je da ivermektin u studiji sa radioaktivno obeleženim [3H]strijninom, potiskuje strijnin i pokazuje značajna antikonvulzivna svojstva u strijnin-indukovanim konvulzijama, što znači da neke efekte može ispoljiti i na glicinskom receptoru (GlyR). Konačno, ivermektin je ispoljio i potenciranje acetilholinom-izazvanog odgovora na rekombinantnom neuronskom $\alpha 7$ nikotinskom acetilholinskom receptoru (nAChR). Ovakav efekat se objašnjava činjenicom da je on pozitivni alosterični efektor koji modifikuje farmakološki profil neuronskog $\alpha 7$ nAChR. Neuronski nAChR su prisutni presinaptički i na ostalim transmitterskim sistemima, gde vrše modulaciju oslobađanja transmitera. Među subtipovima koji posreduju u ovim efektima, ključnu ulogu ima subtip $\alpha 7$ nAChR. Zajedno, ovi receptori koji su lokalizovani presinaptički, utiču između ostalog i na oslobađanje glutamata, GABA-e, noradrenalina i dopamina. Ukoliko se koristi analogija između opisanih efekata ivermektina i nekih benzodiazepina (midazolam), može se pretpostaviti da je ivermektin kao i midazolam sposoban da poveća oslobađanje GABA-e preko $\alpha 7$ nAChR. Ovo može biti dodatni inhibitorni mehanizam dejstva ivermektina na CNS, zajedno sa već dobro poznatim agonističkim efektom na GABA_A receptoru (Trailović i sar., 2011).

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. Pri tom, ivermektin nema efekat na srednju efektivnu koncentraciju (EC_{50}) ali smanjuje maksimalni odgovor mišićne kontrakcije *A. suum* izazvane ACh, na sličan način kao i abamektin. Takođe, ivermektin se ponaša i kao inhibitor *C. elegans* ACR-16 nAChR, koji je genetičkim inženjeringom eksprimiran na oocitima *Xenopus*-a (Puttacharya i sar., 2013).

3. Ciljevi i zadaci rada

Gabaergički i holinergički sistem u nervno-mišićnom sistemu parazitskih nematoda su glavna ciljna mesta delovanja kako savremenih antinematodnih lekova, tako i novijih potencijanih antihelminatika. Osnovni problemi koji danas ugrožavaju antiparazitsku terapiju su povećanje razvoja rezistencije i često ispoljavanje toksičnosti antiparazitskih lekova, a oba problema su direktno povezani sa funkcijom predhodno opisanih receptorskih sistema.

Farmakološki značaj u okviru holinergičkog sistema nematoda ima pre svega nikotinski-acetilholinski receptor (nAChR). Na osnovu najnovijih saznanja ovaj receptor je podeljen u tri grupe L, B i N tip, zavisno od primarnog agoniste (levamizol, befinijum ili nikotin). Ovakva specifičnost nikotinskog receptora nematoda u slučaju rezistencije recimo na levamizol (najčešće opisana u svetu) omogućava primenu lekova koji deluju na druge podtipove nikotinskog receptora (B i N tip). Za nas je bilo posebno interesantno da komparativno ispitamo efikasnost ovih agonista uključujući i tribendimidin, antinematodni lek skorije registrovan u Kini za primenu kod ljudi.

GABA-receptor parazitskih nematoda je prvobitno označen kao glavno mesto dejstva avermektina i milbemicina. Međutim, vremenom se pokazalo da ovi lekovi deluju i na jedan potpuno nov, do tada ne opisani glutamat-zavisni hloridni kanal u farinksu nematoda. Posle ovog saznanja sva istraživanja su uglavnom usmerena na efekte avermektina i milbemicina prema glutamat-zavisnom hloridnom kanalu, s tim da su ostale nepotpuno definisane specifične karakteristike GABA receptora u nervno-mišićnom sistemu nematoda.

Neki aktivni principi etarskih ulja imaju dokazana antiparazitska svojstva, međutim, tačan mehanizam njihovog dejstva nije definisan. Objavljeni su podaci da u organizmu sisara timol deluje na GABA receptor, a slične

indicije postoje i za karvakrol. Upravo zbog toga cilj nam je bio da bliže ispitamo dejstvo karvakrola na kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum*.

Sa druge strane, značajno je bilo ispitati i komparativne razlike u dejstvu gabaerگیčkih i holinerگیčkih antihelmintika na odgovarajuće receptore domaćina (sisara). GABA receptor nematoda je veoma sličan ali ne i isti GABA_A receptoru sisara. Takođe, važno je bilo ustanoviti prirodu neželjenih efekata antihelmintika GABA i nikotinskih agonista, na GABA i nikotinski receptor sisara. Ovo se pre svega odnosi na periferne nervne strukture, jer ovi lekovi u vrlo malom opsegu prolaze krvno moždanu barijeru i dospevaju u CNS.

S obzirom na opisane ciljeve postavili smo sledeće zadatke istraživanja:

1. Da se komparativno ispitaju efekti dve grupe antihelmintika, agonista nikotinskog-acetilholinskog receptora nematoda, na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*:

- a) acetilholin, befinijum i pirantel;
- b) nikotin, levamizol i tribendimidin.

2. Da se ispita efekat anatagonista nikotinskog receptora heksametonijuma i mekamilamina (dominantno deluju na neuronski tip receptora sisara) i tubokurarina i pankuronijuma (dominantno deluju na mišićni tip receptora sisara) u odnosu na dejstva tribendimidina i nikotina na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*.

3. Da se komparativno ispitaju efekti GABA i predstavnika tri grupe antihelmintika GABA-agonista na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*:

- a) avermektina - ivermektina
- b) milbemicina - moksidektina
- c) pirazina - piperazin.

4. Da se ispita interakcija GABA sa lekovima GABA-agonistima.
5. Da se ispita i detaljnije prouči mehanizam dejsta karvakrola (aktivne supstance etarskih ulja) na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*.
6. Da se ispita dejstvo antagonista nikotinskog-acetilholinskog receptora i agonista GABA receptora na kontrakcije nervno-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih poljnom stimulacijom.
7. Da se ispita i detaljnije proučiti mehanizam interakcije između GABA i nikotinskih agonista na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*.
8. Da se ispitaju efekti antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovane dijafragme pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS).
9. Da se ispitaju efekti antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane poljnom stimulacijom (EFS).
10. Da se ispitaju efekti karvakrola, aktivne supstance esencijalnih biljnih ulja na kontrakcije izolovane dijafragme i ileuma pacova izazvane poljnom stimulacijom (EFS).

Svi eksperimenti za rešavanje postavljenih ciljeva i zadataka, mogli su se izvesti u laboratoriji Katedre za farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

4. Materijal i metod rada

Sva ispitivanja su podeljena u dva dela. Prvi deo činila su istraživanja na nervno-mišićnom preparatu parazitske nematode svinja *Ascaris suum*, a drugi deo podrazumevao je istraživanja na nervno-mišićnom preparatu dijafragme i ileuma pacova.

Istraživanja na nervno-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

A. suum je dopreman u termosima sa klanica neposredno posle prikupljanja u posebno pripremljenom Lokerovom rastvoru – *Locker's solution*. Sastav Lokerovog rastvora je (mM): NaCl 155, KCl 5, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1.5 i glukoza 5. Paraziti su u laboratoriji čuvani u istom rastvoru na temperaturi od 37°C. Rastvor je menjan svakih 12 sati jer se na ovaj način paraziti iz jedne kolekcije mogu koristiti u ispitivanju kontrakcija do 5 dana.

Za istraživanja su korišćene samo ženke askarisa. Nervno-mišićni preparat za ispitivanje kontrakcija pripreman je disekcijom anteriornog dela parazita 2 do 3 cm kaudalno od glave. Odsecanjem tkiva između dve crvene linije, dužine 1cm uvek je dobijan preparat (segment) istih dimenzija.

Pripremljeni segment askarisa postavljan je u komoru (kupašilce) zapremine 20ml, ispunjenu sa *Ascaris Perienteric Fluid Ringer/APF Ringer* (mM): NaCl 23, Na-acetat 110, KCl 24, CaCl₂ 6, MgCl₂ 5, glukoza 11, HEPES 5, sa vrednosti pH 7.6, koja je podešavana dodavanjem NaOH. Jedan kraj segmenta pričvršćen je za kukicu na dnu kupašilca, a drugi deo je koncem zakačen za izometrijski transdjuser. Mešanje aplikovanih supstanci u kupašilcu obezbeđeno je stalnim ubrizgavanjem sobnog vazduha električnom pumpom, pri čemu kretanje mehurića nije uticalo na kontrakcije.

Posle disekcije, postavljanja u kupašilce i povezivanja sa transdjuserom, preparat je mikrometarskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen

početnoj tenziji od 1g tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao, aplikovane su ispitivane supstance a zatim su praćene i merene kontrakcije.

Korišćena su dva protokola aplikacije ispitivanih supstanci. U oba protokola aplikovane su rastuće koncentracije agonista, sa ili bez prethodne aplikacije antagoniste (ukoliko je ispitivan). U prvom protokolu koji je primenjivan u slučaju ispitivanja efekta acetilholina, befinijuma i pirantela, posle dobijanja određenog efekta, uvek je izvršeno ispiranje kupatilca, odnosno preparata. Kada su ispitivani efekti levamizola, nikotina i tribendimidina, ispiranja nije bilo, već je efekat posmatran kumulativno, sa ili bez antagoniste. Ovaj drugi protokol je prihvaćen za supstance koje se teško ispiraju odnosno, kada posle dobijanja kontrakcije nije moguće ispiranjem vratiti bazalni tonus.

U ispitivanjima efekata GABA-ergičkih lekova (GABA, ivermektin, moksidektin i piperazin), nakon postavljanja u vodeno kupatilce, segmenti su izlagani većem opterećenju, od oko 4g tokom 15-20 minuta, do stabilizacije bazalnog tonusa. Uravnotežavanje je podrazumevalo stabilni bazalni tonus na najmanje 2g i ne više od 2.5g. Ispitivane supstance su aplikovane u rastućim koncentracijama a posle postizanja maksimalnog efekta (maksimalne relaksacije) kupatilce je ispirano. Sledeća aplikacija je vršena posle ponovnog uspostavljanja stabilnog bazalnog tonusa.

Ispitivanje efekata električne poljne stimulacije na nervno-mišićnom preparatu *A. suum* izvršeno je u vodenom kupatilcu iste zapremine (20ml). Pripremljeni segment askarisa pričvršćen je donjim delom za kukicu stalka sa stimulationskim elektrodama. Gornji deo segmenta je pričvršćen za izometrijski transdjuser tako da se nalazio u središnjem delu prostora između dve elektrode. Elektrode od platine postavljene su sa bočnih strana preparata na razdaljini od 3-4 mm, povezane sa stimulatorom BioSMART 150 (ElUnit, Beograd). Posle postavljanja u kupatilce i povezivanja sa transdjuserom, preparat je mikrometerskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen početnoj tenziji od 1g tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao, preparat askarisa je stimulisan kontinuirano ili "paketom" od 5 stimulacija svakih 30 sekundi.

Parametri stimulacije su menjani (napon struje, širina stimacionog impulsa, frekvencija stimulacije, vreme trajanja stimulacije) da bi se dobile stabilne kontrakcije. U kupatilce su aplikovani različiti antagonisti nikotinskog receptora i agonisti GABA receptora u cilju ispitivanja potencijalne inhibicije kontrakcija.

Spontana aktivnost preparata askarisa, njegove kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom ili agonistima nikotinskog receptora odnosno, relaksacije izazvane GABA-agonistima, registrovane su preko izometrijskog trandjusera i softvera BioSMART 150 (El Unit, Beograd) na PC računaru u realnom vremenu.

Istraživanja na neuro-mišićnom preparatu dijafragme i ileuma pacova

Za ispitivanja na izolovanoj dijafragmi i ileumu korišćeni su pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne mase 200 ± 20 g. Životinje su držane u standardnim uslovima predviđenim za laboratorijske životinje u grupama od po 5, sa kontrolisanim ciklusom 12h svetlo/tama i pri temperaturi 21-24°C. Životinje su hranjene kompletnom peletiranom hranom za pacove (Veterinarski zavod Subotica) i pojene *ad libitum*. Sve primenjivane procedure su u skladu sa EEC Directive 86/609 i odobrene su od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Žrtvovanje pacova je sprovedeno neposredno pre ispitivanja, odobrenom metodom, predoziranjem tiopenton-Na u skladu sa propisima *Home Office Code of Practice* (1997). Odmah po žrtvovanju pristupalo se vađenju dijafragme i ileuma. Za održavanje izolovanog ileuma i dijafragme pacova u *in vitro* uslovima korišćen je hranjivi - *Tyrode solution*. Sastav Tyrode rastvora (mM) je sledeći: NaCl 139,9; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,04; NaHCO₃ 11,9; NaH₂PO₄ 0,4 i glukoza 5,5.

Pripremanje preparata dijafragme obavljeno je tako što se najpre cela dijafragma, na koštanoj osnovi od rebara i grudne kosti, prenese u Tyrode-ov

rastvor, a zatim makazama pažljivo odvoji leva i desna hemisfera. Od hemisfere dijafragme, preparat je pripreman tako što je isecan poprečni, centralni deo hemisfere, dužine 10mm i širine 5mm. Isečak je odmah zatim postavljan vertikalno u vodeno kupatilo zapremine 20ml, 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%).

Jedan kraj preparata dijafragme koncem je pričvršćen za stalak, dok je drugi pričvršćen za izometrijski transdjuser. Dve elektrode od platine postavljene su paralelno na razdaljini od 3-4 mm od preparata. Elektrode su povezane sa stimulatorom BioSMART 50 (ElUnit, Beograd) koji preko softvera BioSmart 50+ (ElUnit, Beograd) i PC računara omogućava stimulaciju preparata i beleženje kontrakcija na monitoru 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 1mm. Preparat dijafragme je stimulisan tetaničnim pulsevima, "paketom" od 5 stimulacija svakih 30 sekundi (10 μ s, 50Hz, 20V, 2s) sa pauzom od 3 do 5 minuta između "paketa". Kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera BioSmart 50+ (ElUnit, Beograd). Merene su maksimalne kontrakcije i eventualna pojava "*tetanic fade*", odnosno blokade presinaptičkog nikotinskog receptora.

Preparat izolovanog ileuma pacova, pripreman je od preterminalnog dela ileuma. Isečak dužine 4 do 5cm uziman je na rastojanju od oko 10cm od ileocekalne valvule i odlagan u Tyrode-ov rastvor. Posle preparisanja (uklanjana masnog tkiva), segment creva dužine 2cm postavljen je u vodeno kupatilo zapremine 20ml, sa Tyrode rastvorom na temperaturi od 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%).

Jedan kraj preparata ileuma je koncem pričvršćen za stalak, dok je drugi kraj pričvršćen za izometrijski transdjuser, tako da se isečak ileuma nalazi u

središnjem delu prostora između dve elektrode. Elektrode od platine postavljene su sa bočnih strana preparata na razdaljinu od 3-4 mm, povezane sa stimulatorom BioSMART 150 (ElUnit, Beograd). Pre početka ispitivanja preparata je izložen početnoj tenziji od 1g. Posle postizanja stabilnog početnog tonusa, preparat ileuma je stimulisan "paketom" od 5 stimulacija svakih 60 sekundi (2ms, 50Hz, 30V, 2s). Posle pauze od 5 minuta i ispiranja, istom preparatu aplikovane su rastuće koncentracije acetilholina (0,1, 0,3, 1, 3 i 10 μ M) ili drugih ispitivanih supstanci radi određivanja odnosa doze i efekta. Spontana aktivnost ileuma i njegove kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom, odnosno acetiholinom ili drugim supstancama, registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera BioSMART 150 (El Unit, Beograd).

Softverski regulisani sistem za ispitivanja kontrakcija izolovanih preparata korišten u ispitivanjima

Softverski regulisani sistem za ispitivanja na izolovanim organima je tehničko rešenje, odnosno rezultat Projekta tehnološkog razvoja Ministarstva nauke R. Srbije br. 20119, Katedre za farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu i firme ElUnit, Beograd. Parametri stimulacije se regulišu preko prednjeg panela upravljačkog softvera, preko koga se i otvaraju i zatvaraju pinč ventili sa hranljivim rastvorom kojim se ispira preparat. Ovakav sistem omogućava veliki broj brzih ispiranja, bez značajnijeg poremećaja bazalne tenzije preparata, odnosno omogućava veći broj aplikacija. Dobijene kontrakcije prenose se preko pojačivačkog sistema (interfejsa) 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 personalnom računaru. Vremenski dijagram promene sile teče kontinuirano jer je program u konstantnoj vezi sa hardverom (*on line* upravljanje). Alati za rad sa dijagramom omogućavaju analizu talasnog oblika: markeri, zum, numerički kurzori, veličina vremenskog prozora, itd. Arhiviranje toka prikupljenih podataka vrši se u numeričkoj

datoteci radi dokumentacije ili naknadne obrade i analize. Napredniju obradu rezultata post processing, smo obavljali importovanjem vremenskog dijagrama direktno u tekst procesor Word 2007 ili Power Point.

Softver poseduje poseban čitač analajzer, *Analyzer 1 i 1-2*, koji omogućava detaljnu analizu dobijenih podataka, merenja i importovanje podataka u druge programe.

Supstance i rastvarači

U ispitivanjima su korišćeni: acetilholin-hlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), levamizol-hidrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tribendimidin, nikotin, pirantel-citrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), befinijum-hidroksinaftoat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), GABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ivermektin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), moksidektin (Fluka, St. Louis, MO, USA), piperazin (Fluka, St. Louis, MO, USA), mekamilamin-hidrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pankuronijum bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tubokurarin-hidrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), heksametonijum hlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), atropin-sulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), bikukulin-metijodid (Fluka, Switzerland) i kao rastvarači: destilovana voda i DMSO (Centrohem, Beograd). U kupatilce sa izolovanim preparatom (askarisa, dijafragme ili ileuma) rastvori supstanci su aplikovani farmakološkim špricem, uvek u volumenu od 0.1ml. Kada je rastvarač bio DMSO njegova koncentracija u kupatilcu sa preparatom nije prelazila 0.1%.

Statistička obrada rezultata

Statistička analiza svih dobijenih rezultata obavljena je programom Graph Pad Prism, Version 5.0 (San Diego, Ca, USA). Razlike između kompariranih serija rezultata poređene su t-testom (parni), analizom varijanse

(ANOVA) odnosno Tukey-testom, dok je dozna zavisnost dobijenih efekata analizirana lineranom i nelinearnom regresijom.

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

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

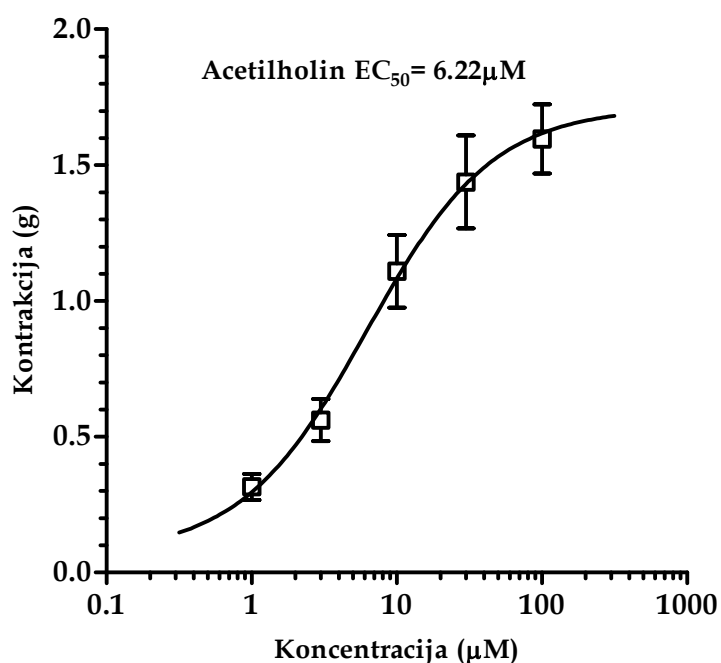
gde je EC_{50} koncentracija agoniste (X_a) koja proizvodi 50% maksimalnog odgovora a nH je Hill-ov koeficijent (nagib). Za svaku ispitivanu seriju kontrakcija (ili relaksacija), program Prism 5.0 nelinearnom regresijom preračunava vrednost EC_{50} i nH u jednačini za svaku seriju kontrakcija. Zavisno od broja uzoraka nH je bio fiksiran na vrednost 1.0 za neke serije u ispitivanjima. Da bi se dobili što reprezentativniji rezultati, u istraživanju svake supstance korišćeni su askarisi iz različitih kolekcija. Signifikantnost razlike između efekata za kombinaciju GABA i ivermektin testirali smo t-testom. Statistička analiza urađena je pomoću GraphPad Prism softvera. Srednje vrednosti kontrakcija su izražene kao \pm standardna greška (SE). Analiza varijanse i Tukey test su korišćeni za komparaciju efekata testiranih supstanci pojedinačno i zajedno, a intervali poverenja (Confidence Intervals, CI) su 95%.

5. Rezultati

5.1. Komparativno ispitivanje efekata dve grupe antihelmintika, agonista nikotinskog-acetilholinskog receptora nematoda na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

5.1.1. Komparativno ispitivanje efekata acetilholina, befinijuma i pirantela

Na samom početku ispitivanja određena je vrednost srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) acetilholina (ACh) za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Acetilholin podjednako deluje na sva tri tipa nikotinskog receptora parazitskih nematoda (N, L i B tip). Testirane su rastuće koncentracije ACh od 1, 3, 10, 30 i 100 μM , a meren je maksimalni dobijeni kontraktilni efekat, posle čega je preparat ispiran. Vrednosti kontrakcija su izražene u apsolutnim jedinicama - gramima (g).



Slika 18. Dozno-zavisna sigmoidna kriva odnosa doze i efekta acetilholina za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

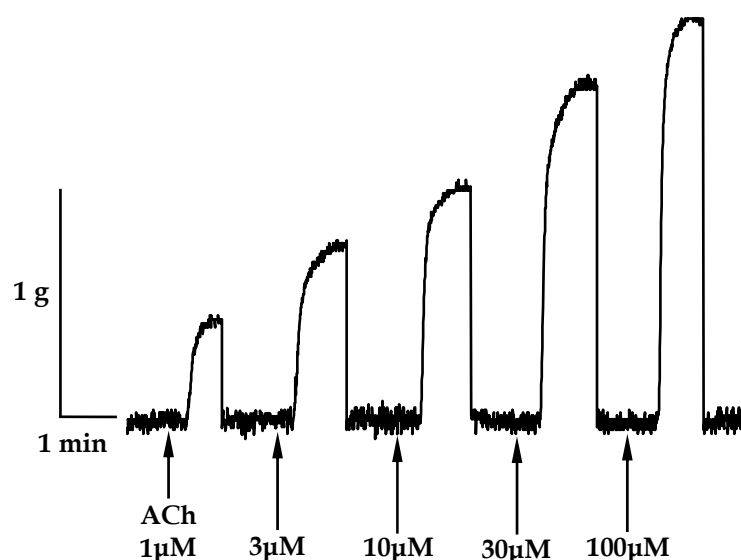
U ovom ispitivanju testirano je ukupno 8 preparata iz dve kolekcije askarisa. Na osnovu dobijenih rezultata izračunata je vrednost EC_{50} acetilholina za kontrakcije preparata *A. suum* od $6.22\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 2.13 do $18.16\mu\text{M}$ (Slika 18, Tabela 3).

Preračunati maksimalni efekat ACh na osnovu prosečnih vrednosti kontrakcija dobijenih u ovom ispitivanju iznosio je 1.71g sa intervalima poverenja (95%) od 1.40 do 2.02g (Tabela 3).

Tabela 3. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija acetilholina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
6.22	2.13-18.16	0.793	1.71	1.40-2.02	0.71	8

Na slici 19 prikazan je originalni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih ACh.



Slika 19. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama acetilholina (1 , 3 , 10 , 30 i $100\mu\text{M}$)

Befinijum je agonista B tipa nikotinskog receptora *A. suum*. Komparativno je ispitan efekat acetilholina i befinijuma na istom preparatu askarisa. Aplikovane su koncentracije ACh od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M i posle 5 minuta pauze, deset puta niže koncentracije befinijuma (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 i 10 μ M). Posle postizanja maksimalnog efekta, preparat je ispiran rastvorom *Ascaris Perienteric Fluid (APF)* i tek nakon vraćanja na bazalni tonus aplikovana je naredna koncentracija ispitivane supstance.

Dobijene vrednosti srednjih efektivnih koncentracija (EC_{50}) acetilholina i befinijuma prikazane su u tabeli 4.

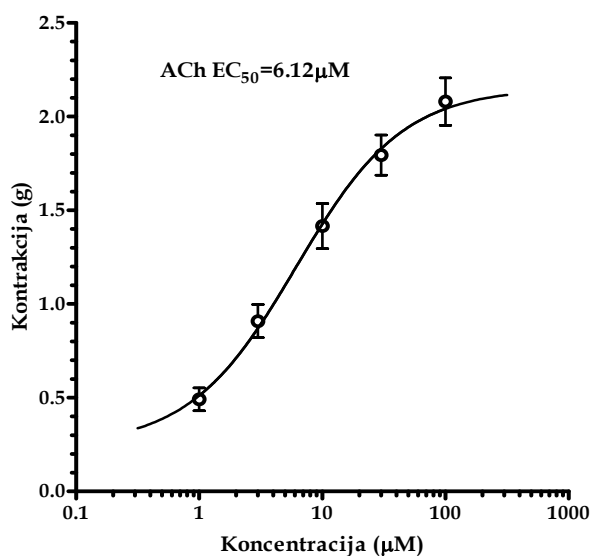
Tabela 4. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija acetilholina i befinijuma na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μ M)	95% intervali poverenja EC_{50} (μ M)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
6.12	2.82-13.28	0.299	2.07	1.79-2.35	0.84	7
Befinijum						
0.37	0.091-1.513	0.164	2.74	2.37-3.10	0.64	7

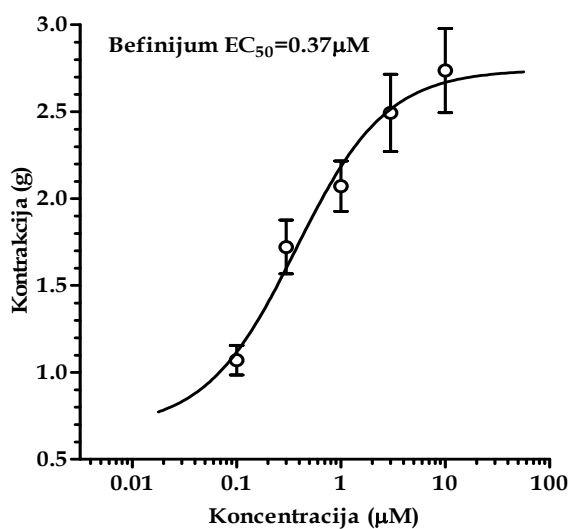
U ovim ispitivanjima sprovedenim na askarisu iz dve kolekcije, dobijena je vrednost EC_{50} acetilholina od 6.12 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 2.82 do 13.28 μ M. Preračunata vrednost maksimalnog efekta iznosila je 2.07g sa intervalima poverenja 95% od 1.79 do 2.35g (Tabela 4, Slika 20).

Sa druge strane, befinijum je u deset puta nižim koncentracijama ispoljio višu efikasnost od acetilholina. Tako je vrednost EC_{50} befinijuma za kontrakcije *A. suum* iznosila 0.37 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 0.091 do 1.513 μ M. Preračunati maksimalni efekat befinijuma je više od pola grama veći od efekta koji postiže ACh i iznosi 2.74 g sa intervalima poverenja 95% od 2.37 do 3.10g.

Sigmoidne krive odnosa doze i efekta acetilholina i befinijuma za kontrakcije istog neuro-mišićnog preparata *A. suum* prikazane su na slici 20 i 21.



Slika 20. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta acetilholina (1, 3, 10, 30 i $100 \mu\text{M}$) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*



Slika 21. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta befinijuma (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 i $10 \mu\text{M}$) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

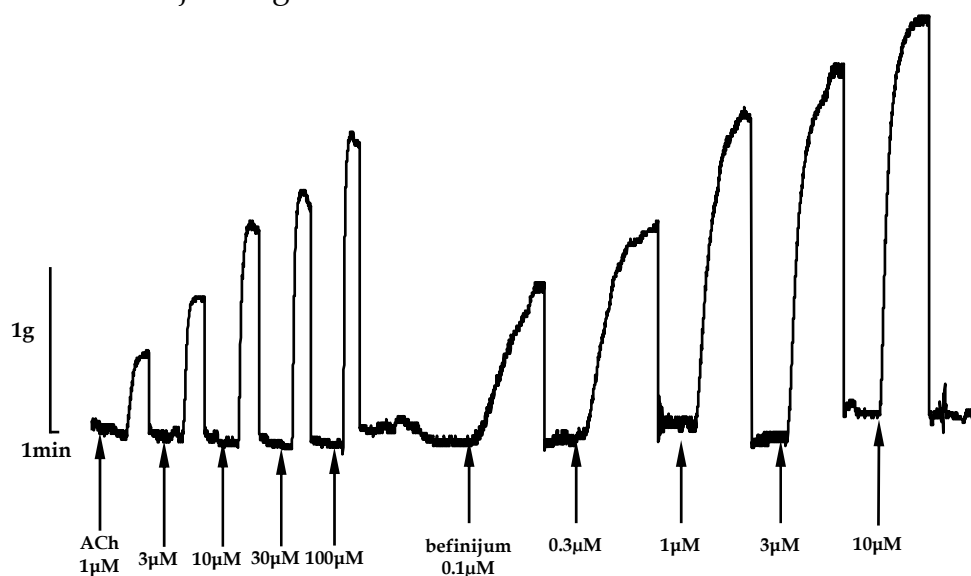
Dobijene vrednosti kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama ACh i befinijuma upoređene su i parnim t-testom (Tabela 3).

Tabela 5. Prosečne vrednosti kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama acetilholina i befinijuma ($\bar{x} \pm SE$)

Koncentracija	KONTRAKCIJE (g)				
	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
ACh	0.49 \pm 0.06	0.91 \pm 0.08	1.42 \pm 0.12	1.79 \pm 0.10	2.08 \pm 0.12
Koncentracija	0.1 μ M	0.3 μ M	1.0 μ M	3.0 μ M	10.0 μ M
Befinijum	1.07 \pm 0.08 ** P=0.0044	1.72 \pm 0.15 ** P=0.0029	2.07 \pm 0.14 * P=0.0103	2.49 \pm 0.22 * P=0.0236	2.81 \pm 0.20 * P=0.0315

Iz tabele 5 se vidi da je befinijum, iako primenjen u 10 puta nižim koncentracijama od acetilholina izazvao signifikantno više kontrakcije.

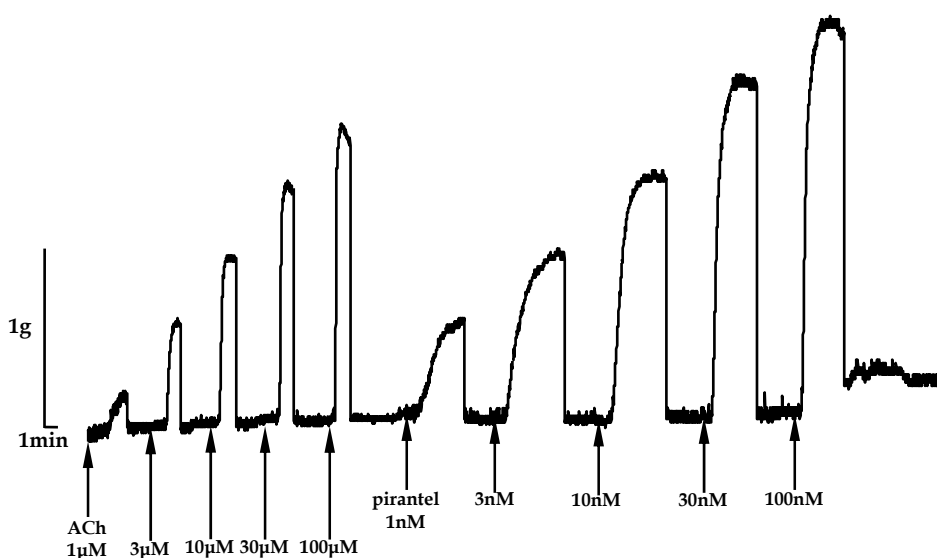
Na slici 22 prikazan je primer zapisa kontrakcija jednog preparata *A. suum* izazvanih acetilholinom i befinijumom. Sa leve strane je obeležena vrednost kontrakcije od 1g i vreme od 1 minuta.



Slika 22. Zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i befinijuma

Pirantel je agonista L tipa nikotinskog acetilholinskog receptora parazitskih nematoda. Naša preliminarna ispitivanja su pokazala da u odnosu na acetilholin i befinijum pirantel izaziva kontrakcije neuro-mišićnog preparata u još nižim koncentracijama. Upravo iz tog razloga u ovom delu istraživanja testirali smo ponovo iste koncentracije acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100 μ M) i 1000

puta niže koncentracije pirantela 0.001, 0.003, 0.010, 0.03 i 0.1 μ M. Ukupno je ispitano 5 preparata askarisa (n=5), kojima su po istom protokolu kao i u prethodnim istraživanjima prvo aplikovane rastuće koncentracije acetilholina, a zatim posle 5 minuta odmora rastuće koncentracije pirantela (0.001, 0.003, 0.010, 0.030 i 0.1 μ M) (Slika 23).



Slika 23. Zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i pirantela

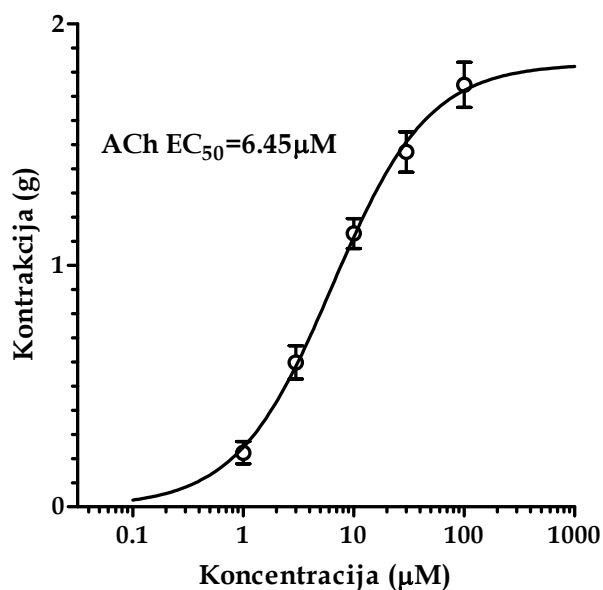
Ovaj deo ispitivanja sproveden je na askarisu jedne kolekcije. Određena vrednost EC_{50} acetilholina iznosila je 6.45 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 3.64 do 11.43 μ M. Preračunata vrednost maksimalnog efekta iznosila je 1.83g sa intervalima poverenja 95% od 1.66 do 2.00g (Tabela 6, Slika 24). Dobijene vrednosti se nisu razlikovale od rezultata za acetilholin dobijenih u predhodnim ispitivanjima (početna ispitivanja sa acetilholinom i ispitivanja acetilholina i befinijuma na istom neuro-mišićnom preparatu).

Pirantel se pokazao kao značajno potentniji agonist nikotinskog receptora parazitskih nematoda. On je ispoljio srednju efektivnu koncentraciju za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* od 0.010 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 0.004 do 0.027 μ M. Preračunata vrednost maksimalnog efekta iznosila je 2.5g, sa intervalima poverenja 95% od 2.06 do 2.93g.

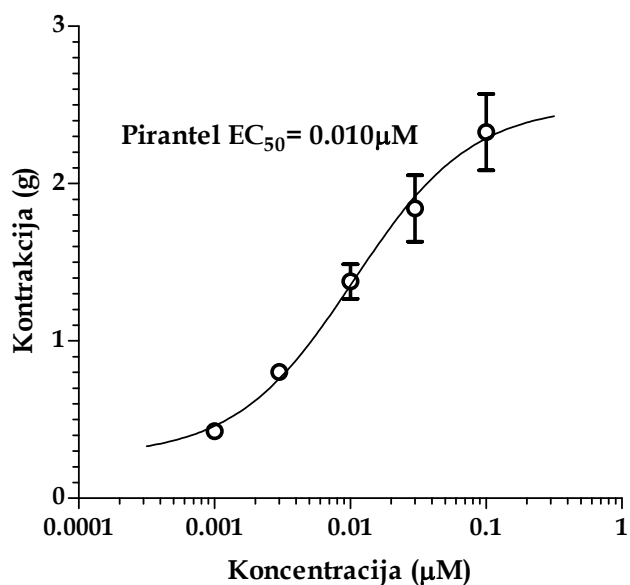
Tabela 6. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija acetilholina i pirantela na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (μM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (μM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
6.45	3.64-11.43	0.809	1.83	1.66-2.00	0.93	5
Pirantel						
0.010	0.004-0.027	-1.97	2.50	2.06-2.93	0.82	5

Na slikama 24 i 25 prikazane su sigmoidne krive odnosa doze i efekta (kontrakcija) acetilholina i pirantela na istim neuro-mišićnim preparatima *A. suum*.



Slika 24. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100 μM) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*



Slika 25. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta pirantela (0.001, 0.003, 0.01, 0.03 i $0.1 \mu M$) na kontrakciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Kako smo već naglasili, iz dobijenih rezultata se jasno vidi da pirantel dovodi do kontrakcija neuro-mišićnog preparata parazitske nematode u koncentracijama koje su 1000 puta niže od koncentracija u kojima deluje acetilholin na istom preparatu. Ove dve grupe kontrakcija ispitali smo parnim testom (Tabela 7).

Tabela 7. Vrednosti kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i pirantela ($x \pm SE$)

Koncentracija	KONTRAKCIJE (g)				
	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
ACh	0.22 \pm 0.04	0.59 \pm 0.06	1.13 \pm 0.06	1.47 \pm 0.08	1.75 \pm 0.09
Koncentracija	0.001 μM	0.003 μM	0.010 μM	0.030 μM	0.10 μM
Pirantel	0.42 \pm 0.04	0.80 \pm 0.03	1.38 \pm 0.10	1.84 \pm 0.21	2.33 \pm 0.24* P=0.0379

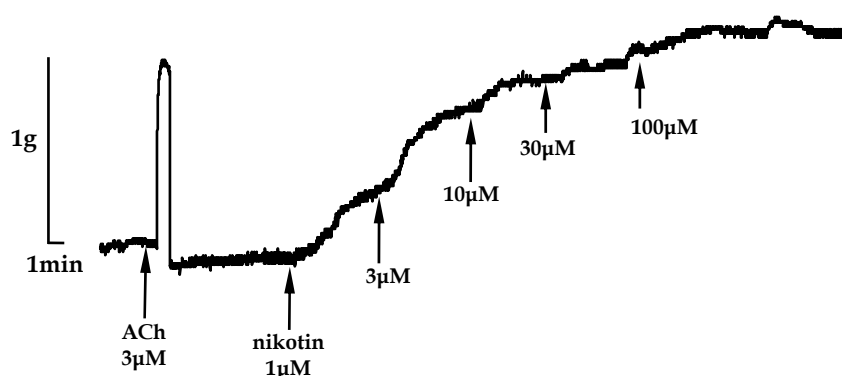
Iz tabele 7 se jasno vidi da je pirantel u 1000 puta nižim koncentracijama od acetilholina izazvao više kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* u

svim doznim nivoima, međutim ove razlike nisu dostigle stepen statističke značajnosti, osim u slučaju najviše testirane koncentracije pirantela $0.1\mu\text{M}$ i komparativne koncentracije ACh od $100\mu\text{M}$ ($p=0.0379$).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo konstatovati da je najviši efekat primenjenih agonista nikotinskog receptora u odnosu na srednje efektivne koncentracije EC_{50} zabeležen u slučaju pirantela ($0.010\mu\text{M}$), zatim befinijuma ($0.37\mu\text{M}$) i na kraju acetilholina ($6.12-6.45\mu\text{M}$).

5.1.2. Komparativno ispitivanje efekata nikotina, levamizola i tribendimidina

U ovom delu istraživanja komparativno su ispitani efekti nikotina (agoniste N-tipa nikotinskog receptora nematoda), levamizola (agoniste L-tipa nikotinskog receptora nematoda) i tribendimidina, antiparazitskog leka novije generacije čiji se tačan mehanizam dejstva još uvek ne poznaje u potpunosti. U ovim ispitivanjima koristili smo protokol sa kumulativnom aplikacijom supstanci, jer se ispitivana jedinjenja veoma teško ispiraju i gotovo je nemoguće ispiranjem postići početni bazalni tonus preparata već posle prve aplikacije. Svaka nova koncentracija ispitivane supstance aplikovana je nakon postizanja maksimalnog odgovora na predhodnu koncentraciju (5 minuta od aplikacije). Opisana metoda je prihvaćena i publikovana za ispitivanje odnosa doze i efekta za navedene lekove (Robertson i sar., 2002).



Slika 26. Kumulativni efekat rastućih koncentracija nikotina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

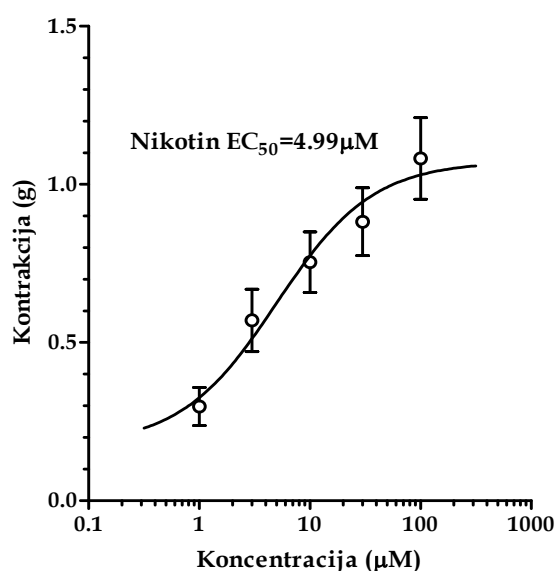
Pre početka aplikacije ispitivane susptance, preparat je uvek testiran sa $3\mu\text{M}$ ACh. Da bi se ispitivanja uvek obavila na preparatima ujednačene aktivnosti, korišćeni su samo oni preparati čija je početna kontrakcija na $3\mu\text{M}$ acetilholina bila viša od 0.5g i niža od 1.0g (Slika 26).

Nikotin je aplikovan u koncentracijama od 1, 3, 10, 30 i $100\mu\text{M}$, a preračunata vrednost EC_{50} iznosila je $4.99\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 0.89 do $27.97\mu\text{M}$ (Slika 27, Tabela 8). Preračunati maksimalni efekat bio je 1.072g sa intervalima poverenja (95%) od 0.85-1.29g (Tabela 8).

Tabela 8. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija nikotina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

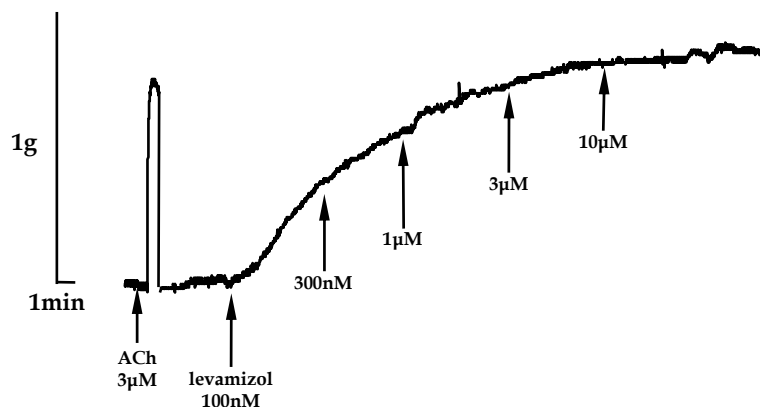
Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
4.99	0.89-27.97	0.360	1.072	0.85-1.29	0.61	5

Na slici 27 prikazana je sigmoidna kriva odnosa doze i efekta nikotina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*.



Slika 27. Sigmoidna kriva odnosa doze i efekta nikotina (1, 3, 10, 30 i $100\mu\text{M}$) (n=5) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Na slici 28 prikazan je originalni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* posle kumulativne aplikacije rastućih koncentracija levamizola.



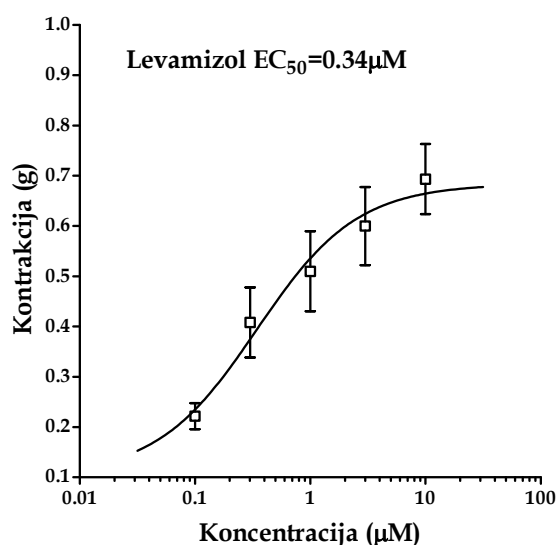
Slika 28. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim kumulativnim koncentracijama levamizola

Primenjene koncentracije levamizola bile su 10 puta niže od koncentracija nikotina u predhodnom ispitivanju, jer je na osnovu preliminarnih rezultata bilo jasno da levamisol deluje u znatno nižim koncentracijama (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 i 10 μ M). Preračunata vrednost srednje efektivne koncentracije levamizola (EC_{50}) iznosila je 0.34 μ M (slika 29) sa intervalima poverenja 95% od 0.04 do 2.46 μ M (Tabela 10).

Tabela 10. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija levamizola na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μ M)	95% intervali poverenja EC_{50} (μ M)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
0.34	0.04-2.46	-0.463	0.68	0.55-0.81	0.52	6

Izračunati maksimalni efekat levamizola iznosio je 0.68 g sa intervalima poverenja 95% od 0.55 do 0.81g. Na slici 29 prikazana je sigmoidna kriva odnosa doze i efekta levamizola za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*.



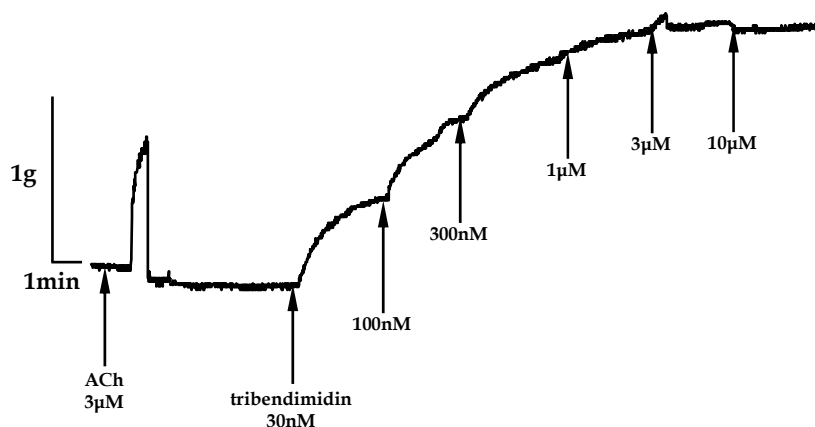
Slika 29. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta levamizola za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* (n=6)

Treći agonista nikotinskog receptora nematoda čiji je efekat ispitivan, bio je tribendimidin. Postoje podaci da je tribendimidin potentni agonista L-tipa nikotinskog receptora parazitskih nematoda. Na osnovu preliminarnih ispitivanja efekata ovog leka na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*, primenjene su koncentracije tri puta niže u odnosu na korišćene koncentracije levamizola. Testirane su koncentracije 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 μM tribendimidina. Izračunata vrednost srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) u ovom ispitivanju iznosila je 0.064 μM (Tabela 11, Slika 31), sa intervalima poverenja 95% od 0.003 do 1.161 μM (Tabela 11).

Tabela 11. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

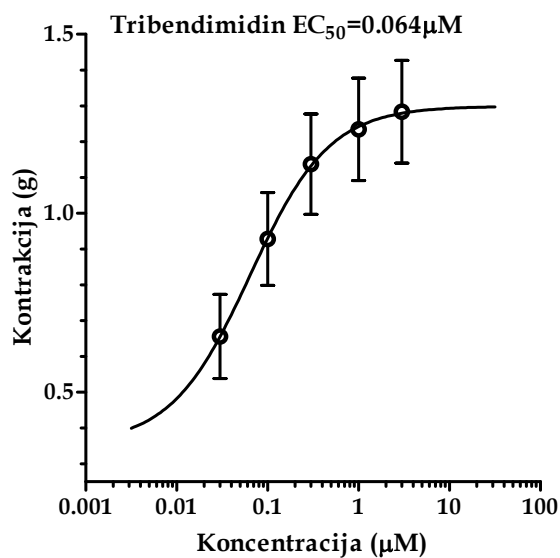
Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
0.064	0.003-1.161	0.628	1.299	1.067-1.531	0.18	14

Reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih kumulativnim koncentracijama tribendimidina, prikazan je na slici 30, a dozno-zavisna sigmoidna kriva kontraktalnog efekta tribendimidina na slici 31. Ukupno je tretirano 14 preparata, iz dve kolekcije askarisa.



Slika 30. Kumulativni efekat rastućih koncentracija tribendimidina (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 μM) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Maksimalni efekat koji je preračunat na osnovu dobijenih vrednosti kontrakcija izazvanih tribendimidinom iznosio je 1.29g, sa intervalima poverenja 95% od 1.067 do 1.531g (Tabela 11).



Slika 31. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* (n=14)

Mada su ispitivani agonisti nikotinskog receptora primenjeni u različitim koncentracijama, početna koncentracija je bila najniža koncentracija koja je u preliminarnim ispitivanjima izazvala kontrakciju. Ostale koncentracije su sledile iz klasičnog logaritamskog niza, kojim se dobija najbolja distribucija efekata za preračunavanje dozne zavisnosti. U cilju komparacije efekata primenjenih agonista izvršeno je upoređivanje dobijenih vrednosti kontrakcija analizom varijanse. Mada je tribendimidin primenjen u koncentracijama tri puta nižim od koncentracija levamizola, on je ispoljio signifikantno više efekte. Prosečna vrednost kontrakcija preparata *A. suum* izazvanih tribendimidinom bile su više i od kontrakcija koje je izazvao nikotin (koji je primenjen u 30 puta višim koncentracijama), međutim ova razlika nije dostigla stepen statističke značajnosi. Rezultati statističke komparacije kontraktilnog efekta nikotina, levamizola i tribendimidina prikazani su u tabeli 12.

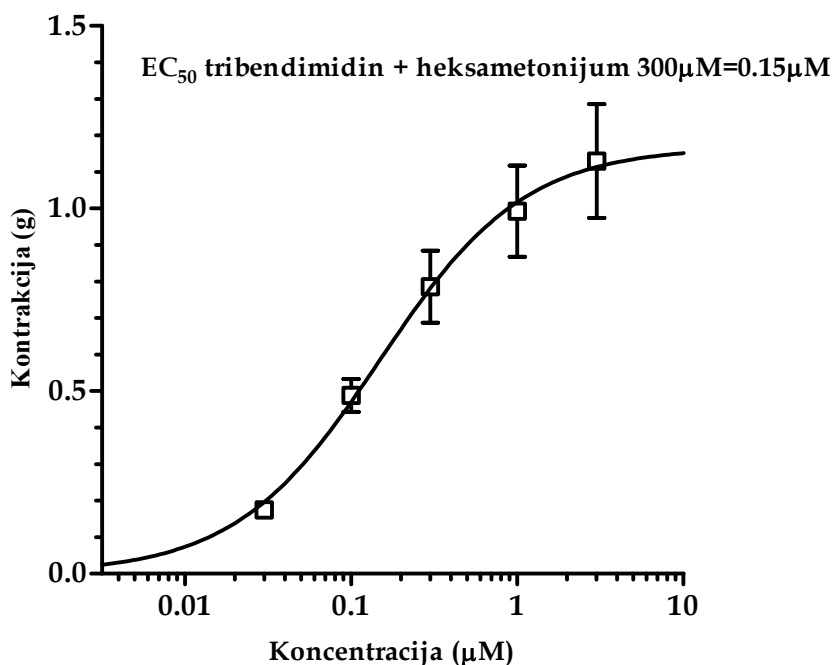
Tabela 12. Srednje vrednost kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama nikotina, levamizola i tribendimidina ($\bar{x} \pm SE$)

	KONTRAKCIJE (g)				
Koncentracija	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
Nikotin (n=5)	0.29 \pm 0.06	0.57 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09	0.88 \pm 0.19	1.08 \pm 0.12
Koncentracija	0.1 μ M	0.3 μ M	1.0 μ M	3.0 μ M	10.0 μ M
Levamizol (n=6)	0.22 \pm 0.02	0.40 \pm 0.06	0.51 \pm 0.07	0.60 \pm 0.07	0.69 \pm 0.06
Koncentracija	0.03 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1.0 μ M	10.0 μ M
Tribendimidin (n=14)	0.65 \pm 0.11*	0.92 \pm 0.13*	1.13 \pm 0.14*	1.23 \pm 0.14*	1.28 \pm 0.14*

*P<0.05 statistički značajna razlika u odnosu na efekat levamizola

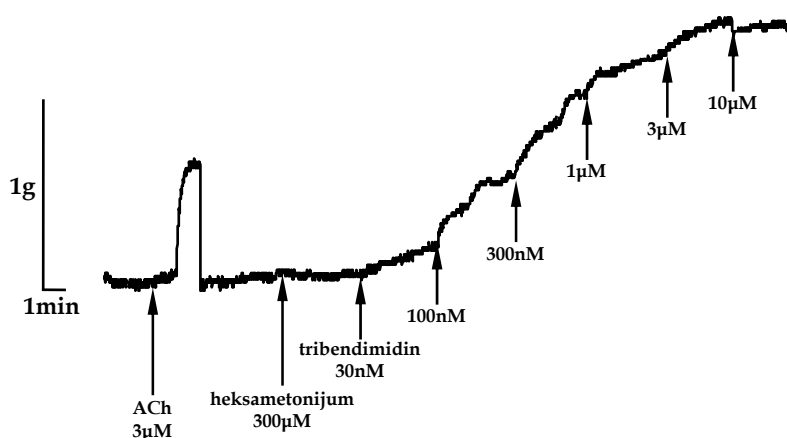
5.2. Komparativno ispitivanje efekata antagonista nikotinskog receptora heksametonijuma i mekamilamina (dominantno deluju na neuronski tip receptora sisara) i tubokurarina i pankuronijuma (dominantno deluju na mišićnin tip receptora sisara) u odnosu na dejstva tribendimidina i nikotina na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

Da bi se detaljnije istražio mehanizam dejstva tribendimidina, ispitan je inhibitorni efekat mekamilamina, heksametonijuma, pankuronijuma i tubokurarina na kontrakcije izazvane tribendimidinom, a zatim su ovi rezultati komparirani sa efektima istih antagonista na kontrakcije izazvane nikotinom. Posle kontrolne kontrakcije sa acetilholinom ($3\mu\text{M}$), aplikovan je antagonist a zatim su kumulativno primenjene rastuće koncentracije tribendimidina odnosno nikotina. Izračunata vrednost EC_{50} tribendimidina u prisustvu $300\mu\text{M}$ heksametonijuma iznosila je $0.15\mu\text{M}$ sa intervalima poverenja 95% od 0.04 do $0.55\mu\text{M}$ (Slika 32, Tabela 13).



Slika 32. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu $300\mu\text{M}$ heksametonijuma (n=14)

Na slici 33 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih tribendimidinom u prisustvu heksametonijuma.



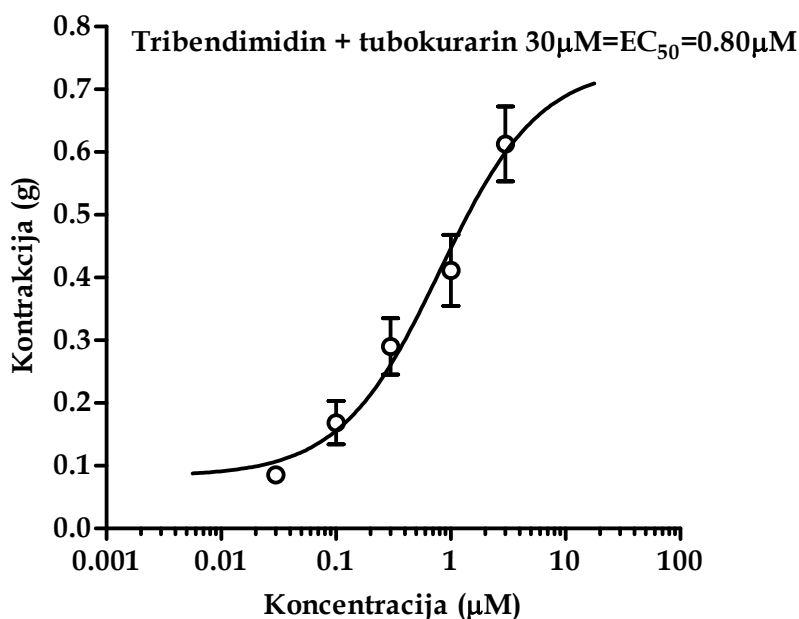
Slika 33. Kumulativni efekat rastućih koncentracija tribendimidina (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0µM) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu 300µM heksametonijuma

Maksimalni efekat koji je tribendimidin postigao u prisustvu heksametonijuma iznosio je 1.16g sa intervalima poverenja 95% od 0.95 do 1.38g.

Tabela 13. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija tribendimidina u prisustvu 300µM heksametonijuma na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (µM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (µM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
0.15	0.04-0.55	-0.821	1.16	0.95-1.38	0.57	14

Kako bi se bliže diferencirao mehanizam dejstva tribendimidina, ispitan je i efekat tubokurarina, antagoniste mišićnog tipa nikotinskog ACh receptora sisara. Srednja efektivna koncentracija tribendimidina u prisustvu 30µM tubokurarina iznosila je 0.80 µM, sa intervalima poverenja 95% od 0.25 do 2.51 µM (Slika 34, Tabela 14).



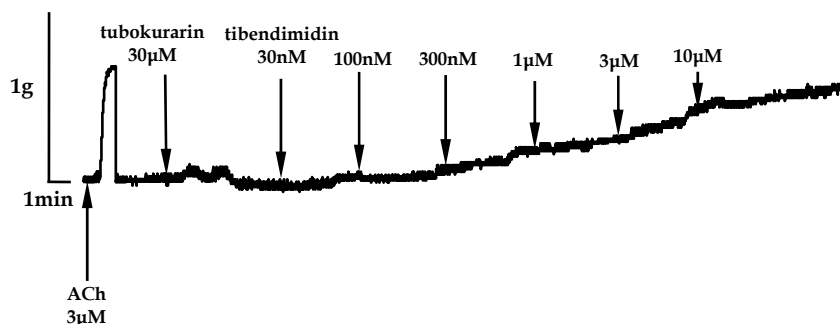
Slika 34. Dozno-zavisna sigmoidna kriva efekta tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu 30 μ M tubokurarina (n=7)

Maksimalni efekat koji je tribendimidin postigao u prisustvu tubokurarina iznosio je 0.76g sa 95% intervalima poverenja od 0.51 do 0.96g (Tabela 14).

Tabela 14. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija tribendimidina u prisustvu 30 μ M tubokurarina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

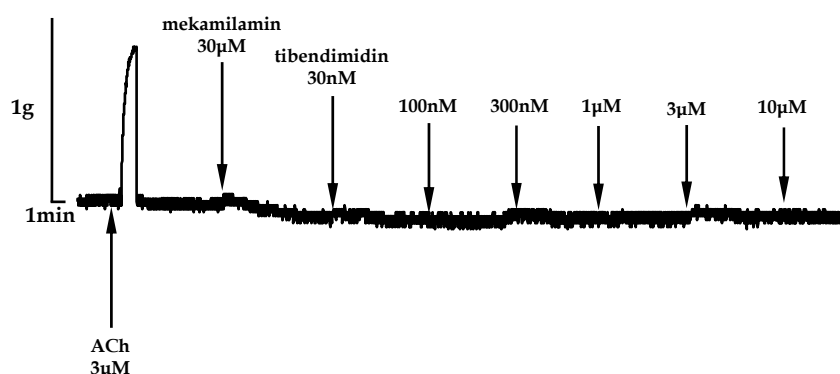
Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (μ M)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (μ M)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
0.80	0.25 do 2.51	-0.094	0.76	0.51-0.96	0.72	7

Na slici 35 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih tribendimidinom u prisustvu tubokurarina ($30\mu\text{M}$).



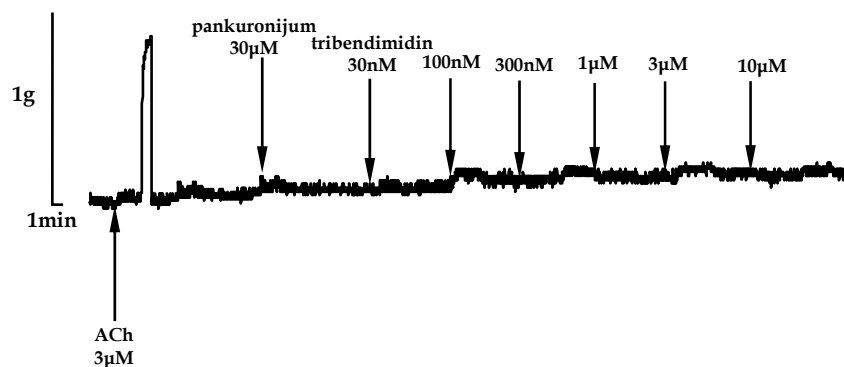
Slika 35. Kumulativni efekat rastućih koncentracija tribendimidina (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, $3.0\mu\text{M}$) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu $30\mu\text{M}$ tubokurarina

Pored ova dva antagonistu nikotinskog receptora, ispitano je i dejstvo pankuronijuma ($30\mu\text{M}$) i mekamilamina ($30\mu\text{M}$). Međutim, oba antagonistu su potpuno izblokiral kontrakcije izazvane tribendimidinom. (Slika 36 i 37). U ovim ispitivanjima testirano je po 5 preparata, ali kako kontrakcija nije bilo, izostaje i statistička analiza. Napominjemo da je osim potpunog izostajanja kontrakcija, posle aplikacije mekamilamina, primećen i izvesni stepen relaksacije preparata.



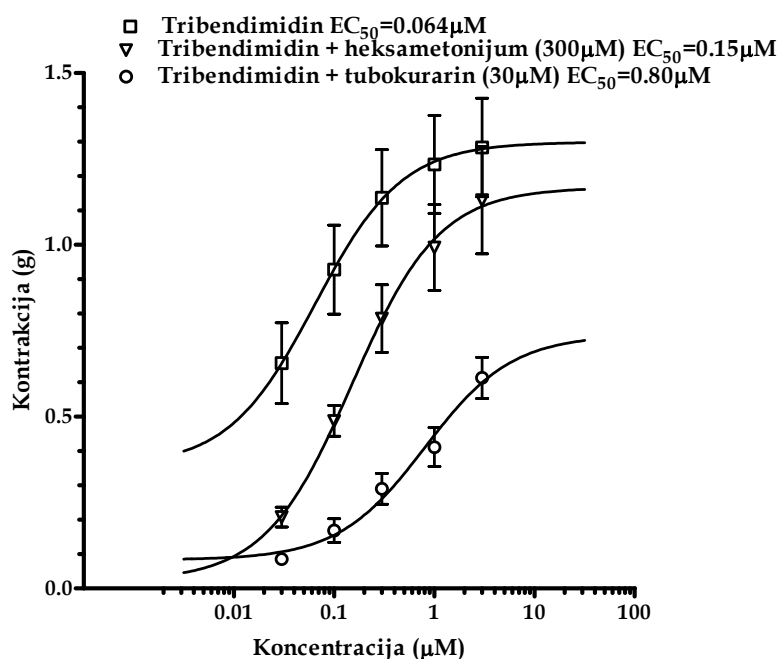
Slika 36. Kumulativni efekat rastućih koncentracija tribendimidina (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, $3.0\mu\text{M}$) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu $30\mu\text{M}$ mekamilamina

Kako se na slici 37 vidi, pankuronijum je za razliku od mekamilamina izazvao kompletnu inhibiciju kontrakcija ali bez relaksacije.



Slika 37. Kumulativni efekat rastućih koncentracija tribendimidina (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0µM) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu 30µM pankuronijuma

Da bi ispitali efekte testiranih antagonista nikotinskog receptora na kontraktilno dejstvo tribendimidina, analizirali smo signifikantnost razlika testom analiza varijanse.



Slika 38. Dozno-zavisne sigmoidne krive efekata tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* u prisustvu 300µM heksametonijuma i 30µM tubokurarina

Radi komparacije, na slici 38 prikazane su sigmoidne krive efekata tribendimidina na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* u prisustvu 300 μ M heksametonijuma i 30 μ M tubokurarina. U tabeli 15 prikazane su prosečne vrednosti kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvane tribendimidinom, odnosno tribendimidinom u prisustvu antagonista nikotinskog receptora.

Tabela 15. Srednja vrednost kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama tribendimidina (n=14) i tribendimidina u prisustvu 300 μ M heksametonijuma (n=14), 30 μ M tubokurarina (n=7), 30 μ M mekamilamina (n=5) i 30 μ M pankuronijuma (n=5) ($\bar{x}\pm$ SE)

Koncentracija (μ M)	KONTRAKCIJE (g)				
	0.03	0.1	0.3	1.0	10.0
Tribendimidin	0.65 \pm 0.11	0.92 \pm 0.13	1.13 \pm 0.14	1.23 \pm 0.14	1.28 \pm 0.14
Tribendimidin + Heksametonijum 300 μ M	0.17 \pm 0.01**	0.48 \pm 0.04*	0.78 \pm 0.09	0.99 \pm 0.12*	1.13 \pm 0.15
Tribendimidin + Tubokurarin 30 μ M	0.08 \pm 0.01**	0.16 \pm 0.03***	0.29 \pm 0.04***	0.41 \pm 0.05***	0.61 \pm 0.05*
Tribendimidin + Mekamilamin 30 μ M	0	0	0	0	0
Tribendimidin + Pankuronijum 30 μ M	0	0	0	0	0

- statistički značajna razlika u odnosu na tribendimidin (P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

*- statistički značajna razlika u odnosu na tribendimidin+tubokurarin (*P<0.05)

Mekamilamin i pankuronijum su ispoljili 100%-tni efekat, dok je tubokurarin bio potentniji od heksametonijuma i signifikantno smanjio kontrakcije koje izaziva tribendimidin. Heksametonijum je ispoljio slabiju aktivnost od tubokurarina i smanjenje kontrakcija izazvanih tribendimidinom koje je on uzrokovao dostiglo je stepen statističke značajnosti samo u dve najniže koncentracije.

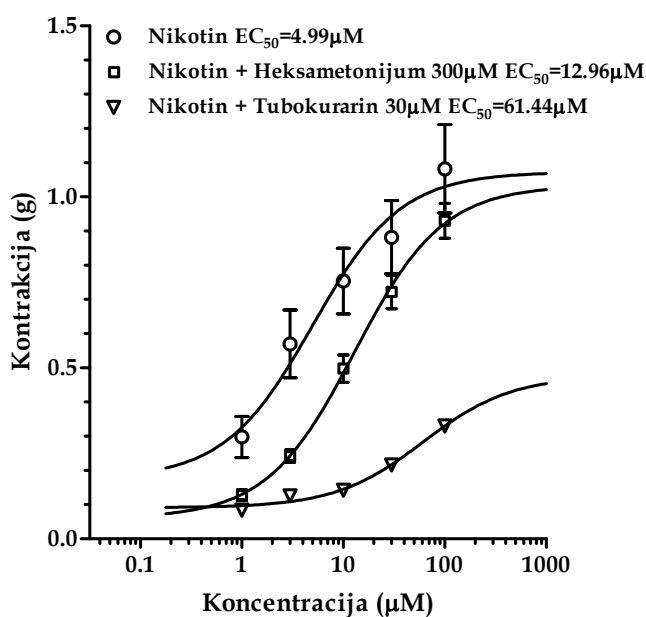
Da bi bilo moguće detaljnije proučiti mehanizam dejstva tribendimidina, ispitani su efekti heksametonijuma i tubokurarina na kontrakcije koje izaziva nikotin. Nikotin je aplikovan u koncentracijama od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M, (n=5) a preračunata vrednost EC₅₀ iznosila je 4.99 μ M (Slika 27 i 39), sa intervalima

poverenja 95% od 0.89 do 27.97 μ M (Tabela 16). Preračunati maksimalni efekat nikotina bio je 1.072g sa intervalima poverenja 95% od 0.85-1.29g (Tabela 16).

Tabela 16. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija nikotina samostalno i u prisustvu heksametonijuma (300 μ M) i tubokurarina (30 μ M) na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

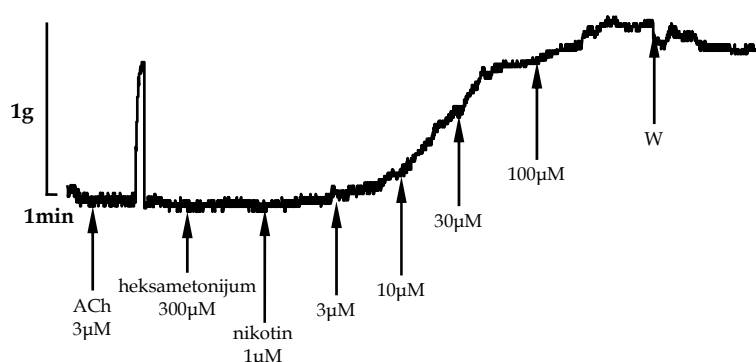
Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (μ M)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (μ M)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
Nikotin						
4.99	0.89-27.97	0.360	1.07	0.85-1.29	0.61	5
Nikotin + Heksametonijum 300μM						
12.96	7.56-22.20	0.690	1.03	0.91-1.15	0.93	5
Nikotin + Tubokurarin 30μM						
61.44	33.29-113.40	0.128	0.47	0.37-0.57	0.95	5

U prisustvu heksametonijuma (300 μ M), srednja efektivna koncentracija nikotina iznosila je 12.96 μ M, sa granicama sigurnosti 95% od 7.56 do 22.20 μ M. Maksimalni efekat se nije puno razlikovao u odnosu na E_{max} koje postiže sam nikotin, i iznosio je 1.03 u odnosu na 1.07g bez heksametonijuma (Tabela 16, Slika 39).



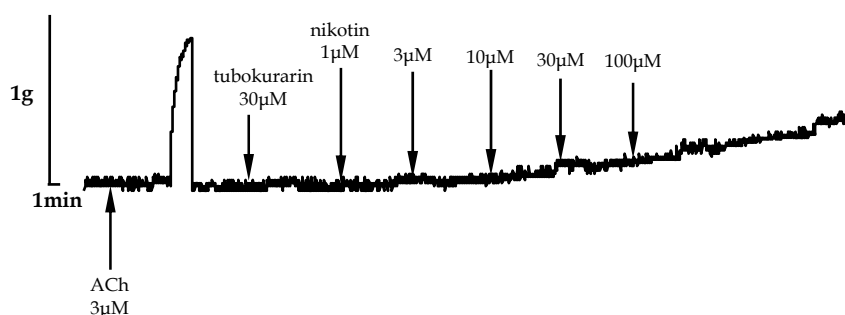
Slika 39. Sigmoidne krive odnosa doze i efekta nikotina, odnosno nikotina u prisustvu heksametonijuma (300 μ M) i tubokurarina (30 μ M)

Tubokurarin je ispoljio jači inhibitorni efekat na kontrakcije koje izaziva nikotin. Tako je vrednost EC_{50} nikotina u prisustvu tubokurarina ($30\mu\text{M}$) iznosila čak $61.44\mu\text{M}$ sa intervalima poverenja 95% od 33.29 do $113.40\mu\text{M}$ (Tabela 16). Na slici 40 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih nikotinom u prisustvu heksametonijuma ($300\mu\text{M}$).

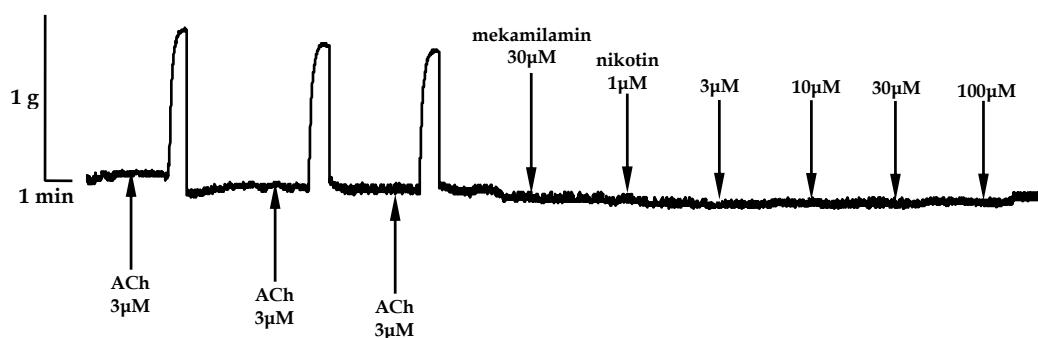


Slika 40. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane kumulativnim koncentracijama nikotina u prisustvu heksametonijuma $300\mu\text{M}$

Maksimalni efekat koji je preračunat bio je značajno manji u odnosu na efekat koji postiže sam nikotin i iznosio je 0.47g sa 95% intervalima poverenja od 0.37 do 0.57g . Na slici 41, prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih nikotinom u prisustvu tubokurarina ($30\mu\text{M}$).

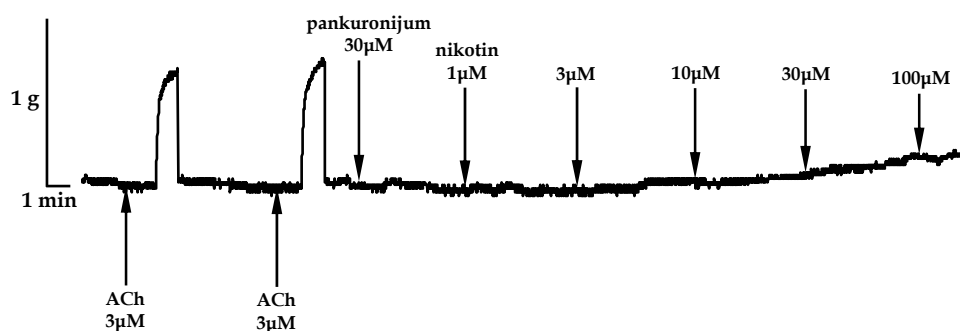


Slika 41. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim kumulativnim koncentracijama nikotina u prisustvu tubokurarina $30\mu\text{M}$



Slika 42. Efekat mekamilamina ($30\mu\text{M}$) na kontraktilno dejstvo rastućih koncentracija nikotina na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*. Na početku zapisa su tri kontrolne kontrakcije izazvane acetilholinom ($3\mu\text{mol}$), posle kojih je aplikovan mekamilamin

Kao i u slučaju tribendimidina, mekamilamin ($30\mu\text{M}$) i pankuronijum ($30\mu\text{M}$) su potpuno blokirali kontrakcije izazvane nikotinom (Slika 42 i 43).



Slika 43. Efekat pankuronijuma ($30\mu\text{M}$) na kontrakcije izazvane rastućim koncentracijama nikotina. Na početku zapisa kontrolne kontrakcije su izazvane acetilholinom ($3\mu\text{mol}$), posle kojih je aplikovan pankuronijum

I u ovim istraživanjima je primećeno da mekamilamin u primenjenoj koncentraciji od $30\mu\text{M}$, za razliku od pankuronijuma, izaziva blagu relaksaciju preparata (Slika 42).

S obzirom na dobijene rezultate, bilo je neophodno ispitati da li su razlike u prosečnim vrednostima kontrakcija izazvanih nikotinom u prisustvu antagonista nikotinskog receptora dostigle stepen statističke značajnosti. U tabeli 16 prikazane su prosečne vrednosti kontrakcija neuro-mišićnog preparata

A. suum izazvane samo nikotinom, kao i nikotinom u prisustvu antagonista nikotinskog receptora, heksametonijuma i tubokurarina.

Tabela 17. Srednja vrednost kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama nikotina i nikotina u prisustvu 300 μ M heksametonijuma, odnosno 30 μ M tubokurarina ($\bar{x}\pm$ SE)

(n=5) Koncentracija (μ M)	KONTRAKCIJE (g)				
	1.0	3.0	10.0	30.0	100.0
Nikotin	0.29 \pm 0.06	0.57 \pm 0.09	0.75 \pm 0.09	0.88 \pm 0.10	1.08 \pm 0.12
Nikotin + Heksametonijum 300 μ M	0.12 \pm 0.01*	0.24 \pm 0.01**	0.49 \pm 0.04*,**	0.72 \pm 0.04***	0.93 \pm 0.05***
Nikotin + Tubokurarin 30 μ M	0.08 \pm 0.01**	0.12 \pm 0.01***	0.14 \pm 0.01***	0.21 \pm 0.01***	0.33 \pm 0.01***
Nikotin + Mekamilamin 30 μ M	0	0	0	0	0
Nikotin + Pankuronijum 30 μ M	0	0	0	0	0

-statistički značajna razlika u odnosu na nikotin (P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

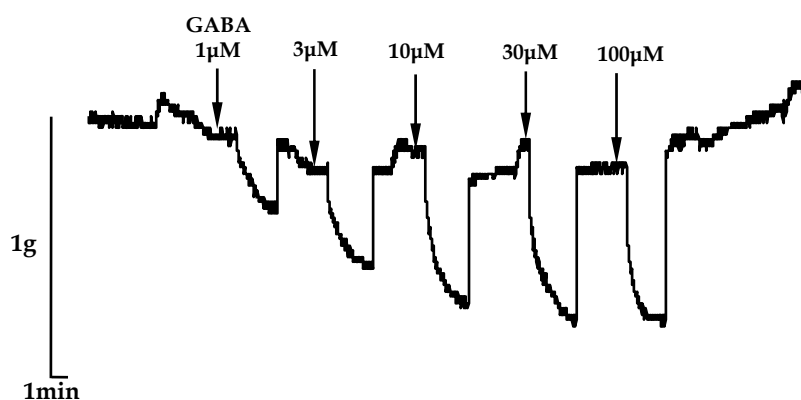
+ -statistički značajna razlika u odnosu na nikotin+tubokurarin (**P<0.01, *** P<0.001)

Iz tabele 17 se vidi da je heksametonijum signifikantno (P<0.05, P<0.01) inhibirao kontrakcije izazvane sa tri niže koncentracije nikotina (1, 3 i 10 μ M nikotina). Inhibicija efekta koji je dobijen posle aplikacije 30 i 100 μ M nikotina takođe je bila uočljiva, ali ova razlika nije dostigla stepen statističke značajnosti. Sa druge strane tubokurarin je visoko signifikantno (P<0.01 i P<0.001) inhibirao efekte svih testiranih koncentracija nikotina. Ispoljeni stepen inhibicije kontrakcija bio je kod tri više koncentracije nikotina signifikantno veći nego inhibicija koju je izazvao heksametonijum (P<0.01, *** P<0.001).

5.3. Komparativno ispitivanje efekata GABA i predstavnika tri grupe antihelminitika GABA-agonista na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*: a) avermektina (ivermektina); b) milbemicina (moksidektina); c) pirazina (piperazin)

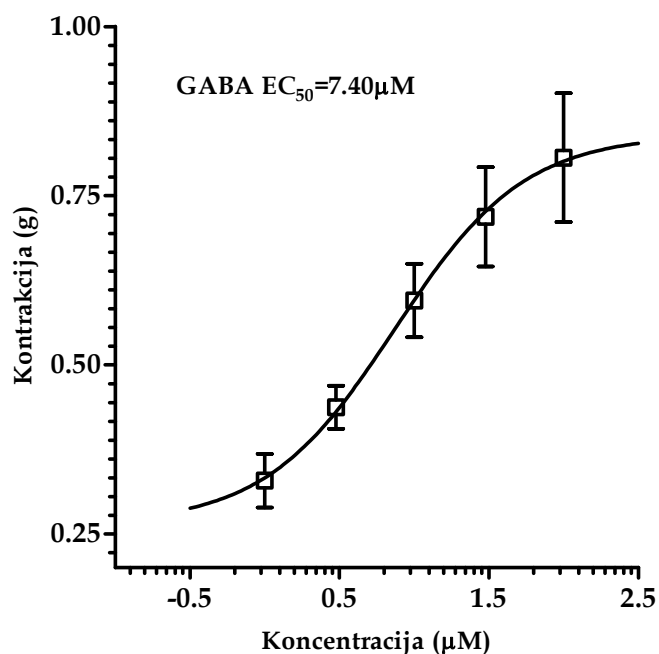
U ovim ispitivanjima koristili smo nešto izmenjen protokol. Segmenti askarisa su izlagani većem opterećenju od oko 4g tokom 15-20 minuta, sve do stabilizacije bazalnog tonusa na vrednosti između 2 i 2.5g. Ispitivane supstance su aplikovane u rastućim koncentracijama, a posle postizanja maksimalnog efekta (maksimalne relaksacije) kupatilce sa preparatom je ispirano. Sledeća aplikacija vršena je posle ponovnog uspostavljanja stabilnog bazalnog tonusa.

Na početku je sprovedeno istraživanje dozne zavisnosti reaktantnog dejstva GABA. Gama-amino buterna kiselina je aplikovana u koncentracijama od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M, kada je jasno izazvala dozno-zavisne relaksacije preparata (Slika 44).



Slika 44. Dozno-zavisni efekat rastućih koncentracija GABA na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Na osnovu prosečnih vrednosti relaksacije dobijene aplikacijom GABA, primenom metode nelinearne regresije, određena je vrednost srednje efektivne koncentracije ($n=8$) od $EC_{50}=7.40\mu$ M, sa intervalima poverenja 95% od 1.61 do 34.0 μ M. Na slici 45 prikazana je sigmoidna kriva odnosa doze i relaksantnog efekta GABA na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*.



Slika 45. Dozno-zavisna sigmoidna kriva relaksantnog dejstva GABA na neuro-mišićni preparat *Ascaris suum* (n=8)

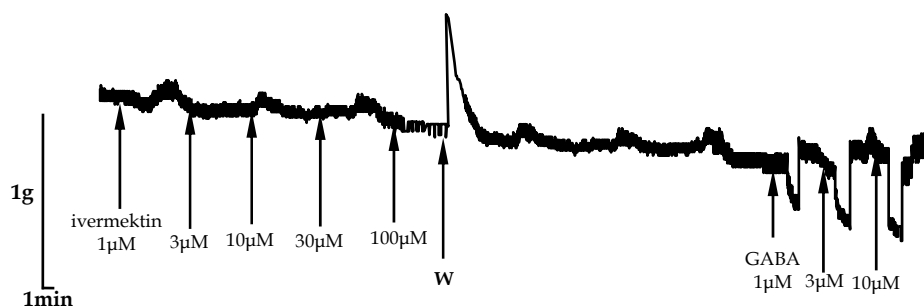
Maksimalni relaksantni efekat GABA koji proističe iz ovog ispitivanja bio je 0.84g sa intervalima poverenja 95% od 0.68 do 0.99g. U tabeli 18 prikazani su rezultati ispitivanja dozne zavisnosti dejstva GABA na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*.

Tabela 18. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija GABA na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

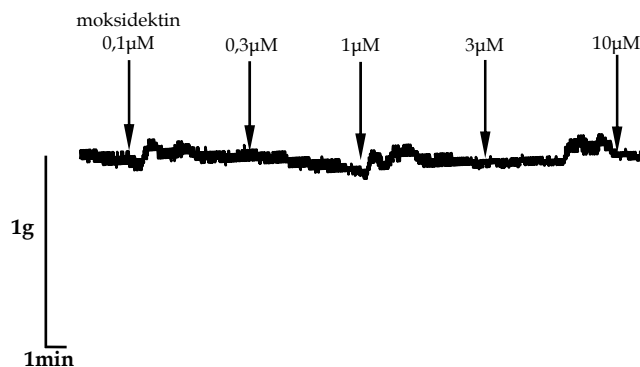
Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (µM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (µM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
7.40	1.61 do 34.0	0.86	0.84	0.68-0.99	0.52	8

U literaturi postoje podaci da avermektini deluju na GABA receptor u neuro-mišićnom sistemu parazitskih nematoda. U narednim istraživanjima ispitan je efekat rastućih koncentracija ivermektina (predstavnik avermektina) i moksidektina (prestavnik milbemicina) na neuro-mišićni preparat *A. suum*.

Na slikama 46 i 47 prikazani su zapisi dejstva ivermektina i milbemicina na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*.



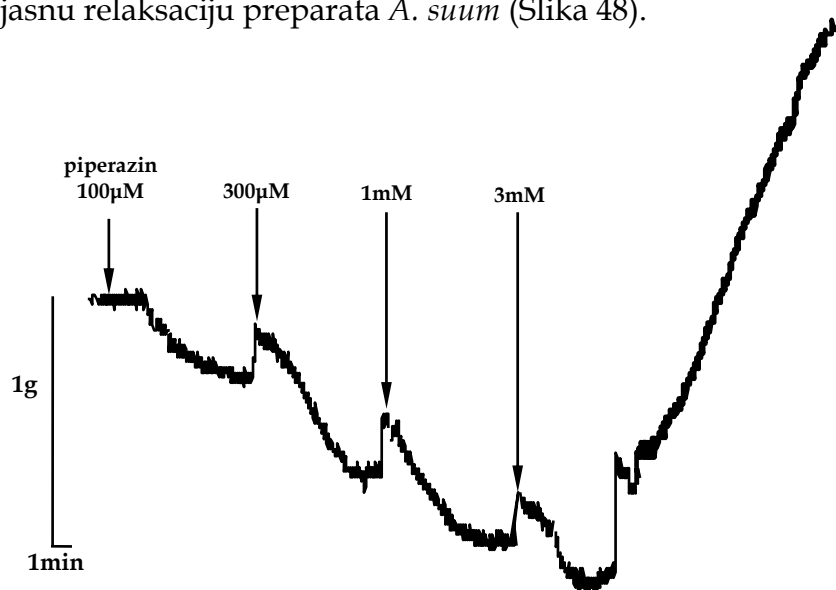
Slika 46. Prikaz tonusa neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* posle aplikacije ivermektina 1, 3, 10, 30 i 100μM, i GABA 1, 3 i 10μM



Slika 47. Prikaz tonusa neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* posle aplikacije moksidektina 0.1, 0.3, 1, 3 i 10μM

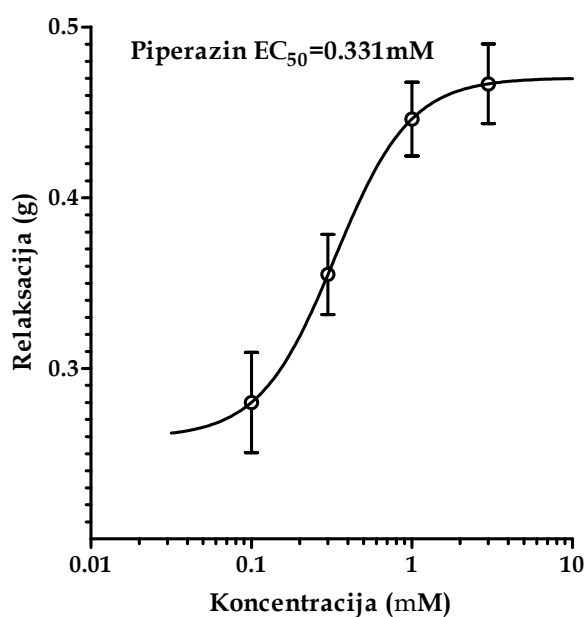
Kao što se iz zapisa sa slika 46 i 47 vidi, niti jedan od primenjenih makrocikličnih laktone nije izazvao promene tonusa, za razliku od GABA, koja je dovela do jasne dozno-zavisne relaksacije.

Različito od ivermektina i milbemicina, a slično efektu GABA, piperazin je izazvao jasnu relaksaciju preparata *A. suum* (Slika 48).



Slika 48. Dejtvo rastućih koncentracija piperazina (100µM, 300µM, 1mM, 3mM) na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Dobijeni rezultati na 6 preparata su analizirani nelinearnom regresijom i preračunata je vrednost srednje efektivne koncentracije piperazina EC_{50} , koja je iznosila 0.331mM, sa intervalima poverenja 95% od 0.134 do 0.818mM (Slika 49).



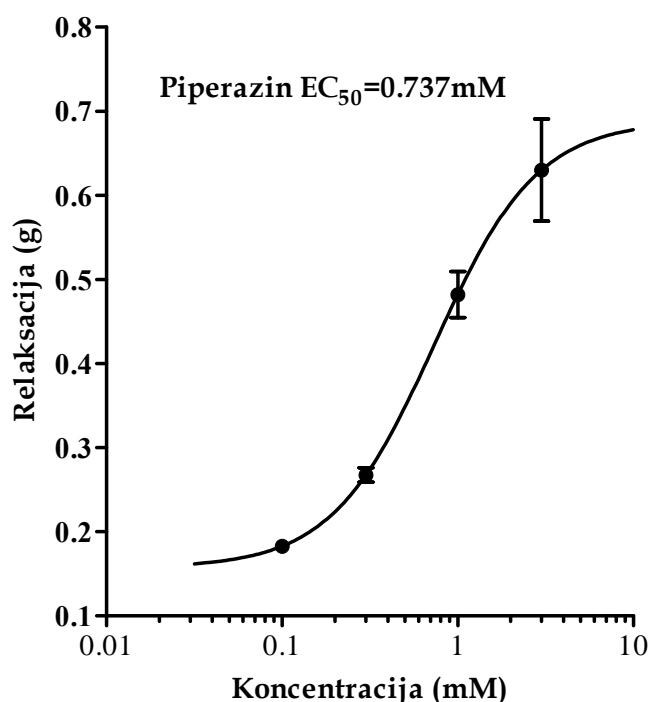
Slika 49. Dozno-zavisna sigmoidna kriva relaksantnog dejstva piperazina na neuro-mišićni preparat *Ascaris suum*

Maksimalni efekat koji je preračunat u ovom ispitivanju iznosio je 0.47g, sa intervalima poverenja 95% od 0.37 do 0.56g (Tabela 19).

Tabela 19. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija piperazina na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (mM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (mM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
0.331	0.134 do 0.818	-0.479	0.470	0.37-0.56	0.68	6

Kao što se na slici 48 vidi, za razliku od GABA, posle ispiranja piperazina više nije bilo moguće postići početni tonus. Ispitali smo doznu zavisnost i ovog dejstva piperazina. Na osnovu urađene nelinearne regresije, piperazin dozno-zavisno smanjuje osnovni tonus neuro-mišićnog preparata *A. suum* (Slika 50).



Slika 50. Dozno-zavisna sigmoidna kriva dejstva piperazina na tonus neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* (n=6)

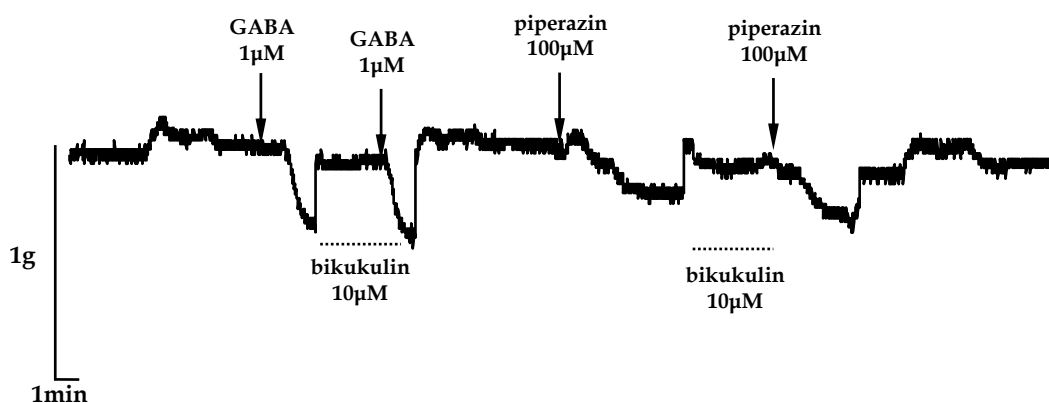
Vrednost srednje efektivne koncentracije piperazina za relaksaciju osnovnog tonusa neuro-mišićnog preparata *A. suum* iznosila je 0.737mM, sa intervalima poverenja (95%) 0.441 do 1.232mM, dok je preračunati maksimalni relaksantni efekat bio 0.688g sa intervalima poverenja (95%) od 0.512 do 0.865g (Tabela 20).

Tabela 20. Rezultati ispitivanja uticaja rastućih koncentracija piperazina na osnovni tonus neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (mM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (mM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
0.737	0.441 do 1.232	0.104	0.688	0.512 do 0.865	0.931	6

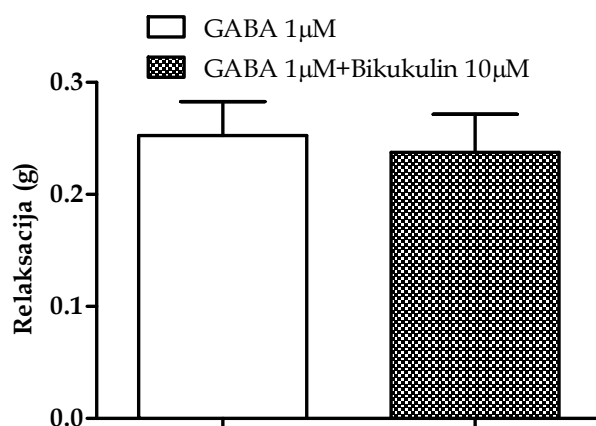
U slučaju dejstva piperazina i avermektia na neuro-mišićni preparat *A. suum* primenjivali smo iste protokole kao i za ispitivanja GABA (opisani u delu *Materijal i metod rada*). Međutim, kod obe grupe lekova primećeno je da posle ispiranja dolazi do naglog zatezanja preparata i porasta tonusa za više od 1g. Ovaj porast tonusa se posle izvesnog vremena spontano vraćao na početnu vrednost, nešto brže kod avermektina u odnosu na piperazin (slike 46 i 48).

U izvršenim ispitivanjima, GABA i piperazin su uzrokovali jasnu dozno-zavisnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Shodno dobijenim rezultatima, bilo je posebno interesantno da se utvrdi da li se ta relaksacija odigrava posredstvom GABA_A receptora.



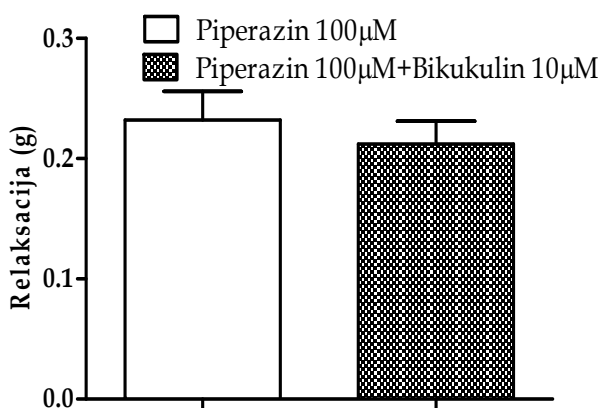
Slika 51. Efekat bikukulina (10μM) na relaksantno dejstvo GABA i piperazina na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

Testirali smo efekte GABA_A antagonistice bikukulina na dejstvo GABA i piperazina. Primenjena je koncentracija bikukulina od 10 μ M, koja je tri puta viša od njegove EC₅₀ za GABA_A receptor sisara (Slika 51). Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da bikukulin ne utiče na relaksantni efekat koji na neuro-mišićnom preparatu izazivaju GABA i piperazin (Slika 52 i 53).



Slika 52. Efekat bikukulina na relaksantno dejstvo GABA na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum* (n=5)

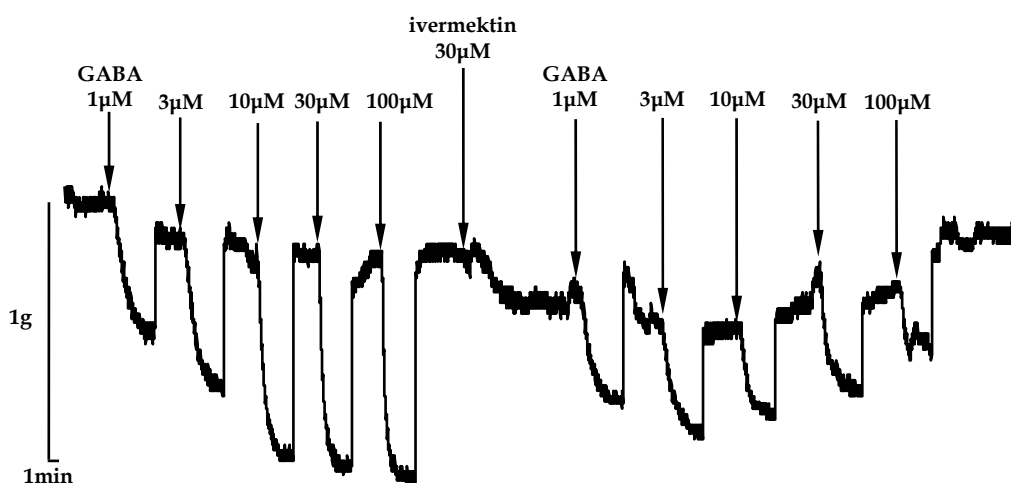
Srednja vrednost relaksacije koju izaziva GABA (1 μ M) iznosi 0.25 \pm 0.03g, dok je relaksacija u prisustvu bikukulina (10 μ M) prosečno iznosila 0.23 \pm 0.03g. Piperazin je u koncentraciji od 100 μ M izazvao prosečnu relaksaciju od 0.23 \pm 0.1g, a ovaj nivo relaksacije se nije promenio u prisustvu 10 μ M bikukulina, i iznosio je 0.21 \pm 0.08g (Slika 53).



Slika 53. Efekat bikukulina na relaksantno dejstvo piperazina na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum* (n=5)

5.4. Ispitivanje interakcije GABA sa lekovima GABA-agonistima

S obzirom da ivermektin i milbemicin nisu izazvali relaksaciju neuro-mišićnog preparata askarisa, ispitana je potencijalna interakcija GABA sa lekovima koji su označeni kao GABA agonisti. U ovom ispitivanju primenjena su dva protokola. Prvi, u kome je ispitan efekat 30 μ M ivermektina na dejstvo rastućih koncentracija GABA (1, 3, 10, 30 i 100 μ M) (Slika 54) i drugi gde je posmatran efekat iste koncentracije ivermektina na relaksantno dejstvo samo jedne koncentracije GABA (Slika 55).

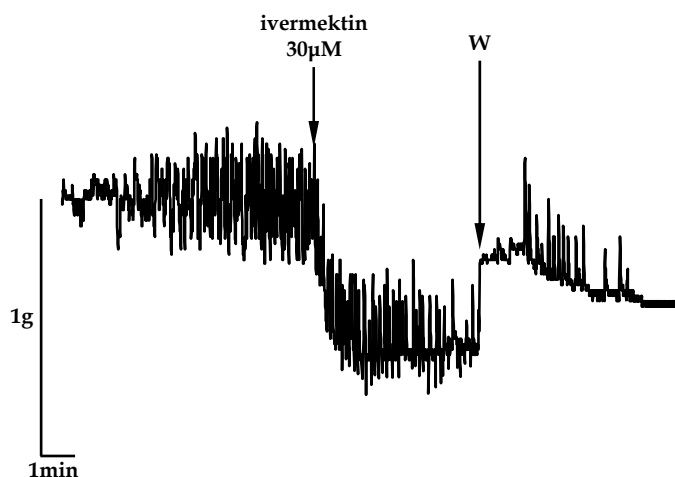


Slika 54. Efekat rastućih koncentracija GABA i GABA u prisustvu ivermektina (30 μ M) na relaksaciju neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Dobijeni rezultati ukazuju da ivermektin ne potencira relaksaciju koju izaziva GABA, ali aplikovan posle GABA izaziva smanjenje osnovnog tonusa, koje do tada nije zabeleženo kada je ivermektin aplikovan samostalno (Slika 54). Ovaj nalaz je bio konstantan i dobijan je na svim preparatima koje smo testirali (n=8).

Takođe, u ovom delu istraživanja zapažen je još jedan interesantan nalaz. Pojedini neuro-mišićni preparati askarisa ispoljavali su izuzetno intenzivnu spontanu aktivnost sa amplitudom kontrakcija između 0.3 i 0.5g. Uobičajno,

amplituda spontane aktivnosti ne prelazi 0.2g. Uzrok pojačane spontane aktivnosti nije bilo moguće odrediti, ali ono što je posebno značano jeste da je ivermektin kod takvih preparata izazivao jasnu relaksaciju (Slika 55).

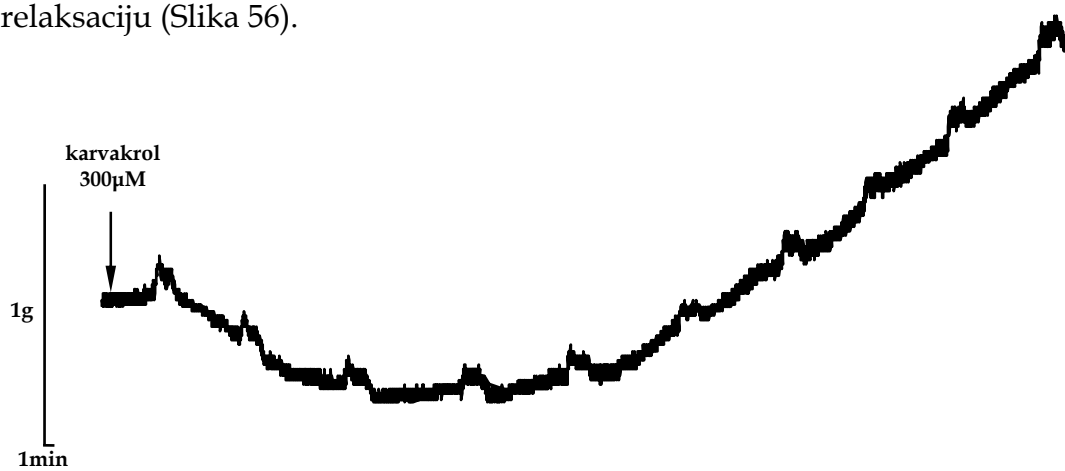


Slika 55. Relaksacioni efekat ivermektina ($30\mu\text{M}$) na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum* sa intezivnom spontanom aktivnošću

I ovaj nalaz je bio konstantan i na svim testiranim preparatima ($n=6$) relaksacija koju je ivermektin ($30\mu\text{M}$) izazivao iznosila je prosečno $0.44\pm 0.04\text{g}$. Kao što se na reprezentativnom zapisu vidi (Slika 55), amplituda spontanih kontrakcija i pored relaksacije nije bila promenjena, ali se smanjivala posle ispiranja.

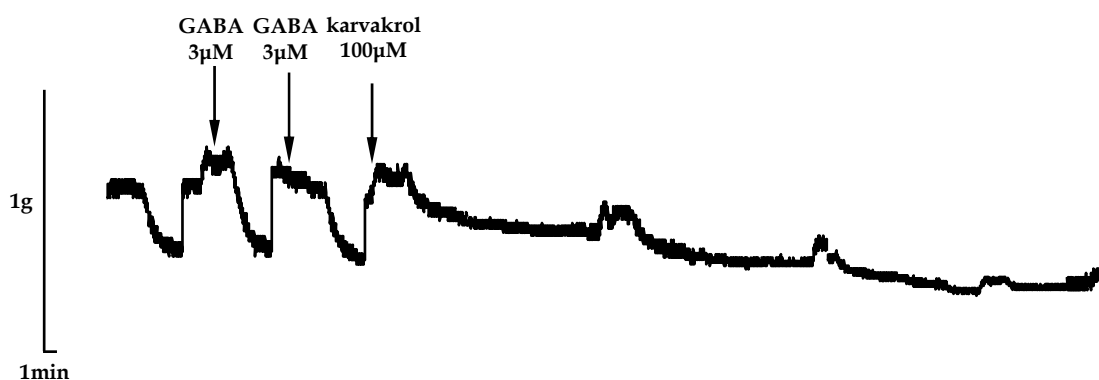
5.5. Ispitivanje mehanizma dejstva karvakrola (aktivne supstance esencijalnih biljnih ulja) na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

U ispitivanjima dejstva karvakrola na neuro-mišićni preparat *A. suum* testirali smo nekoliko koncentracija ovog aktivnog principa esencijalnih biljnih ulja: 10, 30, 100 i 300 μ M. Ni jedna od testiranih koncentracija nije izazvala kontrakcije preparata, ali su 100 i 300 μ M karvakrola uzrokovale jasnu relaksaciju (Slika 56).



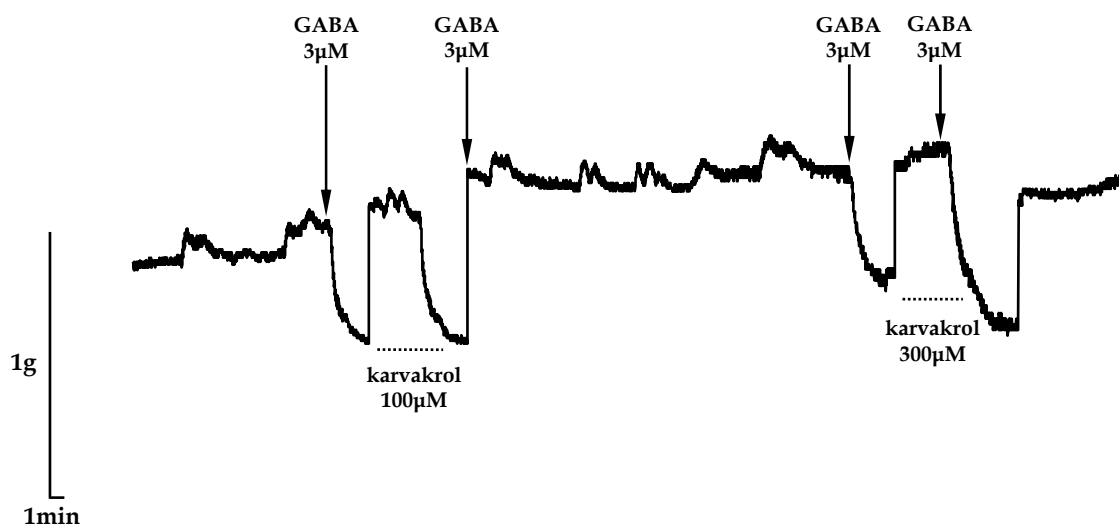
Slika 56. Dejstvo 300 μ M karvakrola na neuro-mišićni preparat *Ascaris suum*

Relaksacija je posle 300 μ M karvakrola iznosila prosečno 0.5g, ali je posebno interesantno da je relaksaciju sledilo povećanje osnovnog tonusa, koje se dešavalo dvadesetak minuta kasnije, ukoliko preparat nije ispiran (Slika 56).



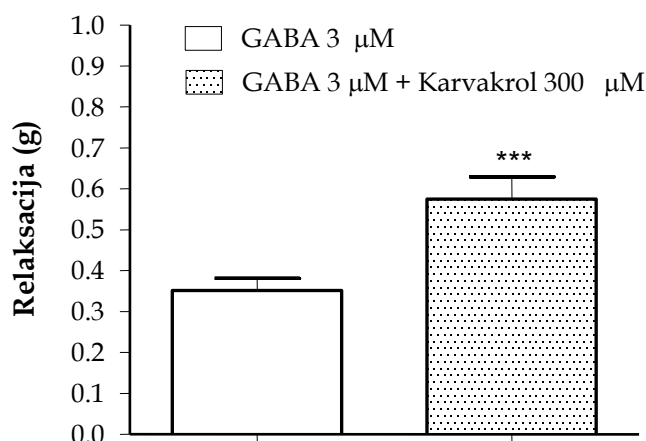
Slika 57. Dejstvo karvakrola (100 μ M) aplikovanog posle GABA (3 μ M) na relaksaciju i osnovni tonus neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*

Ovaj efekat karvakrola nije zavisio od primene GABA, i dešavao se i kada je karvakrol aplikovan posle ispiranja GABA (Slika 57). Posebno je bilo interesantno ispitati, da li karvakrol menja relaksantni efekat same GABA. Na slici 58 se vidi da karvakrol 100 i 300 μ M aplikovan 5 minuta pre GABA potencira relaksaciju koju ona izaziva.



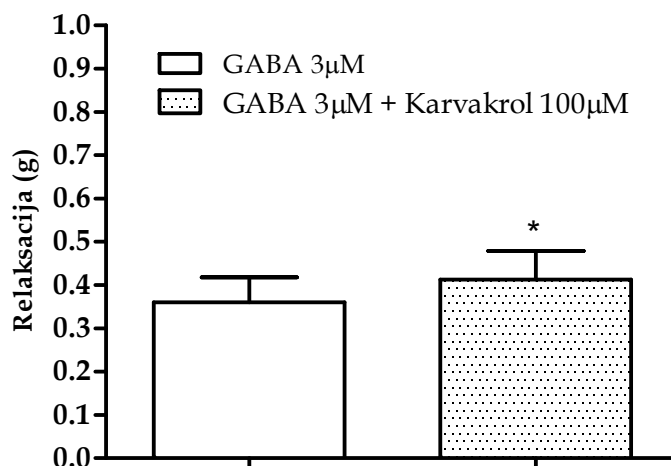
Slika 58. Dejstvo karvakrola 100 i 300 μ M na relaksaciju izazvanu sa GABA 3 μ M

Prosečna vrednost relaksacije koju je izazvala GABA (3 μ M) iznosila je 0.35 \pm 0.03g, dok je posle 5 minuta inkubacije sa karvakrolom (300 μ M) relaksacija bila visoko signifikantno viša ($P=0.0006$), 0.75 \pm 0.05g (Slika 59).



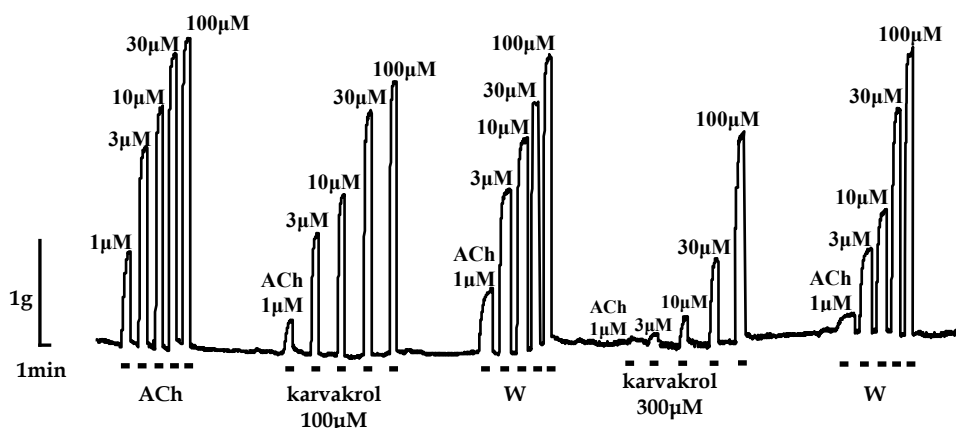
Slika 59. Srednja vrednost relaksacije (n=10) koju izaziva GABA i potenciranje tog efekta karvakrolom (***) $P=0.0006$)

I niža testirana koncentracija karvakrola od 100 μ M potencirala je relaksantno dejstvo GABA ali je signifikantnost bila slabija. Prosečna kontrolna relaksacija (n=5) posle 3 μ M GABA iznosila je 0.36 \pm 0.05g, dok je u prisustvu 100 μ M karvakrola prosečna relaksacija bila 0.41 \pm 0.06g (P=0.0116) (Slika 60).



Slika 60. Srednja vrednost relaksacije (n=5) koju izaziva GABA i potenciranje tog efekta karvakrolom 100 μ M (*P=0.0116)

Da bi se detaljnije ispitalo dejstvo karvakrola na neuro-mišićnom preparatu *A. suum* primenjen je poseban protokol. U prvoj seriji aplikovane su rastuće koncentracije ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μ M), a zatim su ove koncentracije primenjivane u prisustvu 100 i 300 μ M karvakrola (Slika 61).



Slika 61. Kontraksije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu 100 i 300 μ M karvakrola

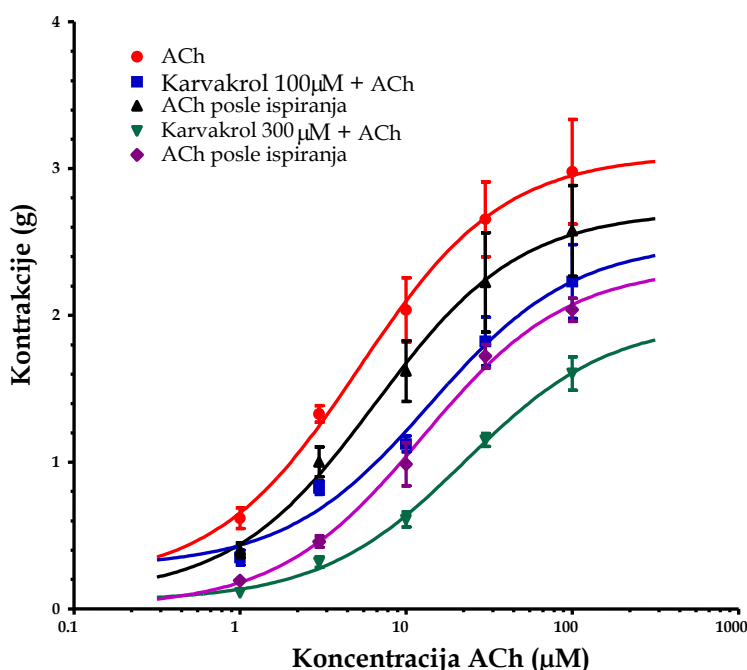
Ispitivanje je izvršeno na 5 preparata jedne kolekcije askarisa. U kontrolnoj seriji kontrakcija, EC₅₀ acetilholina je iznosila 5.22μM sa intervalima poverenja 95% od 1.67 do 16.33μM, dok je E_{max} dostigao vrednost od 3.1g (95% intervali poverenja od 2.60 do 3.58g). Posle inkubacije preparata sa 100μM karvakrola vrednost EC₅₀ acetilholina je bila udvostručena na 13.88μM (95% intervali poverenja od 5.59 do 34.46μM), a maksimalni efekat u odnosu na kontrolu smanjen za 0.6g, iznosio je 2.50g (95% intervali poverenja od 2.03 do 2.96g). Ispiranjem karvakrola, EC₅₀ acetilholina je ponovo bila na nivou kontrolnog nalaza 6.57μM (95% intervali poverenja od 1.58 do 23.06μM) ali je maksimalni efekat i dalje bio niži od kontrolnog za 0.4g (E_{max}=2.79g sa intervalima poverenja 95% od 2.16 do 3.25g). Ove vrednosti dobijene u seriji posle ispiranja 100μM karvakrola korišćene su kao kontrolne za narednu seriju kontrakcija izazvanih sa ACh u prisustvu 300μM karvakrola (Tabela 21).

Tabela 21. Rezultati ispitivanja uticaja karvakrola (100 i 300μM) na kontraktilne efekte rastućih koncentracija ACh

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (μM)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (μM)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
5.22	1.67-16.33	0.71	3.1	2.60-3.58	0.78	5
Acetilholin + Karvakrol 100μM						
13.88	5.59-34.46	1.14	2.50	2.03-2.96	0.84	5
Acetilholin posle ispiranja						
6.57	1.58-23.06	0.81	2.70	2.16-3.25	0.81	5
Acetilholin + Karvakrol 300μM						
22.72	13.86-37.24	1.35	1.96	1.69-2.22	0.94	5
Acetilholin posle ispiranja						
12.54	7.49-20.99	1.09	2.33	2.06-2.59	0.94	5

Vrednost EC₅₀ acetilholina u prisustvu 300μM karvakrola iznosila je 22.72μM sa intervalima poverenja 95% od 13.86-37.24μM, a maksimalni efekat je

bio za 0.74g niži od kontrolnog nalaza. Posle ispiranja i ove koncentracije karvakrola došlo je do delimičnog približavanja vrednosti EC_{50} acetilholina kontrolnom nalazu ali je još uvek ona bila dvostruko viša od kontrolne – 12.54 μ M. Slično je zabeleženo i kod maksimalnog efekta, jer se ovaj parametar samo delimično približio kontrolnom nalazu, E_{max} je iznosio 2.33g. Na slici 62 prikazane su koncentracijski zavisne sigmoidne krive acetilholina, konstruisane na osnovu rezultata ovog ispitivanja.



Slika 62. Dozno-zavisne sigmoidne krive efekta rastućih koncentracija acetilholina bez i u prisustvu karvakrola 100 i 300 μ M

Da bi ispitali signifikantnost inhibicije kontraktalnog efekta ACh koji proizvodi karvakrol, srednje vrednosti kontrakcija su testirane ANOVA-testom (Tabela 22). Karvakrol primenjen u koncentraciji od 100 μ M, signifikantno je smanjio kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvane sa 1, 3 i 10 μ M ACh, ali smanjenje srednje vrednosti kontrakcija posle koncentracija ACh od 30 i 100 μ M nije dostiglo stepen statističke značajnosti. Sa druge strane, 300 μ M karvakrola je signifikantno smanjilo kontrakcije izazvane sa 1, 3, 10 i 30 μ M ACh ali ne i kontrakcije izazvane sa 100 μ M ACh, mada je razlika u srednjim vrednostima dostizala 1g (Tabela 22).

Tabela 22. Srednja vrednost kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih rastućim koncentracijama ACh, ACh+karvakrol 100 μ M i ACh+karvakrol 300 μ M ($\bar{x}\pm$ SE, n=5)

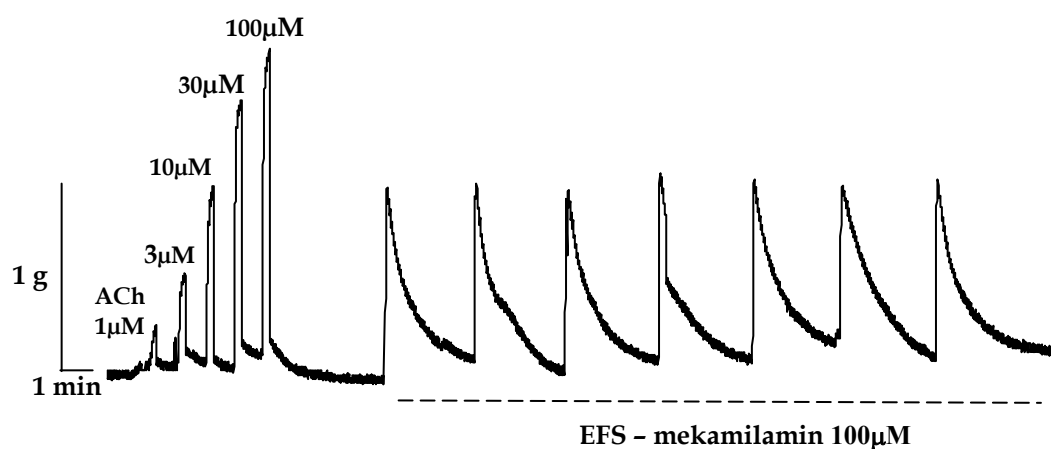
Koncentracija	KONTRAKCIJE (g)				
	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
ACh	0.61 \pm 0.07	1.32 \pm 0.05	2.03 \pm 0.02	2.65 \pm 0.25	2.97 \pm 0.35
ACh + karvakrol 100 μ M	0.35 \pm 0.05**	0.82 \pm 0.04***	1.12 \pm 0.05**	1.82 \pm 0.16	2.23 \pm 0.25
ACh (posle ispiranja)	0.39 \pm 0.04*	1.00 \pm 0.01*	1.62 \pm 0.20	2.22 \pm 0.33	2.57 \pm 0.30
ACh + karvakrol 300 μ M	0.11 \pm 0.004**	0.31 \pm 0.03***	0.60 \pm 0.05**	1.15 \pm 0.04+	1.60 \pm 0.11
ACh (posle ispiranja)	0.19 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	1.72 \pm 0.01	2.03 \pm 0.01

***P<0.0001, **P<0.001, *P<0.05, Statistički značajna razlika u odnosu na ACh;

+++P<0.0001, ++P<0.001, +P<0.05, ACh posle ispiranja.

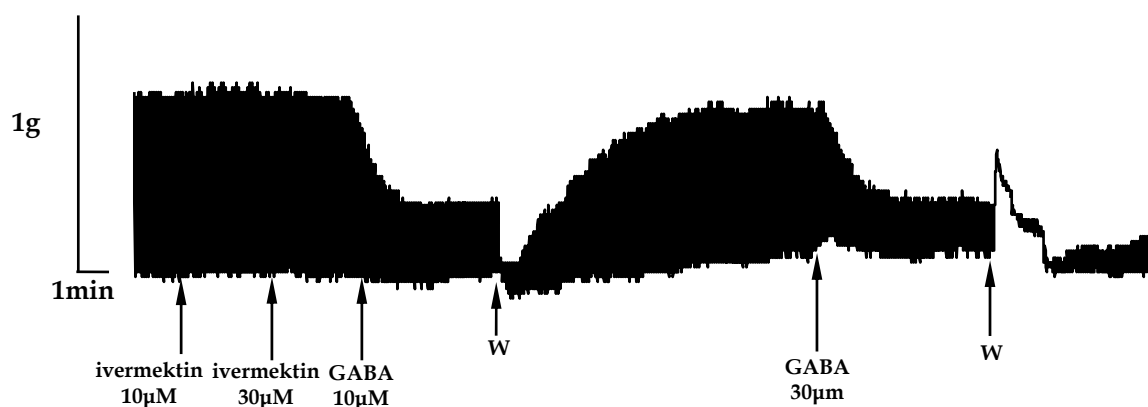
5.6. Ispitivanje dejstva antagonista nikotinskog-acetilholinskog receptora i agonista GABA receptora na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih poljnom stimulacijom

Da bi ispitili mogućnost dobijanja kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* električnim poljem (*Electric Field Stimulation - EFS*), testirali smo efekte različitih parametara stimulacije: frekvencu od 10 do 100Hz, širinu impulsa od 0,01-1.0ms, trajanje paketa stimulacije od 2.0 sekunde do kontinuirane stimulacije. Svaki preparat je posle započinjanja kontrakcija izlagan mekamilaminu 100 μ M, kako bi se utvrdilo da li su kontrakcije posledica presinaptičkog oslobađanja ACh ili se radi o direktnoj stimulaciji mišićnih ćelija (kontraktilne mašine). Ni jednom kombinacijom testiranih parametara nije dobijena indirektna stimulacija, odnosno sve kontrakcije izazvane EFS bile su neosetljive na mekamilamin (Slika 63).



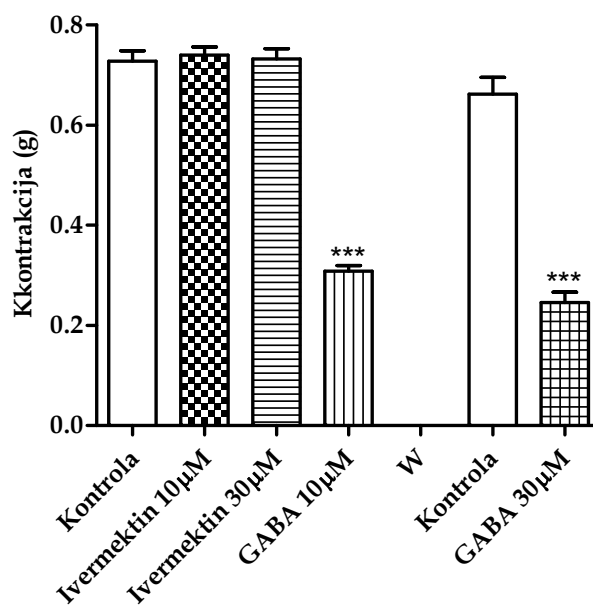
Slika 63. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum*, izazvane rastućim koncentracijama ACh i Električnom poljnom stimulacijom - EFS (100Hz, 1.0ms, 3min, 25V) bez i u prisustvu mekamilamina 100 μ M

Pored ispitivanja dejstva nikotinskog antagoniste mekamilamina, testirano je i dejstvo GABA i GABA-agonista. Za izazivanje kontrakcija korišćeni su isti parametri kao i u prvom delu istraživanja, ali je uglavnom testirana kontinuirana stimulacija.



Slika 64. Efekti ivermektina i GABA na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane kontinuiranom EFS (100Hz, 1.0ms, 25V)

Kako to se na slici 64 vidi, ivermektin nije imao nikakav efekat na kontrakcije preparata *A. suum* izazvane sa EFS, dok je GABA 10 i 30µM, dovela do smanjenja amplitude kontrakcija.

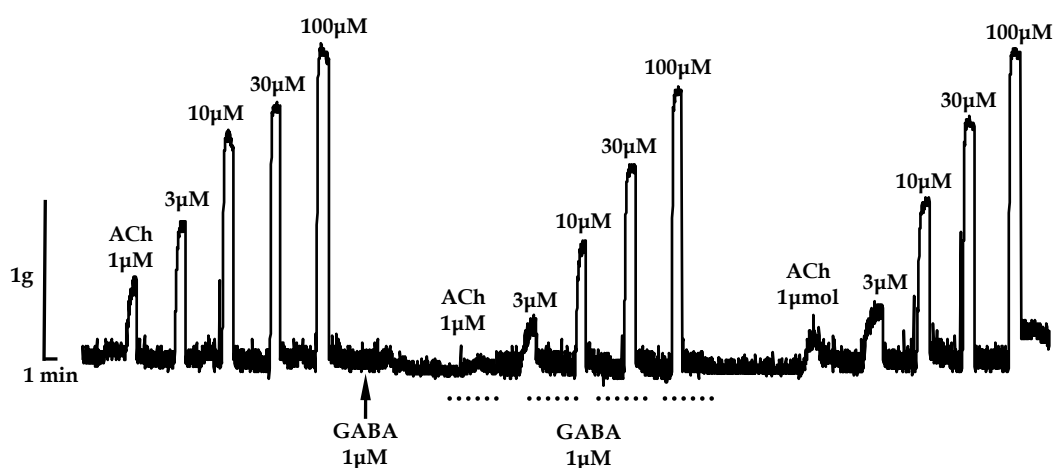


Slika 65. Dejstvo ivermektina i GABA na amplitudu kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvanih kontinuiranom EFS (100Hz, 1.0ms, 25V) (n=5) (***) $P < 0.0001$

Prosečna vrednost amplitude početnih kontrolnih kontrakcija izazvanih sa EFS iznosila je $0.73 \pm 0.02g$, dok je amplituda kontrakcija u prisustvu ivermektina 10 i $30 \mu M$ bila $0.74 \pm 0.02g$, odnosno $0.72 \pm 0.02g$. Za razliku od ivermektina, GABA je ispoljila izraziti inhibitorski efekat na amplitudu kontrakcija. U odnosu na kontrolne kontrakcije, obe testirane koncentracije GABA (10 i $30 \mu M$) značajno ($P < 0.0001$) su smanjile amplitudu kontrakcija. Dobijena vrednost prosečne kontrakcije u prisustvu $10 \mu M$ GABA bila je $0.31 \pm 0.01g$, dok je trostruko viša koncentracija GABA smanjila vrednost amplitude sa prosečno $0.66 \pm 0.03g$ na $0.25 \pm 0.02g$ (Slika 65).

5.7. Ispitivanje interakcije GABA i nikotinskih agonista na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

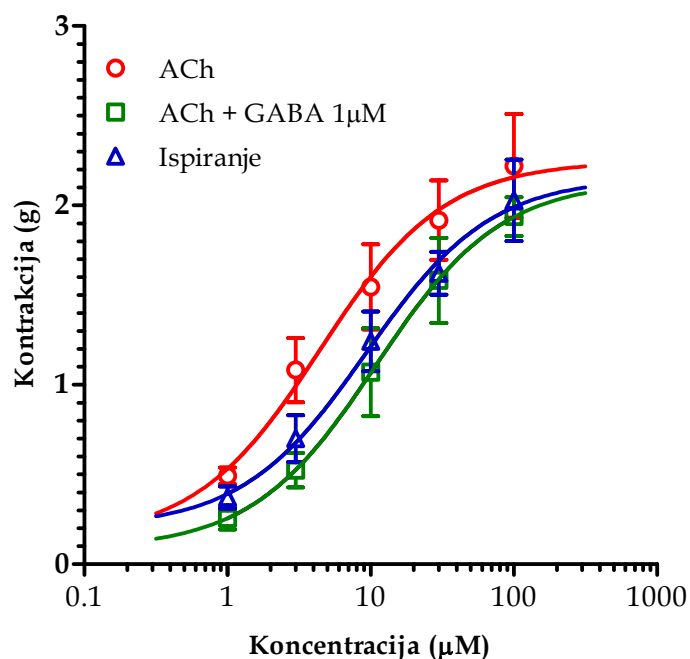
U ovom delu ispitivanja korišćen je protokol po kome su aplikovane rastuće doze ACh, 1, 3, 10, 30 i 100 μ M, bez i u prisustvu GABA ili lekova GABA-agonista. Praćene su dobijene kontrakcije i koncentracijska zavisnost dobijenog efekta. U prvom ispitivanju određena je vrednost srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) ACh bez i u prisustvu 1 μ M GABA. Ova koncentracija GABA je bila najniža koja je izazivala jasnu relaksaciju u predhodnom ispitivanju, ali u primenjenom protokolu veće relaksacije nije bilo jer su preparati izlagani početnoj tenziji od samo 0.5-1.0g (Slika 66).



Slika 66. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* dobijene posle aplikacije rastućih koncentracija ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μ M) bez i u prisustvu 1 μ M GABA

Ispitivanja su urađena na jednoj kolekciji askarisa a testirano je ukupno 5 preparata (n=5). Kontrolna vrednost srednje efektivne koncentracije ACh (EC_{50}) za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* bila je 4.42 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 0.92 do 21.15 μ M. Posle inkubacije preparata sa 1 μ M GABA i aplikacije istih rastućih doza ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μ M), sada u prisustvu GABA, došlo je do dvostrukog povećanja vrednosti EC_{50} na 10.94 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 3.58 do 33.42 μ M. Maksimalni efekat ACh u prisustvu GABA

nije se puno razlikovao od kontrolne vrednosti i iznosio je 2.13g. Posle ispiranja GABA vrednost EC_{50} ACh se smanjila ali nije dostigla predhodnu kontrolnu (početnu) vrednost i iznosila je $9.35\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 3.22 do $27.8\mu\text{M}$.



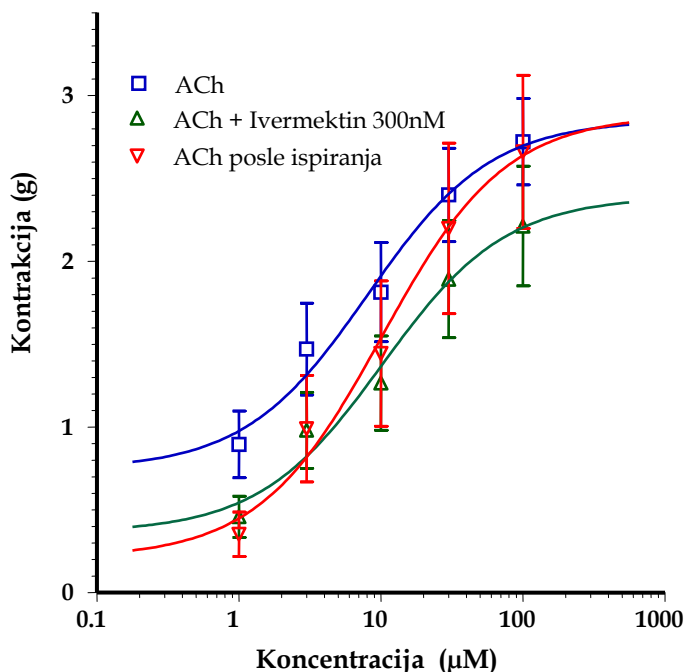
Slika 67. Koncentracijski zavisne sigmoidne krive efekata rastućih koncentracija ACh bez i u prisustvu $1\mu\text{M}$ GABA

Maksimalni efekat koji je zabeležen u ovom ispitivanju bio je na nivou predhodnih vrednosti i iznosio je 2.15g (Slika 67 i Tabela 23).

Tabela 23. Rezultati ispitivanja uticaja GABA ($1\mu\text{M}$) na kontraktilne efekte rastućih koncentracija ACh

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
4.42	0.92-22.97	0.64	2.24	1.80-2.68	0.67	5
Acetilholin + GABA $1\mu\text{M}$						
10.94	3.58-33.42	1.03	2.13	1.65-2.61	0.77	5
Ispiranje						
9.35	3.22-27.80	0.97	2.15	1.74-2.56	0.79	5

Za razliku od GABA, ivermektin u koncentraciji od 300nM nije promenio vrednost EC_{50} acetilholina. Ova ispitivanja izvršena su na 6 preparata askarisa iz dve kolekcije (Slika 68).



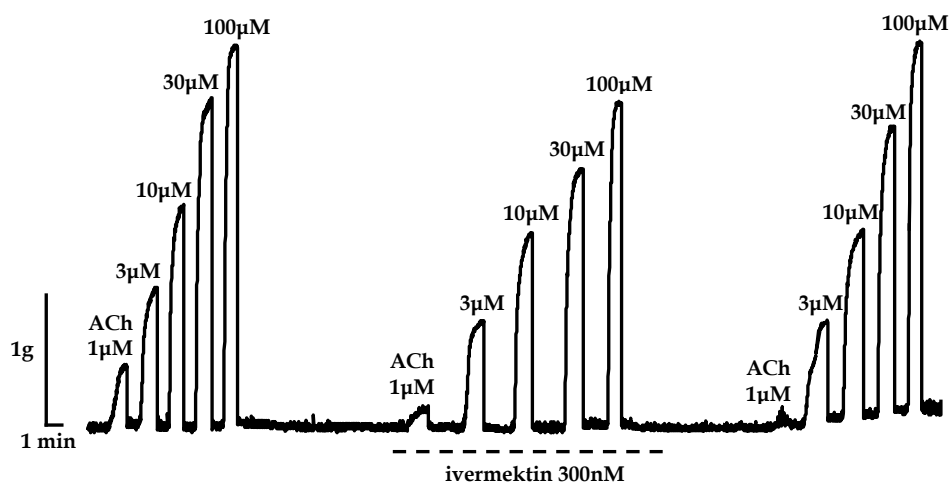
Slika 68. Koncentracijski zavisne sigmoidne krive efekata rastućih koncentracija ACh bez i u prisustvu 300nM ivermektina (n=6)

Kontrolna vrednost EC_{50} acetilholina iznosila je $8.09\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 1.40 do $46.77\mu\text{M}$, dok je preračunati maksimalni efekat (E_{max}) bio 2.85g (Tabela 24).

Tabela 24. Rezultati ispitivanja uticaja ivermektina (300nM) na kontraktilne efekte rastućih koncentracija ACh

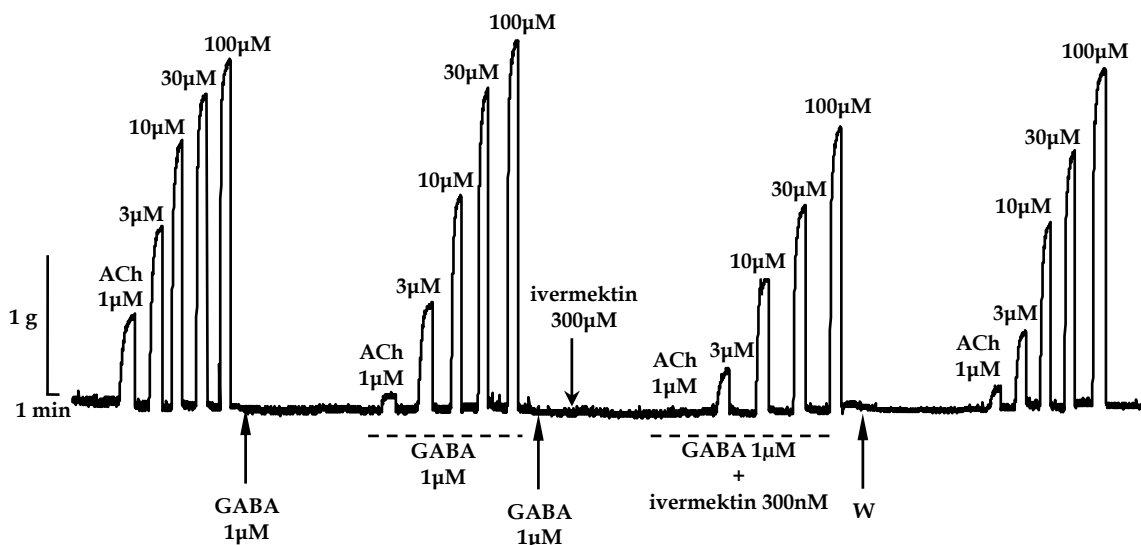
Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
8.09	1.40-46.77	0.90	2.85	2.17-3.53	0.53	6
Acetilholin + ivermektin 300nM						
10.26	1.49-70.52	1.01	2.39	1.59-3.18	0.48	6
Acetilholin posle ispiranja						
10.19	1.31-79.33	1.00	2.88	1.76-4.00	0.58	6

U prisustvu ivermektina (300nM), EC_{50} acetilholina se nije značajno razlikovala od kontrolne vrednosti i iznosila je $10.26\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 1.49 do $70.52\mu\text{M}$. Međutim, smanjena je bila vrednost maksimalnog efekta E_{max} za oko 0.5g , odnosno bila je 2.39g (Slika 69 i Tabela 24). Posle ispiranja ivermektina, vrednost EC_{50} acetilholina se nije značajnije promenila i iznosila je $10.19\mu\text{M}$, sa intervalima poverenja 95% od 1.31 do $79.33\mu\text{M}$. Međutim, maksimalni efekat E_{max} , je ponovo dostigao početni nivo od 2.88g , sa intervalima poverenja 95% od 1.76 do 4.00g . Na slici 69 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata askarisa izazvanih acetilholinom bez i u prisustvu 300nM ivermektina.



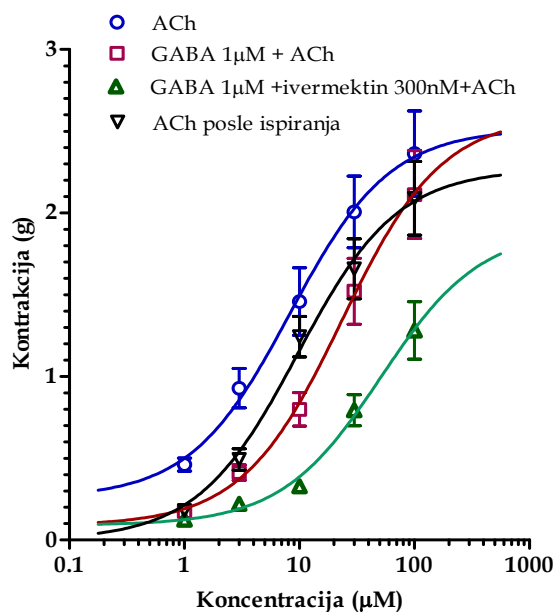
Slika 69. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama ACh (1, 3, 10, 30 i $100\mu\text{M}$), bez i u prisustvu ivermektina (300nM)

Da bi ispitali potencijalnu interakciju GABA i ivermektina na kontrakcije izazvane acetilholinom, primenili smo nov protokol. U ovom protokolu prvo su aplikovane samo rastuće koncentracije acetilholina, zatim te iste koncentracije acetilholina u prisustvu GABA, pa ponovo iste kontrakcije acetilholina u prisustvu kombinacije GABA ($1\mu\text{M}$) + ivermektin (300nM), i na kraju posle ispiranja, još jedna serija kontrolnih kontrakcija izazvanih samo acetilholinom. Ispitivanje je sprovedeno na 8 preparata askarisa iz dve kolekcije. Reprezentativni zapis prikazan je na slici 70.



Slika 70. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama ACh, bez i u prisustvu GABA ($1\mu\text{M}$) i u prisustvu kombinacije GABA ($1\mu\text{M}$)+ivermektin (300nM)

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) acetilholina u kontrolnim kontrakcijama bila je $8.28\mu\text{M}$ sa intervalima poverenja 95% od 2.64 do $25.94\mu\text{M}$, dok je maksimalni efekt iznosio je 2.51g (Slika 71 i Tabela 25).



Slika 71. Sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekata acetilholina, acetilholina u prisustvu GABA ($1\mu\text{M}$), acetilholina u prisustvu GABA ($1\mu\text{M}$) + ivermektina (300nM) i acetilholina posle ispiranja ($n=8$)

GABA je pomerila koncentracijski-zavisnu efektivnu krivu u desno. Vrednost EC_{50} bila je skoro trostruko viša, $23.44\mu M$ sa intervalima poverenja 95% od 9.03 do $60.78\mu M$, dok se maksimalni efekat od 2.59g nije ni razlikovao od kontrolnog nalaza. Međutim, dodavanje još i ivermektina (300nM), zajedno sa GABA, imalo je za posledicu šestostruko povećanje EC_{50} acetilholina i dalje pomeranje dozno-zavisne krive u desno. Preračunata vrednost EC_{50} iznosila $50.12\mu M$, sa intervalima poverenja 95% od 17.13 do $152.6\mu M$, ali je ponovo došlo i do smanjenja maksimalnog efekta na 1.90g. Posle ispiranja, vrednost EC_{50} se skoro vratila na početnu vrednost, iznosila je $9.59\mu M$, ali je E_{max} ostao na nivou zabeleženom u prisustvu ivermektina i iznosio 2.27g (Tabela 25).

Tabela 25. Rezultati ispitivanja uticaja GABA ($1\mu M$) i ivermektina (300nM) na kontraktilne efekte rastućih koncentracija ACh

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) (μM)	95% intervali poverenja EC_{50} (μM)	Log EC_{50}	Maksimalni efekat (E_{max}) (g)	95% intervali poverenja (E_{max}) (g)	Koeficijent regresije (R^2)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
8.28	2.64-25.94	0.91	2.51	2.03-2.99	0.65	8
Acetilholin + GABA $1\mu M$						
23.44	9.03-60.78	1.37	2.59	1.91-3.28	0.74	8
Acetilholin + GABA $1\mu M$ + ivermektin 300nM						
50.17	17.13-152.6	1.70	1.90	1.11-2.68	0.75	8
Acetilholin posle ispiranja						
9.59	3.99-23.06	0.98	2.27	1.87-2.66	0.77	8

Kako bi utvrdili da li dokazana interakcija GABA sa ivermektinom ispoljava signifikantni inhibitorski efekat na kontrakcije koje izaziva ACh, uporedili smo srednje vrednosti kontrakcija dobijenih rastućim koncentracijama ACh sa kontrakcijama dobijenim posle tih istih koncentracija ACh u prisustvu GABA i kombinacije GABA sa ivermektinom. Takođe, testirali smo signifikantnost i reverzibilnost ovog efekta, odnosno analizirane su i kontrakcije koje izaziva ACh posle ispiranja GABA i ivermektina.

Tabela 26. Srednje vrednost kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama ACh, ACh + GABA (1 μ M), ACh + GABA (1 μ M) + ivermektin (300nM) i ACh posle ispiranja ($x \pm SE$, n=8)

Koncentracija	KONTRAKCIJE (g)				
	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
ACh	0.46 \pm 0.03	0.92 \pm 0.12	1.45 \pm 0.02	2.00 \pm 0.21	2.36 \pm 0.26
ACh + GABA 1 μ M	0.17 \pm 0.01***	0.41 \pm 0.04***	0.79 \pm 0.10**	1.52 \pm 0.20 ⁺	2.11 \pm 0.26
ACh +GABA 1 μ M + ivermektin 300nM	0.12 \pm 0.01***	0.22 \pm 0.02***	0.33 \pm 0.03***	0.79 \pm 0.09***	1.28 \pm 0.17*
ACh posle ispiranja	0.18 \pm 0.02***	0.49 \pm 0.06**	1.24 \pm 0.12***	1.65 \pm 0.18 ⁺	2.09 \pm 0.01

***P<0.0001, **P<0.001, *P<0.05, Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni nalaz;
 +++P<0.0001, +P<0.05, Statistički značajna razlika u odnosu na efekat GABA + ivermektin.

U tabeli 26 prikazane su srednje vrednosti kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* dobijene u ovom ispitivanju. GABA je u koncentraciji od 1 μ M signifikantno smanjila (**P<0.0001,**P<0.001) prosečnu vrednost kontrakcija izazvanih sa 1, 3 i 10 μ M ACh, ali je signifikantnost inhibicije opadala sa porastom primenjene koncentracije ACh, tako da GABA nije ispoljila statistički značajan efekat na kontrakcije koje su dobijene posle dve najviše koncentracije ACh (30 i 100 μ M). Sa druge strane, kombinacija GABA (1 μ M) i ivermektina (300nM), visoko signifikantno je smanjila kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvane sa 1, 3, 10 i 30 μ M ACh (**P<0.0001) i signifikantno inhibisala (*P<0.05) kontrakcije koje je proizvela najviša testirana koncentracija ACh od 100 μ M. Mada su prosečne vrednosti kontrakcija dobijenih posle rastućih koncentracija ACh u prisustvu kombinacije GABA i ivermektina bile najčešće dvostruko niže u odnosu na komparativni nalaz dobijen samo u prisustvu GABA, ova razlika nije dostigla stepen statističke značajnosti.

Da bi se detaljnije ispitala priroda interakcije između GABA agonista i da bi se analizirao mehanizam njihovog dejstva na kontrakcije parazitskih nematoda, testiran je efekat piperazina i kombinacije piperazina sa ivermektinom na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Primenjen je isti protokol kao i u prethodnom ispitivanju, aplikovane su iste rastuće

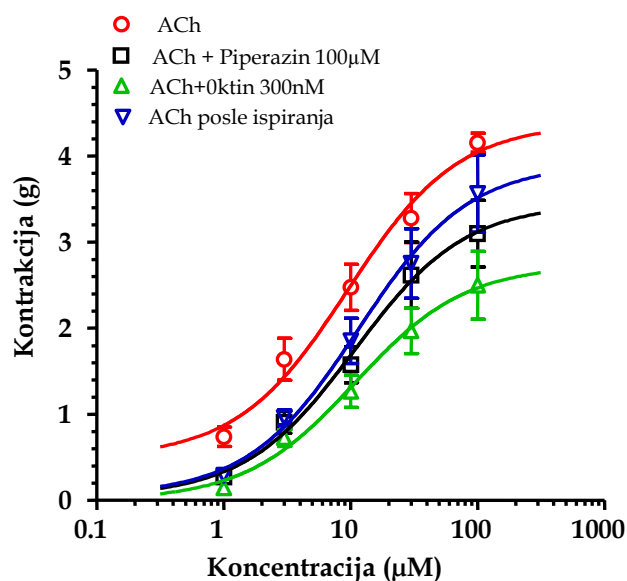
koncentracije ACh koje su korišćene u ispitivanju interakcije GABA sa ivermektinom. Piperazin je testiran u koncentraciji od 100 μ M, najnižoj iz ispitivanja njegovog relaksantnog dejstva, dok je ivermektin primenjen kao i prethodno u koncentraciji od 300nM. U tabeli 27 navedeni su rezultati ispitivanja odnosa doze (koncentracije) i efekta (kontrakcije) ACh bez, i u prisustvu GABA agonista. Ispitivanje je sprovedeno na 5 preparata jedne kolekcije askarisa.

Tabela 27. Rezultati ispitivanja uticaja piperazina (100 μ M) i ivermektina (300nM) na kontraktilne efekte rastućih koncentracija ACh

Srednja efektivna koncentracija (EC ₅₀) (μ M)	95% intervali poverenja EC ₅₀ (μ M)	Log EC ₅₀	Maksimalni efekat (E _{max}) (g)	95% intervali poverenja (E _{max}) (g)	Koeficijent regresije (R ²)	Broj testiranih preparata (n)
Acetilholin						
9.47	4.28-20.98	0.97	4.38	3.77-4.98	0.84	5
Acetilholin + piperazin 100μM						
10.76	3.61-31.99	1.03	3.45	2.67-4.22	0.78	5
Acetilholin + piperazin 100μM + ivermektin 300nM						
10.88	3.38-34.96	1.03	2.73	2.06-3.40	0.76	5
Acetilholin posle ispiranja						
11.48	3.38-34.96	1.06	3.91	3.96-33.25	0.79	5

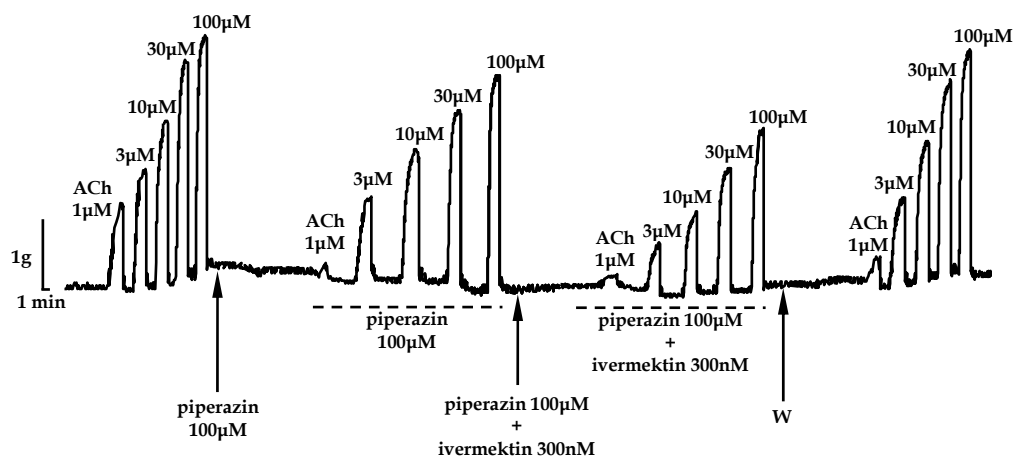
Srednja efektivna koncentracija ACh (EC₅₀) u kontrolnoj seriji kontrakcija bila je 9.47 μ M sa intervalima poverenja 95% od 4.28 do 20.98 μ M, dok je maksimalni efekat (E_{max}) iznosio 4.38g. Posle izlaganja preparata piperazinu, vrednost EC₅₀ se nije značajnije promenila, iznosila je 10.76 μ M, sa intervalima poverenja 95% od 3.61-31.99 μ M. Međutim, za skoro 1g bio smanjen preračunati maksimalni efekat, koji je dostigo 3.45g. Kada je u hranjivi rastvor osim piperazina dodavan i ivermektin, vrednost EC₅₀ ACh je i dalje ostala nepromenjena, 10.88 μ M (95% intervali poverenja od 3.38 do 34.96 μ M), ali je maksimalni efekat još više bio smanjen, čak do 2.73g. Posle ispiranja oba GABA agonista, kontrolna vrednost EC₅₀ ACh iznosila je 11.48 μ M (95%

intervali poverenja od 3.38 do 34.96 μ M), dok se vrednost E_{max} ponovo približila početnoj vrednosti i iznosila 3.91g (Slika 72).



Slika 72. Koncentracijski zavisne krive odnosa doze i efekta ACh i ACh u prisustvu piperazina 100 μ M i ivermektina 300nM (n=5)

Na slici 73 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* izazvanih ACh, ACh u prisustvu piperazina (100 μ M), kao i u prisustvu kombinacije piperazin (100 μ M) + ivermektin (300nM).

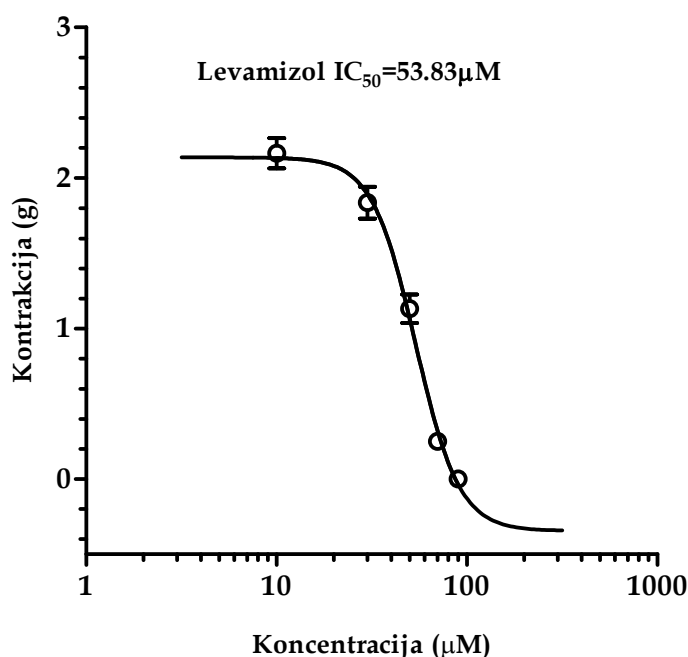


Slika 73. Kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane rastućim koncentracijama ACh bez i u prisustvu piperazina (100 μ M), odnosno piperazina i ivermektina (300nM)

5.8. Ispitivanja efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovane dijafragme pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS)

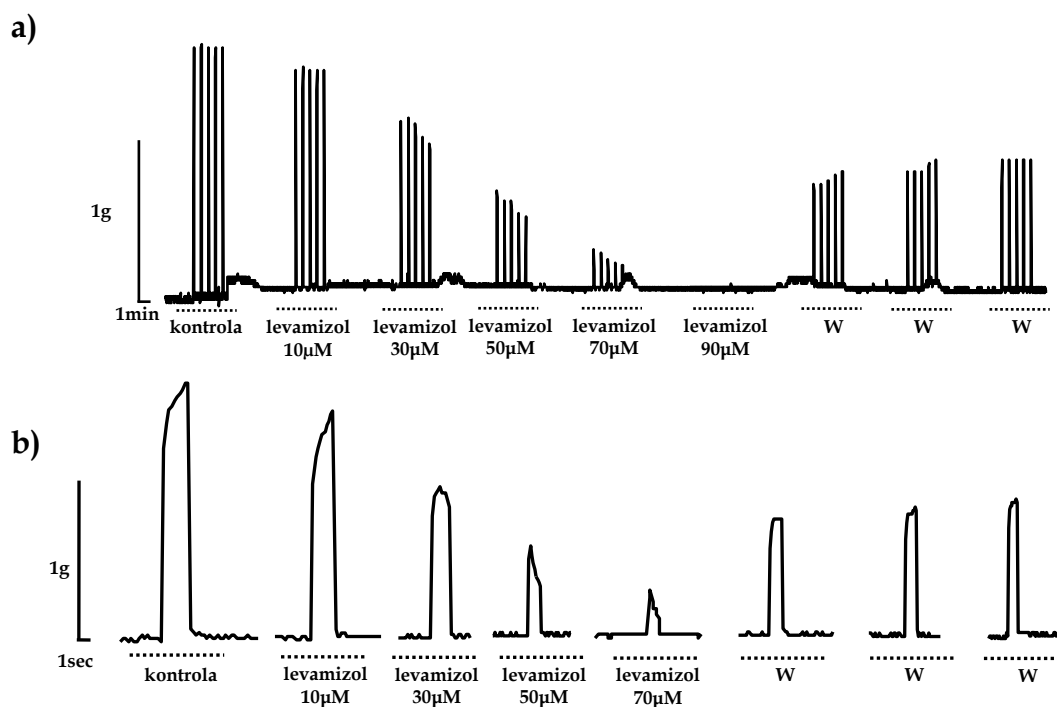
U ovom delu ispitivanja preparati dijafragme pacova su stimulisani električnom poljnom stimulacijom (EFS), odnosno tetaničnim pulsevima u "paketima" od po 5 stimulacija svakih 30 sekundi (sa parametrima stimulacije: širina impulsa 10 μ s, frekvencija 50Hz, napon 20V, trajanje impulsa 2s) sa pauzom od 3 minuta između "paketa". Ispitivani lekovi su posle kontrolnog paketa kontrakcija aplikovani odmah posle zadnjeg ispiranja, odnosno 3 minuta pre naredne serije stimulacija (EFS). Na kraju ispitivanja svaki preparat je testiran sa 100 μ M mekamilamina, kako bi se potvrdilo da se radi o indirektnoj stimulaciji.

Levamisol je ispoljio dozno-zavisni inhibitorni efekat na kontrakcije dijafragme, sa srednjom inhibitornom koncentracijom (IC_{50}) od 53.83 μ M (95% intervali poverenja od 46.94 do 61.73 μ M (Slika 74).



Slika 74. Sigmoidna kriva odnosa koncentracije i inhibitornog efekta levamizola (10, 30, 50, 70 i 90 μ M) na kontrakcije preparata dijafragme izazvane EFS (n=7)

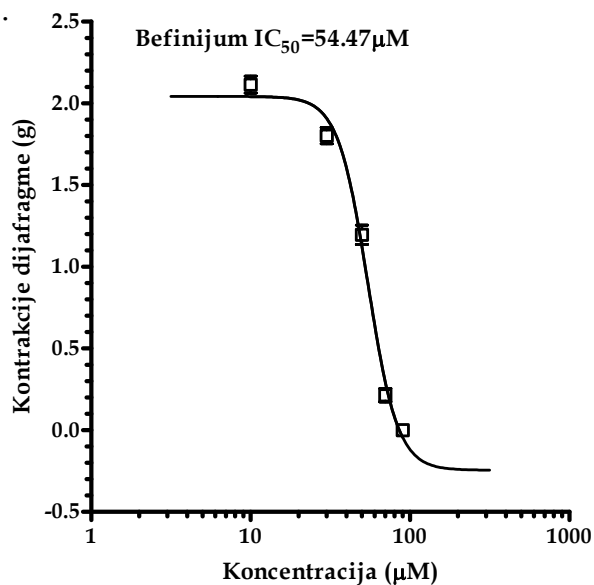
Zabeleženi inhibični efekat levamizola na kontrakcije dijafragme bio je reverzibilan i posle ispiranja najviše primenjene koncentracije (koja je izazvala 100% inhibiciju) i kontrakcije su se delimično normalizovale (Slika 75a). Takođe, levamizol je u koncentracijama iznad $30\mu\text{M}$ izazvao jasno tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*) (Slika 75b).



Slika 75. a) Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane EFS i efekat rastućih koncentracija levamizola; **b)** tetanično slabljenje (*tetanic fade*) kontrakcija posle primene 50 i $70\mu\text{M}$ levamizola

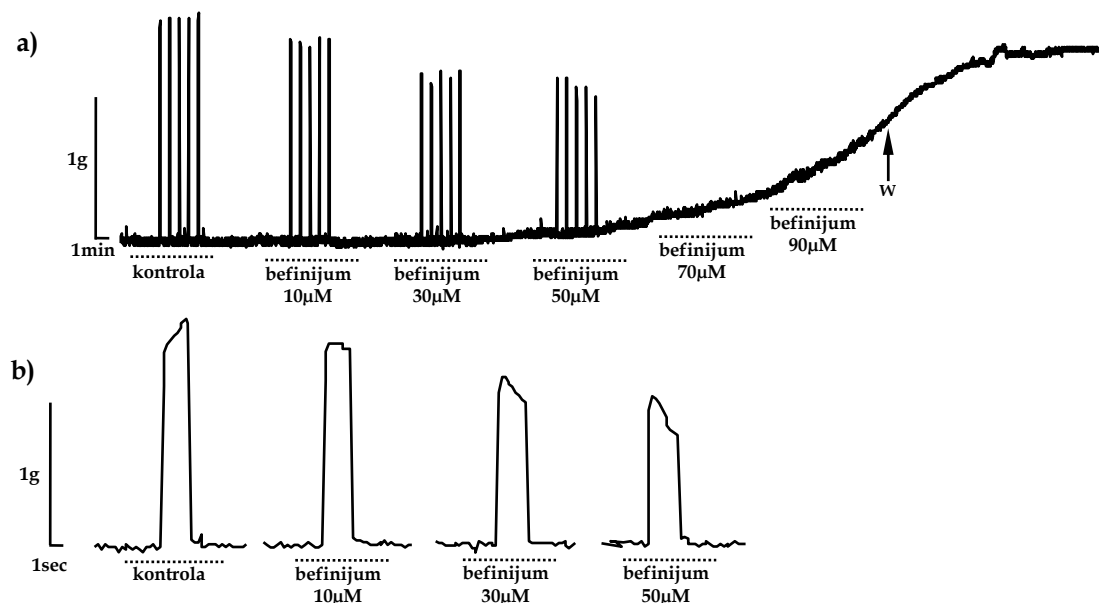
Pored levamizola, ispitano je i dejstvo befinijuma na kontrakcije dijafragme izazvane sa EFS. Primenjen je isti protokol kao i u ispitivanju levamizola i ukupno 10 preparata dijafragme pacova ($n=10$) stimulirano je tetaničnim pulsevima u "paketima" od po 5 stimulacija svakih 30 sekundi ($10\mu\text{s}$, 50Hz , 20V , 2s) sa pauzom od 3 minuta između "paketa". Posle kontrolnih kontrakcija, befinijum je aplikovan 3 minuta pre narednog stimacionog paketa u rastućim koncentracijama (10, 20, 30, 50, 70 i $90\mu\text{M}$). Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da je befinijum koncentracijski-zavisno inhibisao kontrakcije dijafragme, pri čemu je vrednost srednje inhibitorne

koncentracije (IC_{50}) iznosila $54.47 \mu\text{M}$ sa intervalima poverenja 95% od 51.22 do $57.91 \mu\text{M}$ (Slika 76).



Slika 76. Sigmoidna kriva odnosa koncentracije i inhibitornog efekta befinijuma ($10, 30, 50, 70$ i $90 \mu\text{M}$) na kontrakcije preparata dijafragme izazvane EFS ($n=7$)

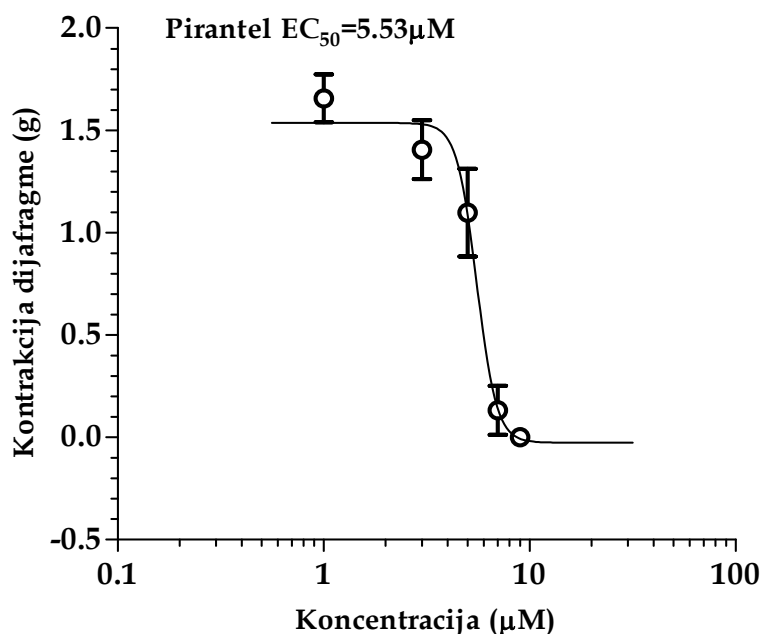
Na slici 77 prikazan je reprezentativni zapis kontrakcija dijafragme pacova izazvane sa EFS bez i u prisustvu rastućih koncentracija befinijuma.



Slika 77. a) Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane sa EFS i efekta rastućih koncentracija befinijuma; **b)** tetanijsko slabljenje (*tetanic fade*) posle $10, 30$ i $50 \mu\text{M}$ befinijuma

U ispitivanjima sa befinijumom primećeno je da se bazalni tonus postepeno spontano podiže i pored ispiranja preparata (Slika 77a). Takođe, specifično za befinijum, tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*) ovde je zabeleženo već u koncentracijama višim od $10\mu\text{M}$ (Slika 77b).

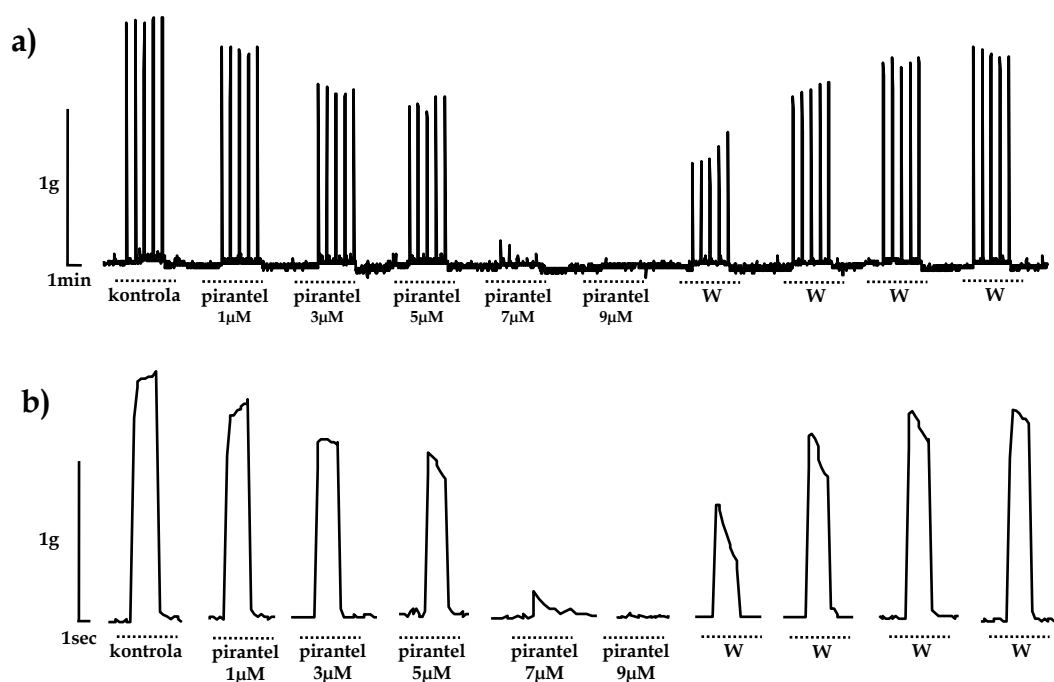
Treći agonista nikotinskog receptora nematoda čiji je efekat na kontrakcije izolovane dijafragme pacova testiran je pirantel. Posle primene istog protokola kao i u prethodna dva ispitivanja, pirantel aplikovan u rastućim koncentracijama (1, 3, 5, 7 i $9\mu\text{M}$) ispoljio je koncentracijski-zavisnu inhibiciju kontrakcija preparata dijafragme izazvanih EFS sa preračunatom vrednošću IC_{50} od $5.53\mu\text{M}$ (95% intervali poverenja od 5.30 do $5.77\mu\text{M}$) (Slika 78 i 79a).



Slika 78. Sigmoidna kriva odnosa koncentracije i inhibitornog efekta pirantela (1, 3, 5, 7 i $9\mu\text{M}$) na kontrakcije preparata dijafragme izazvane EFS ($n=6$)

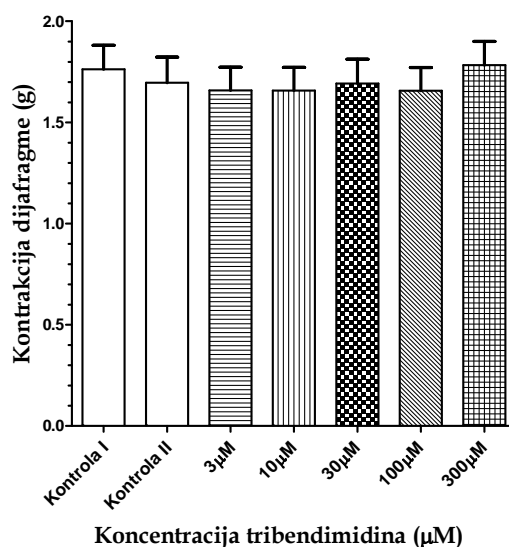
Ovaj efekat pirantela je bio reverzibilan, i posle 3 ispiranja najviše primenjene koncentracije pirantela od $9\mu\text{M}$, kontrakcije su se skoro potpuno vratile na kontrolnu vrednost (Slika 79a). Takođe, pirantel je kao i prethodno testirani lekovi izazvao tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*) i to u koncentracijama preko $5\mu\text{M}$. Interesantno je da se ovaj efekat pirantela nije

ponovo normalizovao posle ispiranja, pa je tetanično slabljenje zabeleženo i posle 3 ispiranja naviše primenjene koncentracije (9 μ M) (Slika 79b).



Slika 79. a) Kontraksije preparata dijafragme pacova izazvane sa EFS i efekat rastućih koncentracija pirantela; **b)** slabljenje tetaničnih kontrakcija (*tetanic fade*) posle primene 3, 5 i 7 μ M pirantela

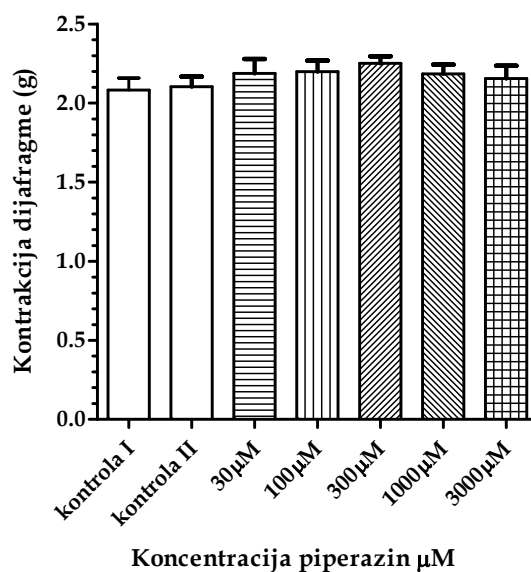
Poslednji predstavnik grupe agonista nikotinskog receptora nematoda čije je dejstvo na kontrakcije dijafragme pacova ispitano je bio tribendimidin (Slika 80).



Slika 80. Dejstvo rastućih koncentracija tribendimidina na kontrakcije izolovanog preparata dijafragme pacova (n=5)

Korišćen je isti protokol kao i u prethodnim ispitivanjima, uključujući i iste parametre stimulacije (EFS) kojima su izazivane kontrakcije dijafragme. Tribendimidin je primenjen u rastućim koncentracijama od 3, 10, 30, 100 i 300 μ M, ali ni jedna od njih nije inhibisala kontrakcije dijafragme. Prosečna vrednost kontrolnih ($x \pm SE$) kontrakcija bila je $1.76 \pm 0.12g$ i $1.70 \pm 0.12g$, dok su prosečne vrednosti kontrakcija u prisustvu gore navedenih rastućih koncentracija tribendimidina iznosile $1.66 \pm 0.11g$, $1.66 \pm 0.11g$, $1.69 \pm 0.12g$, $1.66 \pm 0.11g$ i $1.78 \pm 0.11g$. ANOVA testom nisu utvrđene razlike između ovih prosečnih vrednosti kontrakcija. Analizom pojedinačnih kontrakcija utvrđeno je da tribendimidin ne izaziva ni tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*), koje je zabeleženo u prethodnim ispitivanjima sa levamizolom i pirantelom.

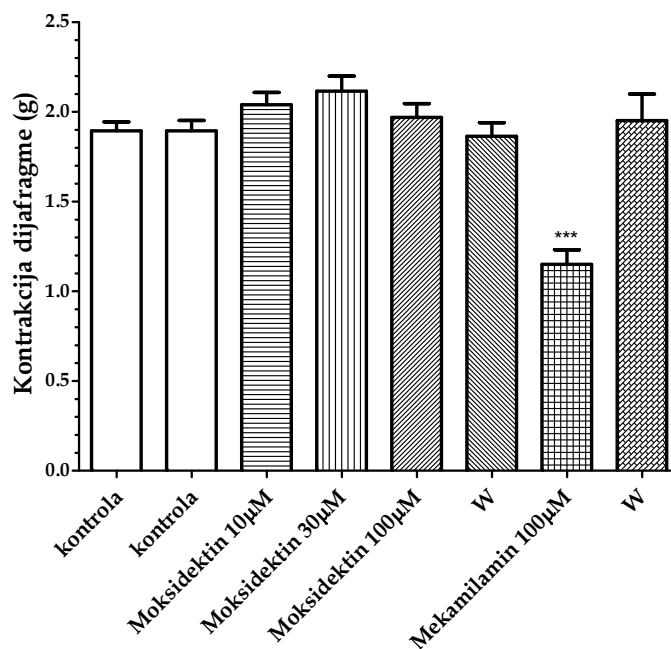
Osim antihelmintika sa dejstvom na nikotinski receptor parazitskih nematoda, ispitan je i potencijalni uticaj lekova GABA agonista na kontrakcije preparata dijafragme pacova. Na početku je testirano dejstvo piperazina, koji je posle dve serije kontrolnih kontrakcija izazvanih sa EFS (isti parametri stimulacije kao i u predhodnim ispitivanjima), aplikovan u kupatilce sa preparatom dijafragme u sledećim koncentracijama: 30, 100, 300, 1000 i 3000 μ M. Ni jedna od primenjenih koncentracija piperazina nije promenila prosečnu vrednost kontrakcija izolovane dijafragme (Slika 81).



Slika 81. Dejstvo rastućih koncentracija piperazina na kontrakcije izolovanog preparata dijafragme pacova (n=5)

Prosečna vrednost kontrolnih kontrakcija bila je $2.08 \pm 0.07g$ i $2.10 \pm 0.06g$, dok su kontrakcije u prisustvu navedenih rastućih koncentracija piperazina iznosile $2.19 \pm 0.09g$, $2.20 \pm 0.07g$, $2.25 \pm 0.04g$, $2.19 \pm 0.05g$ i $2.16 \pm 0.08g$. Analizom pojedinačnih kontrakcija uočeno je da piperazin ne izaziva tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*) ni u jednoj testiranoj koncentraciji.

Pored piperazina, ispitan je i efekat moksidektina, predstavnika grupe milbemicina - makrolidnih antibiotika i GABA agonista. Posle dve serije kontrolnih kontrakcija izazvanih sa EFS, moksidektin je aplikovan u koncentracijama 10, 30 i $100\mu M$, a zatim posle ispiranja i još jedne serije kontrolnih kontrakcija aplikovan je mekamilamin u koncentraciji od $100\mu M$. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na slici 82.



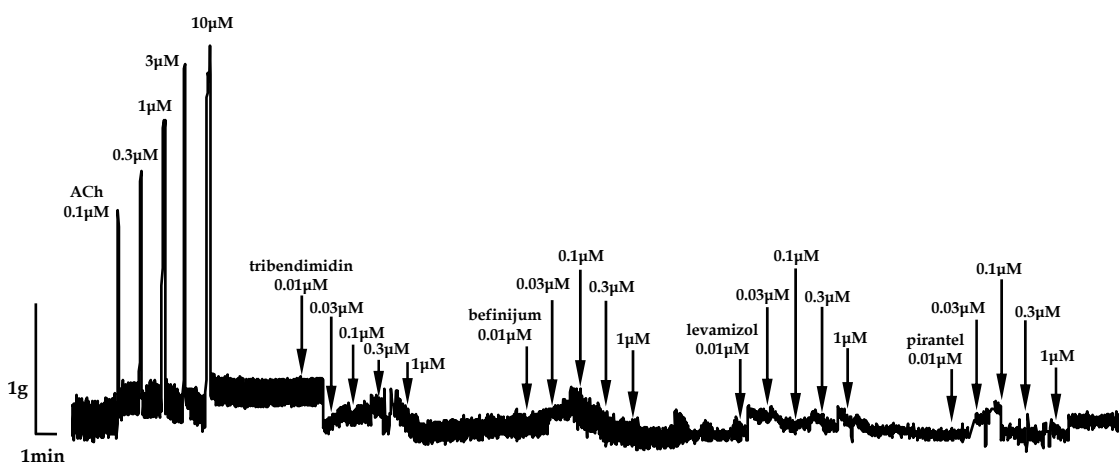
Slika 82. Dejstvo rastućih koncentracija moksidektina i $100\mu M$ mekamilamina na kontrakcije izolovanog preparata dijafragme pacova ($n=5$). *** $P < 0.0001$ Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu i moksidektin

Moksidektin, u primenjenim koncentracijama nije promenio srednju vrednost kontrakcija preparata dijafragme pacova izazvane sa EFS. Kontrolne kontrakcije su imale srednje vrednosti od $1.89 \pm 0.05g$ i $1.89 \pm 0.06g$, dok su u prisustvu moksidektina kontrakcije iznosile $2.04 \pm 0.07g$, $2.12 \pm 0.08g$ i $1.97 \pm 0.08g$. Moksidektin nije izazvao ni tetanično slabljenje kontrakcija, što je utvrđeno

pojedinačnom analizom vrha zapisa svake kontrakcije. Sa druge strane, mekamilamin, antagonista nikotinskog receptora primenjen u koncentraciji od 100 μ M signifikantno je smanjio kontrakcije izolovane dijafragme na 1.15 ± 0.08 g ($P < 0.0001$) (Slika 82).

5.9. Ispitivanja efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovanog ileuma pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS)

U ovom delu ispitivanja preparati izolovanog ileuma su prvo izlagani rastućim koncentracijama (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) acetilholina a zatim su aplikovane rastuće koncentracije ispitivanih antihelmintika, nikotinskih i GABA agonista. Rastuće koncentracije acetilholina aplikovane su radi određivanja odnosa doze i efekta i eventualno kasnije komparacije sa efektom ispitivanih lekova. Takođe, kontrolne kontrakcije ACh služile su za procenu reaktivnosti preparata jer svi preparati ileuma na kojima su nastavljane aplikacije lekova su imali minimalne kontrakcije iznad 0.75g i maksimalne ispod 5.0g. Ispitivanje je izvršeno na 5 preparata ileuma, tako da su posle ACh aplikovani tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel. Svaki od navedenih agonista nikotinskog receptora nematoda aplikovan je u rastućim koncentracijama od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M, sa uzastopnim ispranjima posle aplikacije (Slika 83).

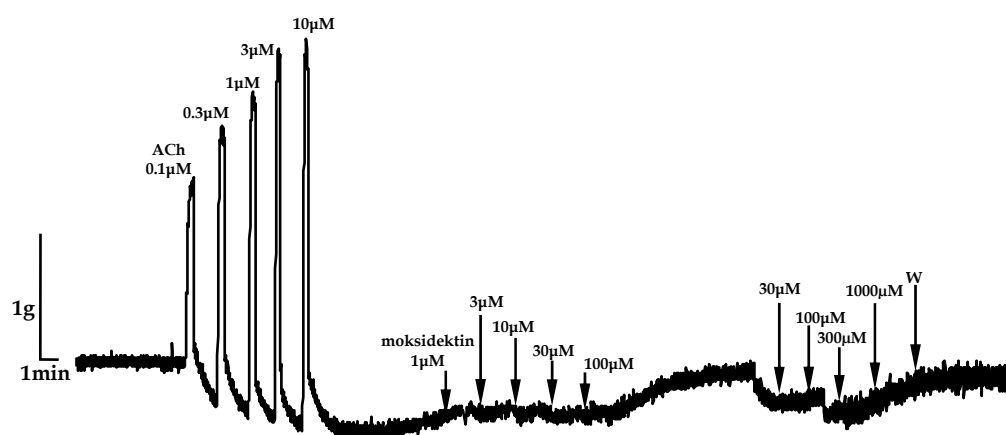


Slika 83. Kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane rastućim koncentracijama ACh kao i izostajanje efekta posle aplikacije rastućih koncentracija tribendimidina, befinijuma, levamizola i pirantela

Acetilholin je u ovim ispitivanjima izazvao koncentracijski zavisne kontrakcije, na osnovu kojih je određena vrednost EC_{50} od 1.02 μ M sa intervalima poverenja 95% od 0.56 do 1.81 μ M (n=5). Međutim, za razliku od

acetilholina, tribendimidin, befinijum, levamozol i pirantel nisu izazvali bilo kakve kontrakcije preparata ileuma (Slika 83).

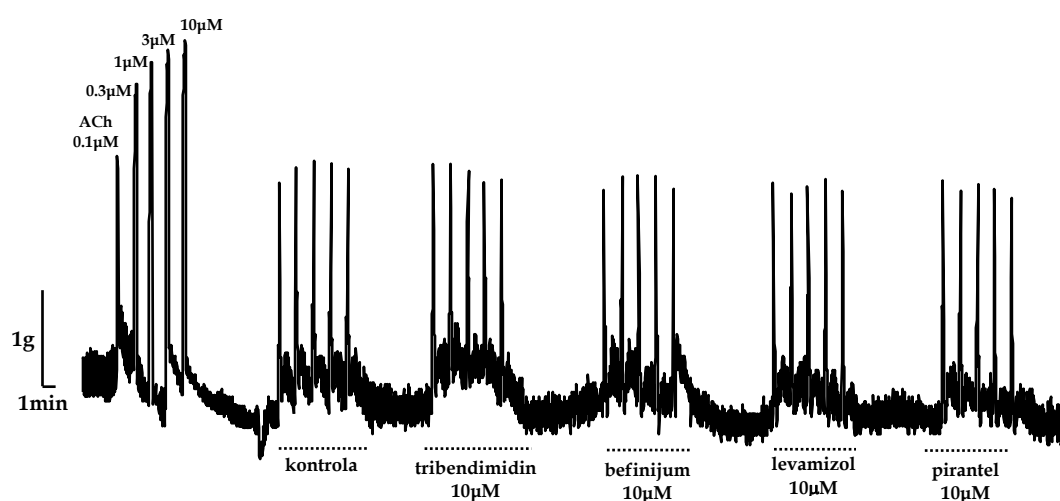
Slični rezultati su dobijeni i u ispitivanju sa GABA agonistima, piperazinom i moksidektinom. Primenjen je isti protokol, po kome su na početku svakog pojedinačnog ispitivanja aplikovane rastuće koncentracije ACh (iste koncentracije kao i prethodno), a zatim rastuće koncentracije GABA agonista, moksidektina 1, 3, 10, 30 i 100 μ M i piperazina 30, 100, 300 i 1000 μ M. Ukupno je testirano 5 preparata izolovanog ileuma, a acetilholin je i ovde ispoljio koncentracijski zavistan kontraktilni efekat sa preračunatom vrednošću EC₅₀ od 1.22 μ M (intervali poverenja 95% od 0.59 do 2.52 μ M, n=5). Kao i u prethodnim ispitivanjima, ni jedna testirana koncentracija moksidektina i piperazina nije izazvala kontrakcije preparata izolovanog ileuma pacova (Slika 84).



Slika 84. Kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane rastućim koncentracijama ACh kao i izostajanje efekta posle aplikacije rastućih koncentracija moksidektina i piperazina

U drugom delu ispitivanja testirano je dejstvo antihelmintika agonista nikotinskog i GABA receptora na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane električnom poljnom stimulacijom. Preparati su stimulisani "paketom" od 5 stimulacija svakih 60 sekundi (širina impulsa 2ms, frekvencija 150Hz, napon 80V, trajanje impulsa 2s). Rastuće koncentracije acetilholina

aplikovane su radi određivanja odnosa doze i efekta pre početka stimulacija. Međutim, ovaj odnos nije preračunavan već je služio kao provera i potvrda reaktivnosti preparata. Svi preparati ileuma koji su ostavljeni u daljem ispitivanju imali su minimalne kontrakcije iznad 0.75g i maksimalne ispod 5.0g. Posle ovih kontrolnih ispitivanja, preparati su stimulirani paketima od po 5 pulseva, sa pauzom između paketa od 5 minuta. Na kraju serije ispitivanja svaki preparat je testiran i atropinom ($1\mu\text{M}$) da bi se potvrdilo da je indirektna stimulacija uzrok kontrakcija.

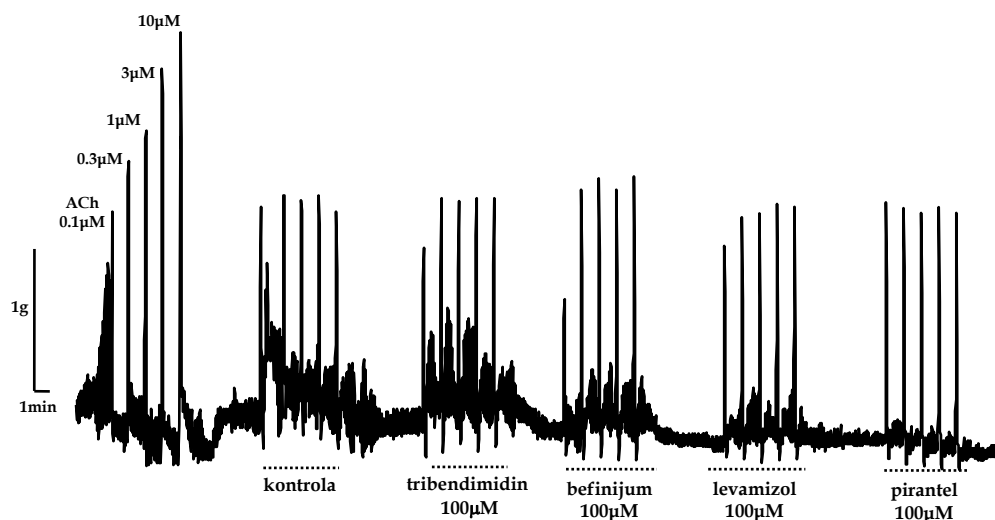


Slika 85. Efekat $10\mu\text{M}$ tribendimidina, befinijuma, levamizola i pirantela na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane EFS

Antiparazitski agonisti nikotinskog receptora nematoda tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel nisu ispoljili bilo kakvo dejstvo na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane sa EFS (Tabela 28, Slike 85 i 86).

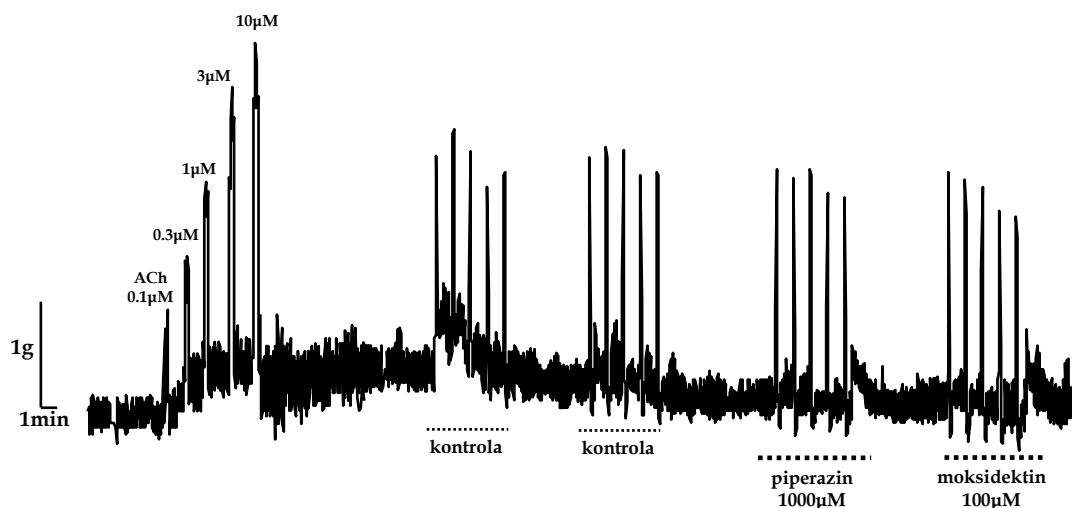
Tabela 28. Prosečna vrednost kontrakcija izolovanog ileuma pacova izazvana EFS (n=5)

(n=5)	Kontrola	Tribendimidin	Befinijum	Levamizol	Pirantel
$10\mu\text{M}$	1.76 ± 0.06	1.73 ± 0.06	1.79 ± 0.07	1.88 ± 0.08	1.85 ± 0.06
$100\mu\text{M}$	2.02 ± 0.05	2.07 ± 0.06	2.18 ± 0.05	2.09 ± 0.02	2.00 ± 0.02



Slika 86. Efekat 100 μ M tribendimidina, befinijuma, levamizola i pirantela na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane EFS

Pored ispitivanja efekata lekova nikotinskih agonista parazitskih nematoda na kontrakcije ileuma izazvane EFS, ispitano je i dejstvo piperazina i moksidektina na 5 preparata izolovanog ileuma ($n=5$). Posle dve serije kontrolnih kontrakcija primenjeni su piperazin u koncentraciji od 1000 μ M i moksidektin u koncentraciji od 100 μ M (Slika 87).

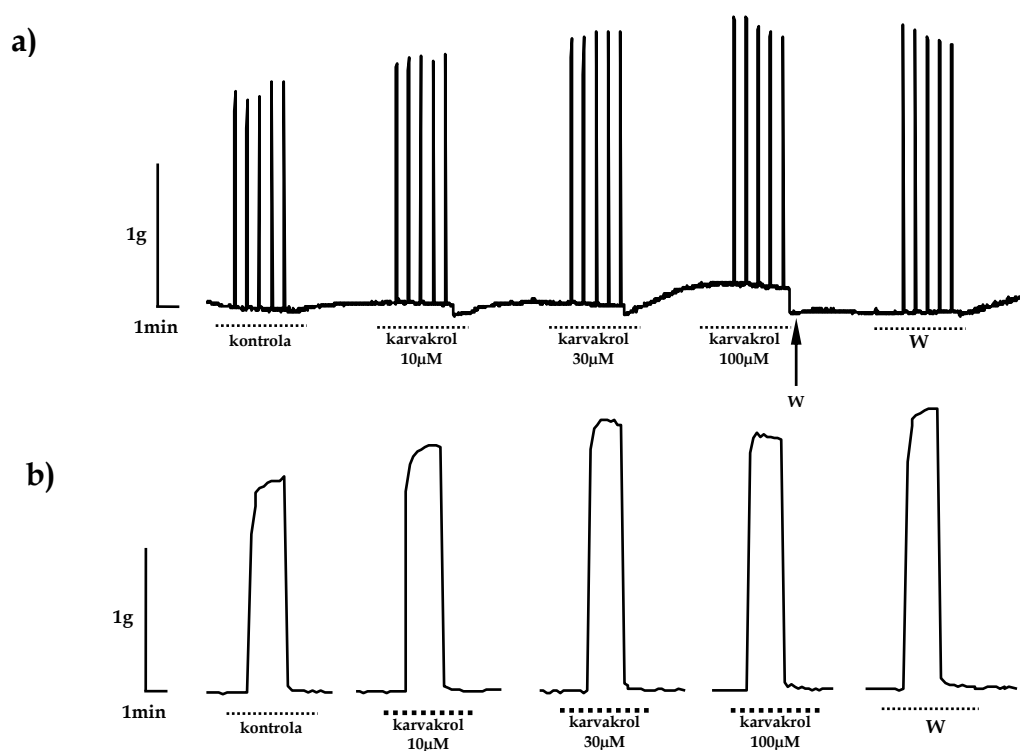


Slika 87. Efekat piperazina (1000 μ M) i moksidektina (100 μ M) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane EFS

Piperazin i moksidektin, nisu promenili prosečnu vrednost kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS. Kontrolne kontrakcije su iznosile prosečno 1.63 ± 0.04 g i 1.56 ± 0.04 g, dok su kontrakcije ileuma izazavane sa EFS u prisustvu piperazina, odnosno moksidektina bile 1.63 ± 0.02 g i 1.68 ± 0.03 g (n=5).

5.10. Ispitivanje efekata karvakrola na kontrakcije izolovane dijafragme i ileuma pacova primenom metode poljne stimulacije (EFS)

U ovom ispitivanju testiran je efekat karvakrola na kontrakcije dijafragme izazvane sa EFS (parametri stimulacije: širina impulsa $10\mu\text{s}$, frekvencija 50Hz , napon 20V , trajanje impulsa 2s). Stimulacija se odvijala u paketima od po 5 stimulansa sa pauzom od 3 minuta između paketa. Posle kontrolnih kontrakcija aplikovan je karvakrol u koncentracijama od 10 , 30 i $100\mu\text{M}$, a meren je efekat kontrolnih i kontrakcija u prisustvu karvakrola (Slika 88).

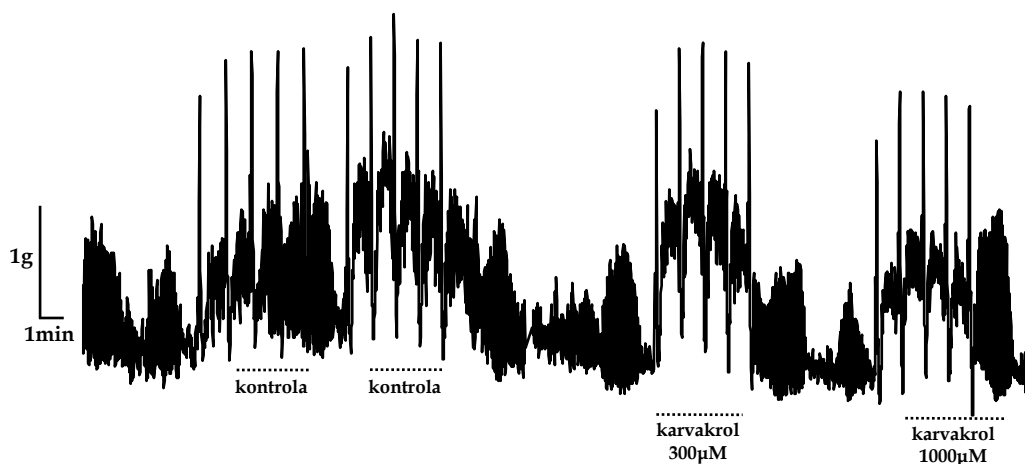


Slika 88. a) Kontrakcije preparata dijafragme pacova izazvane sa EFS i efekat rastućih koncentracija karvakrola; **b)** slabljenje (*tetanic fade*) tetaničnih kontrakcija posle primene 10 , 30 i $100\mu\text{M}$ karvakrola

Karvakrol nije ispoljio inhibitorni efekat na kontrakcije dijafragme izazvane sa EFS (Slika 88a). Prosečna vrednost kontrolnih kontrakcija dijafragme bila je $2.35\pm 0.09\text{g}$, dok je srednja vrednost kontrakcija u prisustvu 10 , 30 i $100\mu\text{M}$ karvakrola iznosila $2.38\pm 0.13\text{g}$, $2.41\pm 0.1\text{g}$ i $2.55\pm 0.07\text{g}$ ($n=5$).

Međutim, primećena su dva njegova specifična efekta. Prvi, da posle ispiranja i uklanjanja karvakrola iz kupatilca dolazi do povećanja osnovnog tonusa preparata dijafragme (slika 88a), i drugi da 100 μ M karvakrola izaziva tetanično slabljenje (*tetanic fade*) bez smanjenja amplitude kontrakcija (slika 88b).

Pored ispitivanja dejstva karvakrola na kontrakcije dijafragme, ispitan je njegov potencijalni efekat i na EFS-izazvane kontrakcije ileuma (Slika 89).



Slika 89. Dejstvo karvakrola 300 i 1000 μ M na kontrakcije izolovanog ileuma izazvane EFS

Ukupno je tretirano 4 preparata ileuma, a jasno uočljivo karvakrol u primenjenim koncentracijama od 300 i 1000 μ M nije izazvao promene kontrakcija. Prosečne kontrolne vrednosti su iznosile 2.08 \pm 0.07g i 2.14 \pm 0.07g. Posle inkubacije sa 300 i 1000 μ M karvakrola, srednja vrednost kontrakcija je bila 2.15 \pm 0.06 i 1.94 \pm 0.11g (n=4).

6. Diskusija

Komparativno ispitivanje efekata dve grupe antihelmintika, agonista nikotinskog-acetilholinskog receptora nematoda na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

GABA-ergički i holinergički delovi neuro-mišićnog sistema parazitskih nematoda regulišu njihovo kretanje, ishranu, razmnožavanje i turgor mišićnih ćelija, koji deluje kao neka vrsta endoskeleta. S obzirom da su odgovorni za vitalne funkcije parazita, razumljivo da predstavljaju i najvažnija ciljna mesta za delovanja savremenih antinematodnih lekova (Marr i sar., 2003).

Glavni neurotransmiter u holinergičkom delu neuro-mišićnog sistema nematoda je ACh. Smatra se da su nematode najniže evolutivno kolo životinjskog carstva koje kao neurotransmiter koristi ACh (Colquhoun i sar., 1991). Glavne strukturne karakteristike acetilholinskog-nikotinskog receptora (nAChR) se tokom evolucije nisu puno izmenile, tako da sličnosti postoje i među filogenetski jako udaljenim vrstama, kao što su nematode i sisari. Nikotinski ACh receptor se kod nematoda nalazi na njihovim somatskim mišićnim ćelijama i odgovaran je za koordinaciju kretanja. Na samom početku naših ispitivanja određena je srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) ACh za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Testirane su rastuće koncentracije ACh od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M, a meren je maksimalno dobijeni kontraktilni efekat. Koncentracija ACh od 1 μ M je najniža testirana koncentracija koja izaziva bilo kakvu kontrakciju preparata *A. suum*, dok ostale koncentracije predstavljaju sledljivi logaritamski niz. Na osnovu rezultata nelinearne regresije odnosa doza (koncentracija) i efekta (kontrakcija), dobijena je vrednost srenje efektivne koncentracije (EC_{50}) od 6.22 μ M. Ovaj naš rezultat je u saglasnosti sa podacima Puttacharya i saradnika (2013), koji navode da srednja efektivna koncentracija ACh iznosi 7 μ M, posle istih rastućih koncentracija koje smo i mi

primenili. ACh je endogeni neurotransmiter koji se posle oslobađanja vezuje na postsinaptičkoj membrani za nAChR, što za posledicu ima otvaranje neselektivnog katjenskog kanala, ulazak jona natrijuma a time i nastanak brze depolarizacije membrane mišićne ćelije nematode, koja rezultira mišićnom kontrakcijom. ACh je osetljiv na dejstvo enzima acetilholin-esteraze (AChE) koja ga razlaže. Iako nije precizno određeno, smatra se da koncentracija ACh koja se oslobađa u sinaptičkoj pukotini, fiziološki dostiže milimolarne vrednosti (Jin, 2010). Za razliku od vertebrata, kod kojih je dobro poznata stohiometrija mišićnog tipa nAChR, kod velike parazitske nematode svinja *A. suum*, koja je bila eksperimentalni model i u našim istraživanjima, za sada su dokazana tri tipa 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) (Qian i sar., 2006). Dokazano je da befinijum pre svega otvara B-tip nikotinskog kanala, da veoma slabo deluje na i L-tip, dok apsolutno ne deluje na N-tip receptora (Robertson i sar., 2007a; Robertson i sar., 2007b). Befinijum je agonista B-tipa nikotinskog receptora *A. suum*. U našim komparativnim ispitivanjima efekata ACh i befinijuma na istom preparatu *A. suum*, koristili smo iste koncentracije ACh kao i u prvom istraživanju, a zatim posle 5 minuta pauze primenili i 10 puta niže koncentracije befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10 μ M). Za početnu koncentraciju befinijuma i ovde je izabrana koncentracija koja izaziva prvu merljivu kontrakciju preparata *A. suum*. U ovom našem ispitivanju, srednja efektivna koncentracija ACh za kontrakcije neuro-mišićnog preparata *A. suum* iznosila je 6,12 μ M, dok je srednja efektivna koncentracija befinijuma dobijena na istim preparatima askarisa bila 16.5 puta niža i iznosila je 0.37 μ M. Befinijum je u ovim našim istraživanjima ispoljio ne samo veću efikasnost (daleko niža EC₅₀), nego je i maksimalni efekat kontrakcija bio za 0.63g od kontrolnog koji je ispoljio ACh (E_{max}ACh=2.07g; E_{max}befinijuma=2.74g). Kako smo već napomenuli, befinijum izaziva mišićne kontrakcije vezujući se za specifični B-tip nikotinskog receptora nematode, koji na žalost i danas pored intenzivnih elektrofizioloških ispitivanja nije potpuno

determinisan u odnosu na njegovu molekularnu građu (Charvet i sar., 2012). Na osnovu naših rezultata, befinijum je, iako primenjen u 10 puta nižim koncentracijama, ispoljio signifikantno ($p=0,0044$; $p=0,0029$; $p=0,0130$; $p=0,0236$ i $p=0,0315$) viši kontraktilni efekat ($1.07\pm 0.08g$, $1.72\pm 0.15g$, $2.07\pm 0.14g$, $2.49\pm 0.22g$, $2.81\pm 0.20g$) u odnosu na ACh ($0.49\pm 0.06g$, $0.91\pm 0.08g$, $1.42\pm 0.12g$, $1.79\pm 0.10g$, $2.08\pm 0.12g$).

Za razliku od befinijuma, pirantel je dokazani agonista L-tipa nAChR nematoda (Martin i sar., 2004). Na osnovu rezultata dobijenih u preliminarnim ispitivanjima, pirantel je primenjen u koncentracijama 1000 puta nižim od ACh i 100 puta nižim od befinijuma. Preračunata kontrolna vrednost srednje efektivne koncentracije ACh iznosila je $6.45\mu M$, dok je komparabilna vrednost EC_{50} pirantela dobijena na istim preparatima askarisa iznosila $0.01\mu M$. Čak i u ovim nanomolarnim koncentracijama, maksimalne kontrakcije pod dejstvom pirantela su iznosile 2.5g. Kontrakcije koje je pirantel izazvao u odnosu na kontrolu dobijenu ACh bile su 15 do 25% više od komparabilnih vrednosti kontrakcija dobijenih primenom ACh. Međutim, statistička značajnost dostignuta je samo posle primene $0.1\mu M$ pirantela, koja je proizvela kontrakciju od 2.33g, u odnosu na kontrakciju izazvanu sa $100\mu M$ ACh koja je iznosila 1.75g ($p=0.0379$). Na osnovu dobijenih rezultata možemo konstatovati da je najviši efekat primenjenih agonista nikotinskog receptora u odnosu na koncentracije, zabeležen posle primene pirantela, manji posle primene befinijuma i najmanji posle primene ACh.

ACh je endogeni neurotransmiter u neuro-mišićnom sistemu parazitskih nematoda. S obzirom da se radi o neurotransmiteru koji obezbeđuje mišićne kontrakcije, predpostavlja se da podjednako deluje na sva 3 tipa nikotinskih receptora parazitskih nematoda (N, L, B), pri čemu pojedinačna uloga svakog podtipa nije jasno definisana. Ovo može biti jedno od objašnjenja slabijeg kontraktilnog efekta ACh u odnosu na primenjene specifične agoniste B i L tipa nAChR. Sa druge strane, mada se malo zna o karakteristikama ACh-esteraze parazitskih nematoda, njena uloga je sigurno slična onoj kod sisara, da ograniči

koncentraciju ACh u sinaptičkoj pukotini i njegovo prisustvo na postsinaptičkoj membrani. Ova saznanja proističu iz ispitivanja funkcije nAChR vertebrata, ali se ona najverovatnije ne razlikuju značajnije između vrsta (Bowman, 2006; Rang i sar., 2005). Drugo objašnjenje za intenzivniji efekat pirantela i befinijuma može biti vezano za veću osetljivost i veći značaj, pre svega L ali i B-tipa nAChR nematoda za brze i snažne kontrakcije somatskih mišićnih ćelija askarisa. U prilog ovakvoj pretpostavci govori činjenica da pirantel, agonista L-tipa nAChR nematoda, izaziva kontrakcije u koncentracijama koje su 1000 puta niže od ACh i 100 puta niže od befinijuma.

Ispitivanje efekata nikotina

U narednom delu naših istraživanja ispitivali smo kontraktilne efekte nikotina (agoniste N-tipa nAChR nematoda), levamizola (agoniste L-tipa nAChR nematoda) i tribendimidina – antiparazitskog leka novije generacije o čijem se antiparazitskom dejstvu u literaturi tek pojavljuju prvi podaci. Ova grupa agonista nAChR nematoda je izdvojena u posebno istraživanje jer je njihov kontraktilni efekat na neuro-mišićnom preparatu askarisa posmatran posle aplikacije kumulativnih koncentracija. To znači da je svaka nova koncentracija aplikovana posle postizanja maksimalnog efekta prethodne koncentracije, bez ispiranja. Metoda je opisana i prihvaćena za ispitivanje odnosa doze i efekta za navedene lekove (Robertson i sar., 2002). Razlog ovakvog ponašanja primenjenih agonista, odnosno razlog primene opisanog protokola nalazi se u činjenici da se nikotin, levamizol i tribendimidin jako teško ispiraju iz tkiva askarisa, što je verovatno posledica velike količine kolagena koji prekriva mišićne ćelije ove parazitske nematode (ovo nije slučaj kada se aplikuju na preparate sisara). To znači da se posle aplikacije nekih od ovih supstanci i posledične kontrakcije, preparat ne može spontano vratiti na osnovni tonus duže vreme (preko 1/2 sata). Da bi se ispitivanja uvek obavila na preparatima ujednačene aktivnosti, pre početka aplikacije ispitivane supstance,

uvek je aplikovano 3 μ M ACh. Za dalja ispitivanja su korišćeni samo oni preparati koji su na 3 μ M ACh odgovorili kontrakcijom višom od 0.5g i nižom od 1g. Na početku ispitivanja testirali smo različite koncentracije nikotina: 1, 3, 10, 30 i 100 μ M i na osnovu vrednosti dobijenih kontrakcija preračunali EC₅₀ od 4.99 μ M, dok je E_{max} iznosio 1.07g. Nikotin se više ne koristi u terapijske svrhe kao antiparazitik, ali je interesantno da isti tip nAChR nematoda specifično vezuje oksantel, antiparazitik iz grupe tetrahidropirimidina. Ovo je potvrđeno činjenicom da se antiparazitski spektar pirantela i oksantela razlikuje (Martin i sar., 2004).

Ispitivanje efekata levamizola

U sledećoj seriji ispitivanja testiran je odnos koncentracija i efekata levamizola, jednog od najčešće primenjivanih antiparazitika u humanoj i veterinarskoj medicini. Za levamizol je poznato da je isključivi agonista L-tipa nAChR nematoda (Martin i sar., 2004; Robertson i sar., 2007a). Testirali smo koncentracije levamizola između 100nM i 10 μ M, a prepračunata vrednost srednje efektivne koncentracije (EC₅₀) iznosila je 0.32 μ M, dok je maksimalni efekat bio E_{max}=0.68g. Ovakav rezultat se delimično razlikuje od rezultata Robertson i saradnici (2010) koji su publikovali EC₅₀ levamizola od 0.84 μ M, dok je maksimalni efekat u njihovim ispitivanjima bio 2.5g. Obe vrednosti su za oko 3 puta više nego naši rezultati, što može da ukaže na nešto slabiju osetljivost askarisa koga su Robertson i saradnici (2010) koristili, ali slabiji maksimalni efekat u našim ispitivanjima možda je posledica brze desenzitizacije nACh, koja se u ovakvom protokolu sa kumulativnim koncentracijama levamizola često dešava. Desenzitizacija je proces u kome proteinske kinaze posle vezivanja agoniste za receptor, vrše fosforilaciju intracelularnog dela receptora i moduliraju njegovu funkciju. Dokazano je da intracelularna petlja nAChR nematoda na aminokiselinama serin, treonin i tirozin poseduje mesta za fosforilizaciju i da proteinske kinaze mogu redukovati dejstvo acetilholina i

levamizola (Trailović i sar., 2002). Sa druge strane s obzirom na dobijene vrednosti srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) u našim istraživanjima, levamizol je ispoljio slične kontraktilne efekte kao i nikotin, ali sa 10 puta nižom vrednošću EC_{50} .

Ispitivanje efekata tribendimidina

Posle nikotina i levamizola, sledilo je ispitivanje efikasnosti tribendimidina. Tribendimidin je antihelmintik širokog spektra delovanja, registrovan u Kini kao antiparazitik za ljude (Hu i sar., 2009). Radi se o novom leku, koji može imati potencijalni značaj i za veterinarsku medicinu, s obzirom na publikovane rezultate o njegovoj efikasnosti. Posebno interesantno za tribendimidin je da pored nematoda efikasno deluje i na trematode i cestode, što bi tek trebalo da se dokaže adekvatnim predkliničkim i kliničkim kontrolisanim studijama. Na osnovu preliminarnih rezultata, testirali smo koncentracije tribendimidina od: 0.03; 0.1; 0.3; 1 i $3\mu\text{M}$. Na osnovu dobijenih kontrakcija preračunata je srednja koncentracija od $0.064\mu\text{M}$ i maksimalni efekat od 1.29g. S obzirom da je tribendimidin relativno novi antihelmintik, u literaturi je opisano samo jedno istraživanje čiji rezultati ukazuju da ovaj lek ima isti mehanizam dejstva kao i levamizol, odnosno da je agonista L-tipa nAChR nematoda (Hu i sar., 2009). Agoniste nikotinskog receptora primenjivali smo u različitim koncentracijama. Međutim, početna koncentracija za sve agoniste je bila najniža koja je kao i u preliminarnim ispitivanjima izazivala minimalnu kontrakciju. Ostale primenjene koncentracije predstavljale su samo sledljivi logaritamski niz kojim se dobija najbolja distribucija efekata za preračunavanje dozne zavisnosti. Ovo nam je omogućilo da uporedimo srednje vrednosti kontrakcija izazvanih primenjenim agonistima statističkom metodom analiza varijanse. Na osnovu naših rezultata možemo konstatovati da je tribendimidin primenjen u koncentracijama 3 puta nižim od levamizola i 30 puta nižim od nikotina, ispoljio intenzivniji kontraktilni efekat na neuro-

mišnom preparatu askarisa. Ovaj efekat je bio signifikantno viši od efekta levamizola, dok u odnosu na kontraktilne efekte nikotina razlika nije dostigla stepen statističke značajnosti. Kako smo već napomenuli, u literaturi nema podataka o specifičnostima dejstva tribendimidina na nAChR nematoda. Da bi detaljnije analizirali ovaj mehanizam dejstva, ispitali smo inhibitorni efekat mekamilamina, heksametonijuma, pankuronijuma i tubokurarina na kontrakcije izazvane tribendimidinom. Dobijene rezultate smo uporedili sa efektima istih antagonista na kontrakcije izazvane nikotinom. Mekamilamin primenjen u koncentraciji od $30\mu\text{M}$ i pankuronijum primenjen u istoj koncentraciji od $30\mu\text{M}$, kompletno su inhibirali kontrakcije izazvane različitim koncentracijama tribendimidina. Mekamilamin je antagonist različitih tipova nikotinskog receptora sisara, koje blokira kompetitivnim ili nekompetitivnim mehanizmom (Papke i sar., 2001; Ascher i sar., 1979; Gurney i Rang, 1984; Nooney i sar., 1992). Međutim, prevladavaju mišljenja da je mekamilamin primarno nekompetitivni antagonist neuronskog tipa nikotinskog receptora koga blokira u mikromolarnim koncentracijama. U našem ispitivanju mekamilamin primenjen u koncentraciji od $30\mu\text{M}$, kompletno je inhibirao kontrakcije neuro-mišićnog preparata askarisa izazvane ACh. 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*) (Trailović i sar., 2011).

Pankuronijum je klasični nedepolarizujući neuro-mišićni blokator, koji kompetitivnim mehanizmom blokira vezivanje ACh za postsinaptički nikotinski receptor. U našim ispitivanjima na askarisu, pankuronijum je ispoljio 100%-tni inhibitorni efekat. Koncentracija pankuronijuma koja je imala ovakav učinak na neuro-mišićnom preparatu askarisa iznosila je $30\mu\text{M}$. Nasuprot tome, koncentracija pankuronijuma dovoljna da ispolji maksimalni inhibitorni efekat na kontrakcije dijafragme pacova iznosi svega $2\mu\text{M}$ (Trailović i sar., 2011).

Treći antagonist nikotinskog receptora čiji smo uticaj ispitivali na kontrakcije izazvane tribendimidinom bio je heksametonijum. Heksametonijum je primenjivan u koncentraciji od 300 μ M. Srednja efektivna koncentracija tribendimidina za kontrakcije neuro-mišićnog preparata askarisa iznosila je 0.15 μ M, dok je maksimalni efekat bio 1.16g. Heksametonijum je depolarizujući antagonist nikotinskog receptora u autonomnim ganglijama i očigledno, čak i u visokim koncentracijama ne ispoljava veliki afinitet za nAChR nematoda. On je u našem ispitivanju dvostruko povećao vrednost EC₅₀ tribendimidina (0.064 μ M kontrola) ali nije smanjio maksimalni efekat, koji je ostao gotovo nepromenjen (1.29g kontrola).

Na kraju ovog dela ispitivanja testirano je dejstvo tubokurarina, antagoniste mišićnog tipa nikotinskog receptora sisara. Tubokurarin je uslovio inhibiciju kontrakcija izazvanih tribendimidinom, što je rezultiralo vrednošću srednje efektivne koncentracije tribendimidina od 0.80 μ M, sa maksimalnim efektom od 0.76g. Međutim posebno je interesantno da je primenjena koncentracija tubokurarina od 30 μ M ispoljila samo delimično inhibitorno dejstvo na kontrakcije askarisa (12 puta povećanje EC₅₀ i dvostruko smanjenje E_{max}), dok su koncentracije od 1-2 μ M sposobne da izazovi 100%-tnu blokadu kontrakcija dijafragme sisara (Nguyen-Huu i sar., 2009; Seeger i sar., 2007).

Da bi ispitali signifikantnost dobijenih rezultata, uporedili smo srednje vrednosti kontrakcija koje izaziva tribendimidin u prisustvu heksametonijuma i tubokurarina. Kontrakcija nije bilo posle primene mekamilamina i pankuronijuma, dok je tubokurarin bio potentniji od heksametonijuma i signifikatno ($p < 0.01$ i $p < 0,001$) smanjio kontrakcije koje izaziva tribendimidin u svim primenjenim koncentracijama. Heksametonijum je ispoljio slabiju aktivnost od tubokurarina i smanjenje kontrakcija izazvanih tribendimidinom dostiglo je stepen statističke značajnosti ($p < 0.05$ i $p < 0.01$) samo u dve najniže primenjene koncentracije.

Da bi detaljnije analizirali mehanizam dejstva tribendimidina, ispitali smo efekte mekamilamina, pankuronijuma, heksametonijuma i tubokurarina na

kontrakcije askarisa izazvane nikotinom. Kao i u slučaju tribendimidina, mekamilamin u koncentraciji od $30\mu\text{M}$ i pankuronijum u koncentraciji od $30\mu\text{M}$ potpuno su blokirali kontrakcije koje izaziva nikotin. Heksametonijum u koncentraciji od $300\mu\text{M}$ povećao je vrednost srednje EC_{50} nikotina sa kontrolne vrednosti od $4.99\mu\text{M}$ na $12.96\mu\text{M}$, bez promene maksimalnog efekta ($E_{\text{max}}\text{kontrola}=1.07\text{g}$; $E_{\text{max}}\text{heksametonijum}=1.3\text{g}$). Tubokurarin je u koncentraciji od $30\mu\text{M}$ povećao vrednost srednje efektivne koncentracije nikotina na $61.44\mu\text{M}$, a maksimalni efekat smanjio na 0.47g . Dobijeni rezultat je gotovo identičan rezultatu dobijenom sa tribendimidinom. I ovde je tubokurarin povećao vrednost EC_{50} nikotina za 12 puta i dvostruko smanjio E_{max} . Ovakve promene srednje efektivne koncentracije nikotina potvrđene su ispitivanjem signifikantnosti razlika prosečnih kontrakcija. Tako, tubokurarin visoko signifikantno ($p<0,01$ i $p<0,001$) inhibira kontrakcije svih testiranih koncentracija nikotina, za razliku od heksametonijuma koji je statistički značajno ($p<0,05$ i $p<0,01$) inhibirao samo kontrakcije koje su proizvele tri niže koncentracije nikotina. Inhibicija koju je tubokurarin ispoljio na kontrakcije sa tri više koncentracije nikotina, bila je signifikantno viša u poređenju sa inhibicijom koju je ostvario heksametonijum.

Očigledno je da tribendimidin deluje na isti receptor kao i nikotin, receptor koji ispoljava neke osobine mišićnog tipa nACh receptora sisara, ali istovremeno i neke osobine neuronskog tipa nACh receptora sisara.

Komparativno ispitvanje efekata GABA-e i anthelmintika GABA agonista na neuro-mišićnom prepartau *Ascaris suum*

Kako smo već ranije napominjali, GABA je kao neurotransmiter evolutivno daleko starija od ACh (Colquhoun i sar., 1991; Bouche i Fromm, 2004.). GABA je neproteinska aminokiselina, evolutivno prisutna još od nekih vrsta bakterija i biljaka kod kojih ima pre svega metaboličku ulogu. Međutim, ipak je kod pojedinih vrsta bakterija identifikovano postojanje specifičnih receptora koji učestvuju u određenim signalizacionim procesima posredstvom

GABA-e (Spurny i sar, 2012). Kod hidrozoo sa najjednostavnijim nervnim sistemom dokazano je da GABA učestvuje u prometu impulsa neophodnih za funkcionisanje njihovih vitalnih procesa. Kod nekih pljosnatih crva (*plathelminthes*), evolutivno se prvi put pojavljuje primitivni CNS. Do danas su dobro dokumentovani podaci da je GABA glavni inhibitorni neurotransmiter u neuro-mišićnom sistemu nematoda (Gou i sar., 2012).

Kod nematoda i sisara GABA otvara hloridne kanale na postsinaptičkoj membrani, omogućava 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). U ispitivanju efekata GABA-e i predstavnika tri grupe GABA agonista na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*, koristili smo nešto izmenjeni protokol. S obzirom da smo u ovom delu ispitivali relaksaciju koju izazivaju ovi lekovi, segmente askarisa smo izlagali većem opterećenju, do oko 4g, sve do dobijanja stabilnog bazalnog tonusa od oko 2 do 2.5g. Naša istraživanja relaksantnog dejstva GABA-e pokazala su da ona aplikovana u koncentracijama od 1, 3, 10, 30 i 100 μ M izaziva jasnu dozno-zavisnu relaksaciju preparata *A. suum*, sa preračunatom vrednošću EC_{50} od 7.40 μ M. Ovakav naš nalaz je u saglasnosti sa prethodno citiranim literaturnim podacima, ali na žalost jasnih podataka o ovako opisanom relaksantnom dejstvu GABA-e u literaturi nema. Najpoznatija vrsta antiparazitskih lekova GABA agonista su avermektini i milbemicini. Međutim, u našim istraživanjima rastuće koncentracije ivermektina i milbemicina nisu izazvale bilo kakvu relaksaciju neuro-mišićnog preparata askarisa. Za razliku od ivermektina i milbemicina, piperazin je izazvao jasnu relaksaciju *A. suum*. Srednja efektivna koncentracija piperazina (EC_{50}) iznosila je 0.331mM, što je u saglasnosti sa relativno visokim dozama piperazina koje su potrebne za ostvarivanje antiparazitskog efekta. Osim što je izazvao relaksaciju tretiranog preparata, piperazin je dozno-zavisno smanjio i osnovni tonus. Vrednost EC_{50} za relaksaciju (smanjenje osnovnog tonusa) iznosila je 0.74mM. Piperazin spada u stare antihelmintike ali ovakvi naši rezultati ukazuju na

različiti antiparazitski efekat u odnosu na avermektine i milbemicine (Trailović, 2001; Canga i sar., 2009; IPCS INCHEM, Moxidectin, WHO Food Additives Series 36). Postoji dosta kontraverznih podataka o karakteristikama GABA receptora kod nematoda. Kod sisara su dokazana 3 tipa GABA receptora: GABA_A, GABA_B i GABA_C. Receptori GABA_A i GABA_C su hloridni jonski kanali, dok je GABA_B metabotropni (G-protein kuplovani receptor). Za razliku od vertebrata, gde je GABA primarno prisutna u sinapsama CNS-a, kod invertebrata ona je neurotransmiter na neuro-mišićnoj sinapsi. Kod nematoda ona dovodi do relaksacije somatske muskulature otvaranjem hloridnih jonskih kanala. GABA receptori invertebrata ne odgovaraju klasifikaciji sisarskih GABA receptora ali je većinsko mišljenje da su slični GABA_A receptoru sisara (Holden-Dye i sar., 1989; Trailović i sar., 2011). U komparativnom ispitivanju GABA i piperazina jasno je potvrđeno njihovo relaksantno dejstvo na askarisu. Međutim, za nas je bilo značajno da ispitamo da li se ova relaksacija odvija posredstvom GABA_A receptora, odnosno da li je GABA receptor zadužen za relaksaciju neuro-mišićnog preparata askarisa, sličnih farmakoloških karakteristika kao i GABA_A receptor sisara. Da bi ovu pojavu ispitali, testirali smo efekat bikukulina u koncentraciji od 10μM na relaksaciju koju izazivaju GABA i piperazin. Srednja vrednost relaksacije koju je izazvala GABA (1μM) iznosila je 0.25±0.3g, dok je relaksacija u prisustvu bikukulina (10μM) iznosila 0.23±0.03g. Slični rezultati dobijeni su i u ispitivanju uticaja bikukulina na relaksacije koje izaziva piperazin u koncentraciji od 100μM: bez bikukulina (0.23±0.1g) i u prisustvu 10μM bikukulina (0.21±0.8g). Naši rezultati su potvrdili navode Jorgensena (2005), da je GABA receptor invertebrata neosetljiv na delovanje bikukulina i da podela koja je ustanovljena kod sisarskih GABA receptora nije primenljiva na GABA-ergičkom sistemu nematoda.

Ispitivanje interakcije GABA sa GABA agonistima

S obzirom na neočekivane rezultate da ivermektin i milbemicin nisu izazvali relaksaciju neuro-mišićnog preparata askarisa, ispitali smo potencijalnu interakciju ovih lekova sa GABA-om, i kao hipotezu postavili uslov da ovi lekovi zahtevaju prisustvo GABA-e za ispoljavanje efekta. Kada smo ivermektin u koncentraciji od 30 μ M aplikovali posle rastućih doza GABA-e (1, 3, 10, 30, 100 μ M), on je izazvao relaksaciju bazalnog tonusa ali ne i potenciranje dozno-zavisne relaksacije koju GABA prouzrokuje. Objašnjenje ovakvog fenomena može biti u postojanju dva različita sistema receptor-hloridna kanal, pri čemu je jedan odgovoran za brzu relaksaciju - koju je ispoljila GABA, a drugi za regulisanje bazalnog tonusa neuro-mišićnih ćelija nematoda. Drugo objašnjenje može ležati u činjenici da ivermektin deluje samo na otvoreni hloridni kanal (prehodno ga otvorila GABA) i da ga na tom nivou otvorenosti „zaključa“, pa zbog toga nema dodatne relaksacije (dodatne depolarizacije). Ovakvim rezultatima idu u prilog i naredni nalazi, koje smo zabeležili na pojedinim neuro-mišćnim preparatima askarisa sa izuzetno velikom spontanom aktivnošću (0.3 do 0.5g). Razlog zbog čega su pojedini preparati askarisa ispoljili ovakvu pojačanu spontanu aktivnost nismo uspeli da definišemo, ali je kod svakog od takvih preparata ivermektin izazvao relaksaciju od prosečno 0.44 \pm 0.04g, koja je bila reverzibilna posle ispiranja ivermektina ali sa izvesnim smanjenjem aplitude kontrakcije. Naši rezultati nesumnjivo ukazuju da ivermektin za ispoljavanje relaksantnog dejstva zahteva pojačano prisustvo GABA-e i da sam po sebi nije dovoljan da izazove bilo kakav efekat na neuro-mišićnom sistemu askarisa. Možemo predpostaviti da s obzirom na njegovu visoku kliničku efikasnost, relaksacija koju izaziva GABA i relaksacija bazalnog tonusa kojeg posle GABA-e izazove ivermektin, predstavljaju „efektivnu kombinaciju“ letalnog paralitičnog dejstva za parazite.

Ispitivanje mehanizma dejstva karvakrola (aktivne supstance eteričnih biljnih ulja) na neuro-mišićnom sistemu nematoda

Za nas je bilo posebno interesantno da ispitamo efekat jednog od aktivnih sastojaka esencijanih biljnih ulja – karvakrola, na neuro-mišićnom preparatu *A. suum*. U literaturi postoje podaci da timol i karvakrol ostvaruju insekticidni efekat kod *Drosophila melanogaster* preko tiraminskog receptora (tyrR) (Enan i sar., 2005). Takođe, iz literature nam je poznato da timol i karvakrol ispoljavaju nematocidna dejstva na *Haemonchus contortus* i *Bursaphelenchus xylophilus* (Camurca-Vasconcelos i sar. 2007; Kong i sar., 2007). Koristeći podatke Pirri i saradnika (2009), da tiraminski receptor kod slobodno živeće nematode *C. elegans* aktivira specifični hloridni kanal, očekivali smo da karvakrol i kod *A. suum* izaziva relaksaciju kao posledicu hiperpolarizacije membrane mišićne ćelije. U ispitivanjima smo testirali nekoliko koncentracija karvakrola 10, 30, 100 i 300 μ M, pri čemu ni jedna nije izazvala kontarkcije, ali su 100 i 300 μ M uzrokovali jasnu relaksaciju. Relaksacija posle 300 μ M iznosila je prosečno 0.5g, ali posebno ističemo da je relaksaciju posle 20-tak minuta sledilo povećanje tonusa ukoliko preparat nije ispiran. Ovakav relaksantni efekat karvakrola nije zavisio od primene GABA-e i dešavao se i kada je karvakrol aplikovan pre ili posle GABA-e. Da bi ispitali potencijalnu interakciju između GABA-e i karvakrola, aplikovali smo 100 i 300 μ M karvakrola 5 min pre aplikacije GABA-e. Prosečna vrednost relaksacije koju je izazvala GABA posle aplikacije karvakrola (300 μ M) bila je signifikantno viša ($p=0.0006$) u odnosu na kontrolnu relaksaciju. Kontrolna relaksacija je iznosila prosečna 0.35g, a prosečna relaksacija posle primene karvakrola 0.75g. Na osnovu ovakvih nalaza možemo pretpostaviti da karvakrol za razliku od ivermektina deluje na drugu vrstu hloridnih kanala, čije otvaranje reguliše tiramin (Enan i sar., 2005) i da je ovaj kanal anatomski udaljen od hloridnog kanala na koji deluje GABA, te da njegovom otvaranjem dolazi do povećanog ulaska jona hlora i jače hiperpolarizacija koja rezultira u stimulaciji relaksacije izazivane GABA-om. U prilog našim pretpostavkama su podaci Lei i saradnika (2010), koji su pokazali

da karvakrol u koncentraciji od 0.67mM ispoljava 100%-tni letalitet za *A. suum* u *in vitro* uslovima. Tiramin zavisni hloridni kanal nematoda, na koga najverovatnije deluju neki aktivni principi esencijalnih biljnih ulja, može biti atraktivno ciljno mesto za potencijalne antihelmintike. Da bi detaljnije ispitali delovanje karvakrola na neuro-mišićni sistem *A. suum*, primenili smo poseban protokol. Protokol se sastojao od 5 serija aplikacije rastućih koncentracija ACh (1, 3, 10, 30, 100 μ M), pri čemu je prva serija uvek bila kontrolna, druga serija je dobijena u prisustvu 100 μ M karvakrola, treća serija kontrakcija predstavljala je kontrakcije dobijene posle ispiranja 100 μ M karvakrola, četvrta serija kontrakcija dobijena u prisustvu 300 μ M karvakrola i poslednja peta serija predstavljala je kontrolne kontrakcije nakon drugog ispiranja. Merenjem dobijenih kontrakcija određena je EC₅₀ ACh od 5.22 μ M i E_{max} od 3.1g. Posle inkubacije preparata sa 100 μ M karvakrola, vrednost EC₅₀ ACh je bila udvostručena na 13.88 μ M a E_{max} smanjen u odnosu na kontrolu za 0.6g (E_{max}=2.50g). Ispiranjem karvakrola, EC₅₀ se vratio na kontrolni nivo pa smo ove vrednosti koristili kao kontrolu za sledeću aplikaciju karvakrola od 300 μ M. Ovih 300 μ M karvakrola je pomerilo sigmoidnu krivu doze i efekta još više u desno, a vrednost EC₅₀ ACh u prisustvu 300 μ M karvakrola bila je 22.72 μ M, sa E_{max} od svega 1,96g. Posle ispiranja ove koncentracije karvakrola došlo je do delimičnog približavanja kontrolnoj vrednosti ali ne i potpuno. Analizirajući izgled dozno zavisnih sigmoidnih krivi, možemo videti da je osim povećanja EC₅₀, u prisustvu karvakrola signifikantno smanjen i E_{max}. Ovaj nalaz smo potvrdili analizom varijanse prosečnih vrednosti kontrakcija ACh u prisustvu 100 i 300 μ M karvakrola, odnosno prosečnih vrednosti kontrolnih kontrakcija. S obzirom da je smanjenje E_{max} sa ili bez značajnije promene EC₅₀ karakteristika nekompetitivnog antagonizma, možemo zaključiti da se ovde radi o fiziološkom nekompetitivnom antagonizmu gde se dva suprotna efekta, dvaju agonista odvijaju preko različitih receptorskih sistema (kontrakcije preko nAChR - agonista je ACh, a relaksacija, odnosno inhibicija kontrakcije

verovatno preko tiraminskog receptora na hloridnom kanalu neuro-mišićnog sistema nematode).

Ispitivanje dejstva antagonista nAChR i agonista GABA receptora na kontrakcije neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* izazvane električnim poljem (EFS)

Do sada u literaturi niko nije opisao model EFS stimulacije neuro-mišićnog preparata *A. suum*. Za nas je posebno bilo interesantno da proverimo ovu mogućnost. Metod EFS omogućava stimulaciju neuro-mišićnog preparata sisara bez spoljnje aplikacije bilo kakvih supstanci. Električno polje određenih karakteristika koje se stvara oko neuro-mišićnog preparata izaziva oslobađanje ACh i njegov postsinaptički efekat na nAChR. Ova metoda je dobro poznata i opisana za sisarske preparate (Seeger i sar., 2007; Trailović i sar., 2011). Testirali smo efekte različitih vrednosti parametara stimulacije na neuro-mišićnom preparatu askarisa: frekvenciju, širinu impulsa, trajanje paketa stimulacije. Svaki preparat je prvo testiran različitim koncentracijama ACh a zatim stimulisan sa EFS. Da bi proverili da li su kontrakcije indirektno, odnosno nastale oslobađanjem ACh ili direktne kao posledica direktnog dejstva električnog polja na kontraktilnu mašinu askarisa, u kupatilce sa preparatom aplikovali smo 100 μ M mekamilamina, koji je u prethodnom ispitivanju sa ACh ispoljio 100%-tni efekat već u koncentraciji od 30 μ M. Međutim, ni jedna od kombinacija primenjenih vrednosti parametara stimulacije nije mogla da izazove indirektnu stimulaciju, odnosno sve su bile neosetljive na mekamilamin. Iz iskustva sa sisarskim preparatima znamo da širina pulsa od 10 μ s, frekvencija od 50Hz i napon struje od 30V, izaziva stabilne indirektno kontrakcije dijafragme osetljive na mekamilamin (Trailović i sar., 2011). U ovom slučaju to nije bilo moguće proizvesti. Da bi se detaljnije analizirao ovaj fenomen potrebno je da se podsetimo o specifičnostima anatomske-fiziološke karakteristika mišićne ćelije askarisa.

Somatske mišićne ćelije *A. suum* imaju drugačiju strukturu u poređenju sa istom vrstom ćelija kod kičmenjaka. One poseduju 3 različita regiona: vretenasti ili vlaknasti, vrećasti i region ručice. Ovakvu strukturu determiniše njihova specifična funkcija.

Somatske mišićne ćelije *A. suum* raspoređene su longitudinalno u odnosu na osu tela i mogu se podeliti u dve grupe: dorzalnu i ventralnu. Dorzalna grupa mišićnih ćelija inervaciju dobija od motornog aksona poreklom iz dorzalne nervne vrpce, a ventralna grupa od motornog aksona poreklom iz ventralne nervne vrpce. Zbog ovakvog grupisanja mišićnih ćelija, talasi kontrakcija nematode propagiraju duž njenog tela dvodimenzionalno, u dorzo-ventralnoj ravni. To znači da se nematoda može kretati unapred i unazad.

Vretenasti deo mišićne ćelije sadrži aktin i miozin (kontraktilnu mašinu), te predstavlja kontraktilni deo ćelije. Aktin i miozin nematode raspoređeni su tako da formiraju prugavost mišića, kao i u skeletnoj muskulaturi kičmenjaka, s tom razlikom da u mišićima telesnog zida nematoda prugavost nije poprečna (perpendikularna) kao kod kičmenjaka. Umesto toga, mišić nematoda ima kosu prugavost, što daje mogućnost za brze kontrakcije.

Vrećasti deo mišićne ćelije funkcioniše kao energetski odeljak mišićne ćelije, najverovatnije kao potporni deo, odnosno uz turgor kao neka vrsta endoskeleta. Takođe, postoje i argumenti koji govore u prilog potpornoj ulozi vrećastog dela mišićne ćelije. Kod intaktnog parazita, vrećasti deo je ispupčen unutra, ka crevu parazita.

Za objašnjenje funkcije mišićne ćelije nematode posebno je važna mišićna ručica. Za razliku od mišićne ćelije sisara, kod kojih nervna vlakna motornog neurona dolaze iz kičmene moždine i imaju sinapsu na motornoj ploči na mišićnoj ćeliji, kod nematoda mišićna ćelija gradi produžetak ili mišićnu ručicu koja se pruža do nervne vrpce. Na svom završetku, mišićne ručice se granaju u nastavke koji se zatim udružuju sa istim takvim nastavcima drugih ručica, gradeći sincicijum, odnosno funkcionalnu mrežu oko nervne vrpce.

Askaris ima oko 300 senzornih i motornih neurona, koji se nalaze u nervnoj vrpici. Između nervne vrpce i motoneurona nalaze se inhibitorni i ekscitatorni interneuroni i upravo oni regulišu kretanje parazita. Motorni neuron se završava na ručici mišićne ćelije i gradi sinapsu preko koje reguliše kontrakciju ili relaksaciju somatskog mišića askarisa. Poznato je da na sinapsi motornog neurona i inhibitornog interneurona, neurotransmisiju obavlja GABA, a na sinapsi ekscitatornog interneurona i motoneurona za neurotransmisiju je odgovoran ACh. To znači da se na postsinaptičkoj membrani sinapse interneuron-motoneuron nalaze GABA i nACh receptor preko kojih se regulišu aktivnost mišićnih ćelija. Ostaje nejasno koja je uloga ekstrasinaptičkih receptora, GABA, nACh receptora, receptora za neuropeptide ili tiraminskog hloridnog kanala, koji su smešteni na membrani vrećastog dela mišićne ćelije nematoda (Martin i sar., 1991). Neki od ovih receptora su detaljno determinisani „*patch-clamp*” elektrofiziološkom metodom (Martin i sar., 1998), ali njihova uloga u kontrakciji ili relaksaciji, kao i način endogene stimulacije nije definisan.

Kako EFS indukovane kontrakcije neuro-mišićnog preparta askarisa nismo uspeli da blokiramo antagonistima nAChR, ispitali smo efekte GABA i lekova označenih kao GABA agonisti. Za izazivanje kontrakcija koristili smo iste parametre EFS kao i u slučaju sa mekamilaminom. Prvo smo testirali ivermektin u koncentracijama od 10 i 30 μ M, ali je izostao bilo kakav efekat. Za razliku od ivermektina, GABA je u koncentracijama od 10 i 30 μ M izazvala signifikantnu inhibiciju EFS-indukovanih kontrakcija dijafragme, i to sa prosečno 0.73g na 0.31g i sa 0.66g na 0.25g ($p < 0.0001$). Efekat GABA-e je bio reverzibilan i posle ispiranja, amplituda kontrakcije je dostizala kontrolnu vrednost. Nije jednostavno objasniti ovakav efekat GABA-e i izostajanje efekata dokazanih GABA agonista. Ovde se sigurno radi o direktnoj stimulaciji, s obzirom da je neosetljiva na mekamilamin. Međutim, očigledno je da dejstvo GABA-e na postsinaptički receptor (u sinapsi inhibitorni interneuron-motoneuron ili motoneuron-mišićna ručica) izaziva dovoljan nivo

hiperpolarizacije mišićne ćelije askarisa da neutrališe čak i direktnu stimulaciju kontraktilne mašine. Zbog čega za tako nešto nije sposoban ivermektin? Možda zbog toga što ne deluje na GABA receptor u sinapsi inhiborni interneuron-motoneuron, već samo na GABA zavisni hloridni kanal na vrećastom delu somatske mišićne ćelije askarisa. Prethodno smo pokazali da ivermektin izaziva relaksaciju samo posle aplikacije ili spontanog oslobađanja GABA-e, što ide u prilog ovakvoj našoj pretpostavci.

Ispitivanje interakcije GABA-e i nikotinskih agonista na neuro-mišićnom preparatu *Ascaris suum*

U našim dosadašnjim ispitivanjima GABA je nesumnjivo ispoljila snažan relaksacioni efekat na somatskim mišićima parazitskih nematoda. Pored toga, videli smo da je neophodno njeno prisustvo, odnosno njen inicijalni efekat kako bi se relaksacija dobila i sa avermektinima, lekovima označenim kao GABA-agonisti. Takođe smo pokazali, da je taj relaksacioni efekat GABA-e neosetljiv na bikukulin, što znači da se GABA-receptor koji reguliše relaksaciju mišića askarisa razlikuje od GABA_A receptora sisara. Ovi naši rezultati su u saglasnosti sa podacima koje navodi Jorgensen (2005), da podela GABA receptora sisara ne može da se primeni kod nematoda. Obzirom na ulogu GABA-e u lokomociji, odnosno kretanju nematoda (brojna istraživanja na *C. elegans* i *A. suum*), smatrali smo za značajno da ispitamo efekat GABA-e i lekova GABA agonista na kontrakcije koje izaziva ACh i lekovi agonisti nikotinskog receptora *A. suum*. Primenjene koncentracije GABA-e bile su najniže koje su izazivale minimalnu relaksaciju preparata *A. suum* u prethodnim istraživanjima. U ovom delu istraživanja međutim, relaksacije nije ni bilo jer preparati askarisa nisu izlagani velikom opterećenju (zatezani su na svega 0.5g). Koristili smo protokol po kome smo aplikovali rastuće doze ACh (1, 3, 10, 30, 100µM), bez ili u prisustvu GABA-e, odnosno lekova GABA agonista. Na početku je određena kontrolna EC₅₀ ACh, zatim vrednost EC₅₀ ACh u prisustvu GABA-e i na kraju je ispitana reverzibilnost efekta GABA-e odnosno, određena je EC₅₀ ACh posle ispiranja.

Kontrolna vrednost EC_{50} ACh iznosila je $4.42\mu\text{M}$, dok je u prisustvu GABA-e dvostruko povećana na $EC_{50}=10.94\mu\text{M}$. Pri tome je posebno bilo interesantno da se maksimalni efekat ACh u prisustvu GABA-e nije mnogo razlikovao od kontrolne vrednosti, iznosio je 2.13g u odnosu na 2.24g. GABA i ACh se oslobađaju na krajevima inhibitornog i ekscitatornog interneurona i na postsinaptičkoj membrani motoneurona ponašaju kao fiziološki antagonisti. Međutim, fiziološki antagonizam bi trebao da bude nekompetetivan, jer se radi o različitim receptorima i agonistima sa suprotnim efektom na istom efektornom organu (inhibicija, odnosno relaksacija i pobuđivanje, odnosno kontrakcija). Ipak, kod askarisa i generalno kod nematoda, zbog specifične uloge inhibitornih i ekscitatornih interneurona i motoneurona koji se vezuju na mišićnu ručicu u nervnoj vrpici (ne prave direktno neuro-mišićnu sinapsu na mišićnoj ćeliji), očigledno je drugačije. Ova vrsta antagonizma koji GABA ostvaruje prema ACh je sličnija kompetitivnom antagonizmu, što je i razumljivo jer u kompeticiji GABA-e i ACh leži ključ funkcionisanja neuro-mišićnog sistema nematoda, kretanje, relaksacija i kontrakcija. Podsećanja radi, kod kompetitivnog antagonizma dolazi do pomeranja krive odnosa doze i efekta u desno, sa potencijalnim povećanjem vrednosti ED_{50} , ali bez promene maksimalnog efekta E_{max} (Katzung i sar., 2011; Rang i sar., 2005). Za razliku od GABA-e, ivermektin primenjen u koncentraciji od 300nM nije značajnije promenio vrednost EC_{50} ACh. Ovu koncentraciju od 300nM smo primenili jer ona odgovara terapijskoj koncentraciji koju ivermektin dostiže u organizmu tertiranih životinja (Puttacharya i sar., 2013). Kontrolna vrednost EC_{50} ACh iznosila je $8.09\mu\text{M}$ a E_{max} 2.85g. EC_{50} u prisustvu 300nM ivermektina iznosila je $10.26\mu\text{M}$, dok je E_{max} bio za 0.5g manji (2.39g). Posle ispiranja ivermektina, vrednost EC_{50} nije bila promenjena i iznosila je $10.19\mu\text{M}$ ali se E_{max} ponovo vratio na kontrolnu vrednost i iznosio je 2.88g. Ovakav inhibitorni efekat ivermektina se razlikuje od inhibitornog efekta GABA-e. Minimalno povećanje vrednosti EC_{50} u prisustvu ACh, ali izrazito smanjenje E_{max} ukazuje na nekompetitivni antagonizam koji iskazuje sam ivermektin (Katzung i sar., 2011;

Rang i sar., 2005). Ovo može biti posledica hiperpolarizacije koju ivermektin izaziva otvarajući posebnu vrstu hloridnog kanala u vrećastom delu mišićne ćelije *A. suum*. Da bi ispitali potencijalnu interakciju između GABA i ivermektina, primenili smo nešto drugačiji protokol. U ovom protokolu su prvo aplikovane rastuće koncentracije ACh da bi se dobila vrednost kontrolne EC_{50} . Zatim su te iste koncentracije ACh aplikovane u prisustvu GABA-e, a onda još jednom ali ovaj put u prisustvu kombinacije ivermektina 300nM i GABA-e 1 μ M. Na kraju, nakon ispiranja urađena je još jedna serija kontrolnih kontrakcija izazvanih samo ACh. Srednja EC_{50} ACh bila je 8.28 μ M, a E_{max} 2.51g. GABA je pomerila koncentracijski zavisnu efektivnu krivu u desno i skoro utrostručila vrednost EC_{50} na 23.44 μ M ali bez promene E_{max} koji je iznosio 2.59g. Posebno interesantno je da dodavanje ivermektina uz GABA-u u narednoj seriji aplikacije ACh za posledicu ima dalje pomeranje koncentracijski zavisne krive u desno i šestostruko povećanje EC_{50} ACh na 50.12 μ M. Ono što posebno ističemo je izrazito smanjenje E_{max} na 1.90g. Posle ispiranja, vrednost EC_{50} ACh je skoro dostigla početnu vrednost i iznosila 9.59 μ M ali je E_{max} i dalje bio daleko niži od kontrolne vrednosti i ostao je na nivou 2.27g. Da bi utvrdili da li interakcija sa GABA-om ispoljava signifikantni inhibitorni efekat na kontrakcije koje izaziva ACh, uporedili smo srednje vrednosti kontrakcija dobijenih bez i u prisustvu GABA-e i ivermektina. Takođe, testirali smo i signifikantnost i reverzibilnosti ovog efekta, tj. uporedili smo kontrakcije dobijene posle ispiranja (ukljanjanja) GABA-e i ivermektina. Inhibicija kontrakcija indukovanih ACh koje je izaziva GABA, bila je signifikantna u prve tri koncentracije ACh (1, 3 i 10 μ M). Međutim, inhibicija nije ispoljila signifikantnost kada su aplikovane koncentracije ACh od 30 i 100 μ M. Dodavanje ivermektina uz GABA, imalo je za posledicu ispoljavanje visoko signifikantne inhibicije u svim primenjenim koncentracijama ACh uključujući i dve najviše (30 i 100 μ M ACh). I ovakvi naši rezultati idu u prilog prethodno iznete pretpostavke da ivermektin potencira dejstvo GABA, delujući preko specifičnog hloridnog jonskog kanala, anatomski udaljenog od mesta vezivanja

GABA na motoneuronu, što ima za posledicu dodavanje nekompetitivne komponente ispoljenom antagonizmu. Da bi ovu našu pretpostavku proverili, ispitili smo interakciju između dokazanog GABA agoniste piperazina, koji je u našim ispitivanjima izazvao jasnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum* i ivermektina. Primenjen je isti protokol kao u prethodnom ispitivanju, aplikovane su iste koncentracije ACh kao i GABA i ivermektina. Piperazin je testiran u koncentraciji od 100 μ M, najnižoj iz našeg prethodnog ispitivanja koja je ispoljila minimalni relaksantni efekat. Kontrolne kontrakcije ACh u ovom ispitivanju dale su EC₅₀ od 9.47 μ M i E_{max} od 4.38g. Piperazin nije promenio vrednost EC₅₀ ACh i ona je iznosila 10.76 μ M, dok je E_{max} bilo niži za skoro 1g (3.45g). Kada smo kontrakcije ACh merili u prisustvu piperazina 100 μ M i ivermekrina 300nM, vrednost EC₅₀ je bila skoro ista kao i prethodna i iznosila je 10.88 μ M, ali je preračunata vrednost E_{max} još više opala na svega 2.73g. Drugim rečima, dodavanje ivermektina ne menja značajnije vrednost EC₅₀ ACh ali značajno smanjuje E_{max} ACh. Efekat koji su piperazin i ivermektin ispoljili na kontrakcije uzrokovane ACh bio je reverzibilne prirode. Posle njihovog ukljanjanja (ispiranja vodenog kupatila) kontrolna serija kontrakcija dala je vrednost EC₅₀ od 11.48 μ M i dovela do skoro potpunog oporavljanja E_{max} od 3.91g. Ovi naši rezultati potvrđuju pretpostavku da agonisti GABA receptora nematoda – piperazin i ivermektin, nekompetitivnom mehanizmom inhibišu kontrakcije izazvane ACh preko receptorskih struktura, verovatno na hloridnom kanalu lokalizovanom odvojeno od GABA-zavisnog hloridnog kanala na postsinaptičkoj membrani motoneurona ili produžetku (ručici) somatske mišićne ćelije askarisa.

Ispitivanje efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovane dijafragme pacova pod dejstvom EFS

Osnovni princip na kome se zaniva primena antiparazitskih lekova jeste njihova selektivna toksičnost, gde oni ispoljavaju letalno dejstvo za parazite, a da pri tome ne deluju na domaćine. Većina antiparazitskih lekova fiziološki ne prolazi krvno-moždanu barijeru u organizmu sisara i ne ulazi u CNS. S obzirom da se mehanizam dejstva antiparazitika: nikotinskih i GABA agonisat zasniva na vezivanju za nikotinske ili GABA receptore, preostaje jedino mogućnost da taj efekat ostvare periferno, vezujući se za periferne neuro-mišićne strukture. Očekivano bi bilo da se agonisti nikotinskog receptira nematoda vezuju za nikotinski receptor na motornoj ploči sisara. Ovome ide u prilog i činjenica da antiparazitici agonisti nikotinskog receptora, kao jedan od najvažnijih neželjenjih efekata ispoljavaju upravo poremećaj kretanja, ataksiju, tremor, otežano disanje, poremećaj rada i zastoj srca, i drugo (Adams, 2001) Ovi neželjeni efekti nikotinskih agonista mogli bi da budu posledica upravo delovanja na nikotinski receptor na motornoj ploči mišića dijafragme, srca i skeletnih mišića. Da bi uporedili potencu lekova agonista nikotinskog receptora nematoda, primenjene su koncentracije koje su daleko više od terapijskih. Koristili smo model EFS indukovanih kontrakcija na izolovanoj dijafragmi pacova. Preparati dijafragme pacova stimulisani su tetaničnim pulsevima EFS u paketima po 5 kontrakcija na svakih 30 sekundi (širina impulsa 10 μ s; frekvenc 50Hz; napon 20V; trajanje impulasa 2s), sa pauzom od 3 minuta između paketa. Ispitivani lekovi su posle kontrolnog paketa kontrakcija aplikovani odmah nakon ispiranja, odnosno 3 minuta pre naredne stimulacije EFS. Na kraju svakog ispitivanja, preparat je testiran sa 100 μ M mekamilamina da bi se potvrdilo da se radi o indirektnoj stimulaciji. Prvi je testiran levamizol. Levamizol je ispoljio dozno-zavisni inhibitorni efekat na kontrakcije dijafragme, sa vrednošću srednje inhibitorne koncentracije IC₅₀ od 53.83 μ M. Najniža koncentracija levamizola koja je izazvala inhibiciju EFS kontrakcija bila je 10 μ M. Podsećanja radi, EC₅₀ levamizola za kontrakcije *A. suum* u našim istraživanjima

je iznosila 0.34 μ M. Na osnovu ovakvih rezultata može se zaključiti da levamizol tek u koncentracijama koje su 30 puta više od terapijskih, ispoljava toksična dejstva na dijafragmi. Naši rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Reyes i saradnika (2004) koji su u elektrofiziološkim ispitivanjima pokazali da je levamizol slab agonista sisarskog ACh receptora. U svom ispitivanju Reyes i saradnici (2004) navode da levamizol blokira otvoreni nACh jonski kanala. Takođe, ono što nije u saglasnosti sa našim rezultatima, jeste i to da je ovaj efekat dobijen u koncentracijama daleko višim od onih koje smo mi koristili (190 μ M).

Da bi bolje razumeli naše rezultate moramo još jednom da analiziramo razlike nikotinskog receptora nematoda i sisara. *Nikotinski receptori* su tipični predstavnici jonskih kanala koje otvara ligand (ligand-zavisni jonski kanali; "ligand-gated ion channels"). Sastoje se iz ukupno 5 subjedinica, a oligomerna struktura ($\alpha 2, \beta, \gamma, \delta$) poseduje dva mesta za vezivanje acetilholina. Da bi se receptor aktivirao potrebno je da se za njega vežu 2 molekula acetilholina.

Kod vertebrata postoje dva glavna tipa nAChR: neuromišićni i neuronski tip. *Neuronski tip* nikotinskog receptora nalazi se u CNS i svim autonomnim ganglijama. S druge strane, *neuromišićni tip* receptora je lokalizovan na neuromišićnim sinapsama skeletne muskulature i stimulacija ovih receptora dovodi do mišićne kontrakcije. Na postsinaptičkoj mišićnoj membrani identifikovana su tri subtipa 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). Dakle, moguće je da kanal bude i pentamerni monomer, koga čine samo α -subjedinice. Kod vertebrata postoji najmanje 12 α -subjedinica i 3 β -subjedinice, ali samo ograničeni broj njih gradi funkcionalne receptore. Tako na primer, samo subjedinice od $\alpha 7$ do $\alpha 12$ čine homomerni kanal (bez kombinacije sa β -subjedinicama). Različiti homomerni i heteromerni receptori imaju različite farmakološke karakteristike (Robertson i sar., 2007b).

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 u stvari znači da ACh aktivacijom ovih autoreceptora može pojačati svoje sopstveno oslobađanje (presinaptička modulacija). Nasuprot tome, 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).

Shodno našim rezultatima, levamizol vrlo efikasno blokira EFS indukovane kontrakcije dijafragme, pri čemu ispoljava i presinaptičko dejstvo (pojava tetaničnog slabljenja) već u koncentraciji od 30 μ M. To znači da deluje i na presinaptički neuronski tip nikotinskog receptora. Ovaj presinaptički efekat je sve izraženiji (kao i postsinaptički) sa povećanjem koncentracije. Ono što je vrlo važno je da su i presinaptički i postsinaptički efekat levamizola reverzibilni i da se posle ispiranja kontrakcije dijafragme normalizuju. To je suprotno efektu kod nematoda, jer je on agonistički (izaziva kontrakciju) i potrebno je dugo vremena da se posle kontrakcije normalizuje bazalni tonus.

Ovo ukazuje na veliki diverzitet tipova nikotinskih receptora nematoda. Farmakološki gledano, nikotinski receptor nematoda je sličniji neuronskom tipu receptora vertebrata, jer je recimo neosetljiv na blokadu α -bungarotoksinom. Za razliku od vertebrata, kod adultnih nematoda je dokazano više tipova nAChR na mišićnim ćelijama (Robertson i sar., 2007a). Kod velike nematode svinja, *A. suum*, dokazana su tri tipa nAChR na mišićnoj membrani: L-tip (preferira levamizol i pirantel kao agonistu), N-tip (preferira nikotin i oksantel kao agonistu) i B-tip (preferira befinijum kao agonistu). Levamizol aktivira L-tip kanala, ali u manjoj meri otvara i N i B-tip kanala. Befinijum pre svega otvara B-tip kanala, ali i L-tip, dok na N-tip ne deluje. 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). Do sada nisu objavljeni podaci o postojanju bilo

kakvih presinaptičkih receptora na sinapsi motoneurona i mišićne ručice somatskih mišićnih ćelija nematoda. Upravo zbog toga ovaj presinaptički efekat koji je zapažen kod sisara ne možemo da uporedimo sa adekvatnim efektom kod nematoda.

Međutim, u našem ispitivanju befinijum je ispoljio skoro identičnu IC_{50} kao i levamizol $54,47\mu M$. Takođe, i befinijum ispoljava presinaptički efekat delujući na neuronski tip autoreceptora na motornoj ploči sisara, ali je taj presinaptički efekat ispoljavao nešto ranije, već u koncentraciji od $10\mu M$ (najniže primenjena). Ono što je specifično za befinijum, reverzibilnost efekta nije bilo moguće ispitati, jer je posle ispiranja najviše primenjene koncentracije dolazilo do izrazitog povećanja bazalnog tonus preparata. Ovo povećanje je onemogućilo dalje kontrakcije izazvane sa EFS.

Sledeći agonista nikotinskog receptora nematoda čiji smo efekat na kontrakcije dijafragme ispitivali, bio je pirantel. On je u odnosu na prethodna dva leka ispoljio najveću potencu, jer je preračunata IC_{50} za EFS izazvane kontrakcije dijafragme iznosila $5,53\mu M$. Tetanično slabljenje je zabeleženo posle druge primenjene koncentracije od $5\mu M$. Ovaj inhibitorni efekat pirantela na kontrakcije dijafragme je bio potpuno reverzibilan i posle tri ispiranja, kontrakcije su gotovo dostigle kontrolni nivo. Međutim, presinaptički efekat pirantela koji se može pripisati njegovom dejstvu na neuronski tip presinaptičkog autoreceptora na motornoj ploči sisara, zaostao je čak i posle četvrtog ispiranja. Najniža koncentracija pirantela koja je izazvala inhibiciju kontrakcija dijafragme bila je 100 puta viša od EC_{50} pirantela za kontrakcije preparata askarisa.

I na kraju, kao poslednji od nikotinskih agonista čiji smo efekat na kontrakcije dijafragme ispitali bio je tribendimidin. Tribendimidin primenjivan u rastućim koncentracijama 3, 10, 30, 100 i $300\mu M$ ali nije ispoljio nikakvo inhibitorno dejstvo na kontrakcije dijafragme pacova. Analizom pojedinačnih kontrakcija zapaženo je da tribendimidin ne izaziva ni tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*), ni u jednoj od testiranih koncentracija.

Činjenica da smo dobili različitu potencu u inhibiciji kontrakcija dijafragme izazvane sa EFS, primenom agonista različitih tipova nikotinskih receptora parazitskih nematoda, ukazuje na različitost tipova nikotinskog receptora sisara i invertebrata. Kako smo dokazali i presinaptički efekat levamizola i pirantela potvrdili smo pretpostavke da ova grupa lekova ne ispoljava preveliku selektivnost između mišićnog i neuronskog tipa nikotinskih receptora sisara, već se samo radi o nemogućnosti da u nekim nižim koncentracijama (do 10 puta većim od terapijske) penetriraju u CNS. Ovoj našoj pretpostavci govori u prilog i klinička slika trovanja životinja antiparaziticima nikotinskim agonistima, gde se uz periferne efekte javljaju i centralni poremećaji (Adams, 2001).

Osim antihelmintika sa dejstvom na nikotinski receptor, ispitali smo i efekte lekova agonista GABA receptora na kontrakcije dijafragme pacova. Ovo ispitivanje sprovedeno je iz najmanje dva razloga: prvi - postoje dokazi da avermektini mogu da deluju na izvesne tipove nikotinskog receptora sisara ($\alpha 7$) (Puttacharya i sar. 2013), i drugi - GABA receptor ima dokazanu ulogu u relaksaciji skeletne muskulature sisara. Naime poznato je da benzodiazepini ispoljavaju jako miorelaksantno dejstvo koje ostvaruju vezivanjem za $\alpha 1$ i $\alpha 5$ GABA_A receptor (Milić i sar., 2012).

Na početku ovog dela ispitivanja testirali smo efekte piperazina na kontrakcije dijafragme izazvane EFS. Piperazin je primenjen u koncentracijama od 30, 100, 300, 1000 i 3000 μ M ali ni jedna od primenjenih koncentracija nije izazvala promenu prosečne vrednosti kontrakcije dijafragme. Analizom pojedinačnih kontrakcija, uočeno je da piperazin takođe, ne izaziva tetanično slabljenje kontrakcija (*tetanic fade*) ni u jednoj od testiranih koncentracija. Pored piperazina, ispitali smo i efekat moksidektina, predstavnika grupe milbemicina (makrolidnih antibiotika) i GABA agonista. Moksidektin je aplikovan u koncentracijama od 10, 30 i 100 μ M. Ni jedna od primenjenih koncentracija moksidektina nije promenila srednju vrednost kontrakcija dijafragme, niti je izazvala tetanično slabljenje (*tetanic fade*). U literaturi postoje podaci da

ivermektin, predstavnik grupe avermektina deluje na neuronski $\alpha 7$ AchR, kao pozitivni alosterični modulator (Krause i sar., 1998). Međutim, kao i u našim prethodnim istraživanjima sa ivermektinom (Trailović i sar., 2011), moksidektin predstavnik druge grupe makrolidnih antibiotika, ovde nije ispoljio nikakav efekat na kontrakcije dijafragme. To znači da kao i ivermektin, piperazin i moksidektin ne deluju na mišićni tip nikotinskog ACh receptora dijafragme pacova, niti na presinptički neuronski tip receptora na motornoj ploči sisara. Sa druge strane, bilo je indikativno da antiparazitici GABA-agonisti možda ispoljavaju izvestan stepen mišićne relaksacije kod sisara kroz interakciju sa benzodiazepinskim mestima vezivanja na GABA-ergičkom hloridnom jonofornom kompleksu. Ovu pretpostavku smo zasnovali na rezultatima Trailović i Nedeljković (2011), koji su dokazali da se jedan deo depresivnog efekta ivermektina na CNS sisara može neutralizovati flumazenilom – antagonistom benzodiazepinskih receptora. Međutim, očigledno je da na GABA_A tip receptora, koji reguliše mišićnu relaksaciju, moksidektin i piperazin ne deluju.

Ispitivanje efekata antihelmintika nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovanog ileuma pacova pod dejstvom EFS

Smatrali smo da je značajno ispitati efekte nikotinskih i GABA agonista na funkciju izolovanog ileuma pacova, u cilju istraživanja negativnih efekata ovih lekova na gastrointestinalni sistem sisara. Nervni sistem je lokalizovan i u gastrointestinalnom traktu. Ovaj deo nervnog sistema se često naziva eneteralni nervni sistem. Njega čini visoko organizvana kolekcija neurona koja se često opisuje kao treći deo autonomnog nervnog sistema. Eneteralni nervni sistem grade mienterični pleksus (*Auerbachov pleksus*) i submukozni pleksus (*Meisnerov pleksus*). Neuroni ovog sistema primaju preganglijska vlakna parasimpatikusa i postganglijska vlakna simpatikusa, a iz samog zida creva dolaze senzorna vlakna. Od neurona enteralnog nervnog sistema polaze vlakna koja kontrolišu motilitet glatkih mišića, a neka od njih se završavaju na sekretornim ćelijama.

Parasimpatički i simpatički sistem imaju samo modulatorno dejstvo na enteralne pleksuse, jer čak i potpuno isključivanje iz funkcije ova dva sistema ne zaustavlja funkcije creva. U enteralnom nervnom sistemu se nalazi veliki broj biološki aktivnih supstanci koje vrše transmittersku ili modulatornu ulogu u funkcionisanju creva (serotonin, supstanca - P, vazointestinalni peptid - VIP, azotni oksid, ACh, kateholamini idr.). Zbog toga je razumljivo što veliki broj lekova i drugih supstanci koje deluju na ove transmitere, istovremeno menjaju i funkciju gastrointestinalnog trakta (Katzung i sar., 2011; Varagić i Milošević, 2008). U literaturi postoje brojni dokazi o postojanju GABA receptora u mienteričnom pleksusu sisara, kao i o neuronima od kojih polaze projekcije prema longitudinalnim i cirkulatornim mišićima creva (Jessen i sar., 1987; Furness i sar., 1989). U ispitivanju dejstva nikotinskih i GABA agonista na kontrakcije izolovanog ileuma pacova koristili smo dva protokola. U prvom protokolu smo posle rastućih koncentracija ACh (0.1, 0.3, 1, 3 i 10 μ M) aplikovali različite koncentracije ispitivanih antihelmintika kako bi utvrdili njihov potencijalni uticaj na bazalni tonus ileuma. Posle ACh, aplikovali smo nikotinske agoniste - tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel u koncentracijama 1, 3, 10, 30 i 100 μ M. Na osnovu dobijenih rezultata na 5 preparata *A. suum*, ACh je za kontrakcije ileuma ispoljio EC₅₀ od 1.02 μ M ali ni jedan od ispitivanih agonista nikotinskog receptora nematoda nije izazvao kontrakcije preparata ileuma. Na osnovu prethodno dobijenih rezultata na preparatu askarisa, možemo zaključiti da befinijum, pirantel, levamizol i tribendimidin primenjeni u koncentracijama 10, 1000, 10 i 30 puta višim od koncentracija koje dovode do kontrakcija neuro-mišićnog preparata askarisa, nemaju nikakav efekat na mienterični pleksus, tj. neuro-mišićnu strukturu ileuma pacova.

Slični rezultati dobijeni su i sa agonistima GABA receptora nematoda, piperazinom i moksidektinom. Primenjen je isti protokol kao i u prethodnom ispitivanju. Na početku, aplikovane su rastuće koncentracije ACh, a zatim rastuće koncentracije moksidektina 1, 3, 10, 30 i 100 μ M i piperazina 30, 100, 300

i 1000 μ M. U ovom delu ispitivanja (n=5), EC₅₀ ACh iznosila je 1.22 μ M. Međutim, kao i u prethodnom ispitivanju, piperazin primenjen u koncentracijama kao i kod *A. suum*, i moksidektin primenjen u 10 puta višim koncentracijama, nisu ispoljili bilo kakve efekte na kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Napominjemo da piperazin nismo bili u mogućnosti da primenimo u desetostrukim ili višim koncentracijama u odnosu na ispitivanja na askarisu, jer bi to daleko prevazišlo milimolarne koncentracije i onemogućilo njegovu rastvorljivost. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Trailović i Nedeljković (2011) i Coccini i saradnici (1993), koji su publikovali da ivermektin reaguje sa GABA_A receptorom u mienteričnom pleksusu, izazivajući kontrakcije ili povećanje osnovnog tonusa ileuma. Međutim, očigledno da izvesne razlike između piperazina i makrolidnih antibiotika postoje, što smo se uverili u ispitivanju na *A. suum* gde piperazin izaziva jasnu relaksaciju za razliku od avermektina. S druge strane, u literaturi postoje podaci da se neželjeni efekti ivermektina i moksidektina razlikuju, pa se tako psi rase koli, preosetljivi na ivermektin, mogu tretirati moksidektinom bez ispoljavanja neželjenih reakcija (Paul i sar., 2000). Naši rezultati su u saglasnosti sa podacima da postoji razlika u neželjenim dejstvima milbemicina i avermektina, a samim tim i u mehanizmima kojima oni izazivaju neželjena dejstva. Ovo bi moglo da označi vrlo interesantan pravac ispitivanja neželjenih dejstava makrolidnih antibiotika sa antiparazitskim dejstvima. Da bi još detaljnije ispitali eventualana neželjena i toksična dejstva GABA i nikotinskih agonista, a s obzirom na prethodno dobijene rezultate na dijafragmi pacova, testirali smo dejstvo ovih lekova na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane EFS. Kao i u prethodnom protoklu, na početku ispitivanja sa svakim preparatom (n=5) aplikovane su rastuće koncentracije ACh, a zatim su preparati stimulisani sa po 5 stimulacija, svakih 60 sekundi, sa pauzom od po 5 minuta između paketa. Testirane su po dve koncentracije ispitivanih lekova, 10 i 100 μ M tribendimidina, befinijuma, levamizola i pirantela. Ni jedna od primenjenih koncentracija nije dovela do promene srednjih vrednosti kontrakcija ileuma izazvanih EFS, niti je došlo do

promene njegovog bazalnog tonusa. Pored efekata nikotinskih agonista, ispitali smo i efekte piperazina i moksidektina, ovaj put primenjenih u koncentracijama od 1000 i 100 μ M. I ovde je primenjen isti protokol kao i prethodno, različite koncentracije ACh na početku a zatim kontrolni paket stimulacija, odnosno stimulacije u prisustvu testiranih koncentracija piperazina i moksidektina. Ni jedan od primenjenih agonista GABA receptora nematoda nije promenio srednju vrednost kontrakcija izazvanu EFS, što je u saglasnosti sa prethodnim rezultatima dobijenim na bazalnom tonusu ileuma. Na kraju ovog dela ispitivanja možemo sa sigurnošću zaključiti da agonisti nikotinskog receptora nematoda, tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel u koncentracijama od 10 do 1000 puta višim od efektivnih koncentracija kod nematoda, ne ispoljavaju bilo kakvo dejstvo na kontraktilnost ileuma pacova.

Ispitivanje efekata karvakrola na kontrakcije izolovane dijafragme i ileuma pacova primenom metode EFS

Da bi upotpunili deo farmakološkog profila karvakrola kao potencijalnog antihelmintika, ispitali smo njegove efekte na kontrakcije dijafragme pacova izazvane EFS i to primenom istih parametara stimulacije kao i u prethodnim istaživanjima. Karvakrol je primenjen posle kontrolnog paketa kontrakcija u koncentracijama od 10, 30 i 100 μ M, koje su testirane i u ispitivanju na askarisu. Ni jedna od primenjenih koncentracija nije promenila amplitudu kontrakcija izolovane dijafragme pacova (n=5). Međutim, primećena su dva njegova vrlo specifična efekta. Prvi, da posle ispiranja dolazi do povećanja osnovnog tonusa i drugi, da 100 μ M karvakrola dovodi do izvesnog tetaničnog slabljenja bez smanjenja amplitude kontrakcije. Ovaj presinaptički efekat je vrlo interesantan i zaslužuje posebnu pažnju u budućim istaživanjima. S druge strane, radi se o koncentraciji koja je relativno niska u odnosu na koncentracije koje su publikovane kao nematocidne (0.67mM). Međutim, to svakako ne umanjuje potencijalni značaj karvakrola kao antihelmintika. Kao fenolno jedinjenje on podleže metabolizmu u zidu creva i gotovo je nemoguće da na

nikotinskim receptorima dostigne ovu koncentraciju. Mnogo značajnije za sagledavanje toksikološkog profila karvakrola je bilo da ispitamo njegov potencijalni efekat na kontrakcije izolovanog ileuma pacova, izazvane EFS. Testirali smo dejstvo dve koncentracije karvakrola: 300 i 1000 μ M. Ukupno je testirano 4 preparata ileuma. Karvakrol nije ispoljio bilo kakve promene u amplitudi kontrakcije. Dobijeni rezultati ukazuju da čak ni trostruka koncentracija karvakrola, u odnosu na testirane na preparatima askarisa, ne izaziva promene u kontrakcijama ileuma. Može se pretpostaviti da karvakrol može da postigne tolike koncentracije u crevima posle p.o. davanja, kao antihelmintik ili lek koji će pojačati efekat nekog drugog antihelminitika (recimo GABA agoniste), ali to na osnovu naših rezultata neće delovati štetno na crevnu peristaltiku.

7. Zaključci

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanu su mehanizmi antiparazitskog i toksičnog dejstva antihelminika agonista nikotinskog i GABA receptora nematoda. Njihovo bolje poznavanje značajno će doprineti sprovođenju racionalne antiparazitske farmakoterapije kod životinja i ljudi, omogućiće bliže određivanje prirode neželjenih efekata kod domaćina, kao i njihovo ublažavanje ili otklanjanje. Posebno je bilo značajno ispitati efikasnost agonista pojedinih tipova nikotinskog receptora parazitskih nematoda i detaljnije analizirati značaj tih podtipova receptora kao ciljnih mesta za delovanje lekova. Sa druge strane, ova saznanja mogu pomoći u stvaranju kombinacija lekova koji deluju na različite podtipove nikotinskog receptora nematoda, radi dobijanja kombinacije sa većom efikasnošću.

Bilo je značano utvrditi kakvu efikasnost u modelu kontrakcija neuro-mišićnog preparata *Ascaris suum* ispoljava tribendimidin, potencijalno novi antihelmintik u veterinarskoj medicini i kakva je njegova efikasnost u poređenju sa već poznatim antinematodnim lekovima. Sa druge strane, do sada nisu objavljeni podaci o specifičnostima nikotinskog ACh receptora na koji tribendimidin deluje, odnosno nije bilo odgovora na pitanje da li se radi o istom receptoru na koji deluju i ostali lekovi agonisti nAChR.

GABA je dokazani neurotransmiter u neuro-mišićnom sistemu nematoda a ovom prilikom smo ispitali i uporedili efekte GABA sa lekovima koji su označeni kao GABA agonisti. Takvih podataka dobijenih na modelu kontrakcija neuro-mišićnog preparata *A. suum* u literaturi do sada nije bilo. Kako su GABA-ergički i holinergički deo neuro-mišićnog sistema nematoda odgovorni za kretanje, proučili smo detaljnije njihovu interakciju u kojoj se možda potencijalno nalazi novi koncept dejstva antiparazitika.

I na kraju, posebno smo bili zainteresovani da ispitamo antiparazitska i toksična svojstva karvarola, aktivnog sastojka esencijalnih biljnih ulja, koji je ozbiljni kandidat za novi antiparazitski lek.

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

1. Agonisti L, N i B tipa nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematoda, ispitivani na modelu neuro-mišićnog preparata *A. suum*, ispoljili su različitu efikasnost.
 - Najvišu efikasnost u prvoj grupi ispitivanih agonista, ispoljio je pirantel (agonist L-tipa nikotinskog receptora $EC_{50}=0.010\mu M$, $E_{max}=2.5g$), zatim befinijum (agonist B-tipa nikotinskog receptora $EC_{50}=0.37\mu M$, $E_{max}=2.7g$) i na kraju acetilholin (endogeni neurotransmiret), agonista sva tri tipa L, N i B nikotinskog receptora $EC_{50}=6.12-6.45\mu M$, $E_{max}=1.71-2.07g$).
 - Najvišu efikasnost u drugoj grupi ispitivanih agonista nikotinskog receptora ispoljio je tribendimidin (najverovatnije agonista L-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=0.064\mu M$, $E_{max}=1.29g$), zatim levamizol (agonista L-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=0.34\mu M$, $E_{max}=0.68g$) i na kraju nikotin (agonista N-tipa nikotinskog receptora, $EC_{50}=4.99\mu M$, $E_{max}=1.07g$).
2. Nikotinski acetilholinski receptor *A. suum*, na koji deluju tribendimidin i nikotin ispoljava osobine oba tipa nAChR sisara: a) karakteristike mišićnog tipa nAChR sisara, jer je osetljiv pre svega na pankuronijum ali i na tubokurarin; b) karakteristike neuronskog tipa nAChR sisara, jer je osetljiv pre svega na mekamilamin ali i na heksametonijum.

3. GABA izaziva dozno-zavisnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*, sa vrednošću srednje EC_{50} od $7.40\mu M$, dok piperazin relaksaciju izaziva sa EC_{50} od $331\mu M$.
 - Receptor preko koga GABA i piperazin ostvaruju relaksaciju *A. suum* različit je od $GABA_A$ receptora sisara jer je neosetljiv na bikukulin (specifični antagonist $GABA_A$ receptora).
4. Ivermektin i moksidektin sami po sebi ne dovode do relaksacije neuro-mišićnog preparata *A. suum*.
 - Ivermektin ne potencira relaksaciju koju izaziva GABA.
 - Ivermektin dovodi do relaksacije samo kada je aplikovan posle GABA ili na neuro-mišićnim preparatima *A. suum* sa velikom amplitudom spontane aktivnosti (spontane kontrakcije i relaksacije od oko 0.5g).
 - Ivermektin za svoje dejstvo najverovatnije zahteva prethodnu aktivaciju GABA-zavisnog hloridnog jonskog kanala.
5. Karvakrol u koncentracijama od 100 i $300\mu M$, izaziva dugotrajnu relaksaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum*.
 - Karvakrol signifikantno potencira relaksaciju koju izaziva GABA i signifikantno inhibiše dozno-zavisne kontrakcije izazvane sa ACh, pomerajući vrednost EC_{50} ACh sa kontrolnih $5.22\mu M$, na $13.88\mu M$ i $22.72\mu M$.
 - Karvakrol smanjuje maksimalni kontraktilni efekat ACh sa kontrolnih 3.1g na 2.50g i 1.96g. Ovde se verovatno radi o klasičnom nekompetitivnom fiziološkom antagonizmu, koji karvakrol ispoljava u odnosu na ACh.
6. Ni jedna kombinacija različitih parametara električne poljne stimulacije (EFS) (10 do 100Hz, 0.01-1.0ms, 5 do 30V, od 2.0s do kontinuirane

stimulacije), ne izaziva indirektnu stimulaciju neuro-mišićnog preparata *A. suum* (kontrakcije su neosetljive na mekamilamin). Objašnjenje može biti veća osetljivost mišićne kontraktilne mašine na EFS u odnosu na nerve koji oslobađaju ACh.

- Kontrakcije *A. suum* dobijene sa EFS su ipak bile osetljive na 10 i 30 μ M GABA, što se može objasniti snažnom hiperpolarizacijom mišićnih i nervnih ćelija askarisa koju GABA izaziva.

7. GABA u koncentraciji od 1 μ M udvostručuje vrednost EC_{50} ACh sa 4.42 μ M na 10.94 μ M, bez značajnije promene E_{max} .

- Ivermektin 300nM, ne menja značajnije vrednost EC_{50} ACh, 10.26 μ M u odnosu na kontrolnih 8.09 μ M, ali smanjuje vrednost E_{max} za 0.5g.
- Kada se primene zajedno, GABA i ivermektin povećavaju vrednost EC_{50} ACh sa 8.28 μ M na 50.13 μ M i smanjuju vrednost E_{max} sa 2.51g na 1.90g.
- Kombinacija GABA i ivermektina ispoljava visoko signifikantnu inhibiciju dejstva ACh u svim koncentracijama u kojima je on primenjen, pri čemu je efekat kombinacije bio veći od njihovih pojedinačnih dejstava.

8. Piperazin u koncentraciji od 100 μ M ne menja vrednost EC_{50} acetilholina (10.76 μ M u odnosu na kontrolnih 9.47 μ M) ali smanjuje vrednost E_{max} za skoro 1g (sa 4.38g na 3.45g). Kada se piperazinu doda ivermektin 300 μ M, vrednost EC_{50} acetilholina se i dalje ne menja, ali se E_{max} smanjuje do 2.73g. Smanjivanje maksimalnog efekta bez promene EC_{50} ostvajuju nekompetitivni antagonisti, kako se piperazin i ivermektin mogu označiti u odnosu na dejstvo ACh.

9. Agonisti nikotinskog receptora nematoda: levamizol, befinijum i pirantel deluju antagonistički na kontrakcije izolovane dijaframe pacova izazvane sa EFS. EC_{50} levamizola iznosi $53.83\mu\text{M}$, befinijuma $54.47\mu\text{M}$ i pirantela $5.53\mu\text{M}$. Sva tri leka su ispoljila i presinaptički efekat, levamizol u koncentracijama višim $30\mu\text{M}$, befinijum u koncentracijama višim od $10\mu\text{M}$ i pirantel u koncentracijama iznad $5\mu\text{M}$.
 - Tribendimidin nije ispoljio bilo kakvo dejstvo na kontrakcije izolovane dijafragme u koncentracijama do $300\mu\text{M}$.
10. Agonisti GABA receptora piperazin (30 do $3000\mu\text{M}$) i moksidektin (10 do $30\mu\text{M}$) nisu ispoljili bilo kakav efekat na kontrakcije izolovane dijafragme izazvane EFS.
11. Agonisti nikotinskog receptora nematoda tribendimidin, befinijum, levamizol i pirantel (1 do $100\mu\text{M}$), ne ispoljavaju bilo kakvo dejstvo na tonus izolovanog ileuma pacova. Primenjeni u koncentracijama od 10 i $100\mu\text{M}$ ne menjaju srednju vrednost kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS.
 - Agonisti GABA receptora nematoda, piperazin (30 do $1000\mu\text{M}$) i moksidektin (1 do $100\mu\text{M}$), ne ispoljavaju bilo kakvo dejstvo na tonus izolovanog ileuma pacova, niti menjaju srednju vrednost kontrakcija ileuma izazvanih sa EFS.
12. Karvakrol (10 , 30 i $100\mu\text{M}$) ne menja srednju vrednost kontrakcija dijafragme pacova izazvanih sa EFS. Međutim, najviša testirana koncentracija dovodi do izvesnog tetaničnog slabljenja, što ukazuje na potencijalni presinaptički efekat karvakrola.
 - Na izolovanom ileumu pacova, karvakrol (300 i $1000\mu\text{M}$) ne utiče na kontrakcije izazvane sa EFS.

Izvedeni zaključci ukazuju da pojedini agonisti nAChR nematoda ispoljavaju veoma različitu efikasnost na neuro-mišićnom preparatu *A. suum* i da ta efikasnost zavisi od podtipa receptora na koji agonist deluje (L, B ili N). Kombinacija lekova agonista različitih podtipova nAChR nematoda mogla bi da predstavlja potpuno nov prilaz lečenju parazitskih infekcija u odnosu na klasičnu terapiju samo jednim lekom.

Tribendimidin na osnovu naših ispitivanja predstavlja veoma potentni i potencijalno koristan lek u veterinarskoj medicini. Istovremeno on ne deluje na periferne holinergičke i GABA-ergičke nervne strukture, što ukazuje na visoku bezbednost njegove primen kod domaćina.

GABA-ergički makrolidni antihelmintici, na osnovu naših rezultata, sami po sebi ne izazivaju relaksaciju mišića askarisa, ali posle GABA ispoljavaju relaksantno dejstvo. Očigledno da je za ovaj njihov efekat potrebna aktivacija hloridnog kanala, čije otvaranje reguliše GABA. Piperazin sa druge strane, sam po sebi izaziva relaksaciju ali najverovatnije ne deluje na isti receptor kao i avermektini i milbemicini. Međutim, zajedno sa njima ispoljava izraziti nekompetitivni antagonizam u odnosu na kontrakcije izazvane sa ACh i to možda može da bude nova kombinacija lekova u farmakoterapiji parazitskih infekcija.

Na osnovu rezultata o dejstvu karvakrola u našim istraživanjima i hemijskih karakteristika ovog jedinjenja prirodnog porekla, gotovo da možemo da tvrdimo da je karvakrol veoma ozbiljan kandidat za potencijalni antihelmintički lek. On bi se mogao primenjivati samostalno ili u kombinaciji sa recimo GABA-agonistima čije antiparazisko dejstvo pojačava (kako smo u našim ispitivanjima pokazali).

Na kraju, svi ispitivani lekovi su ispoljili slab ili gotovo nikakav toksični potencijal na modelu izolovane dijafragme i ileuma pacova. Ukoliko ne prolaze krvno-moždanu barijeru (što za sve njih važi u fiziološkim okolnostima) i zbog toga ne deluju na centralne GABA i holinergičke strukture, njihova toksičnost za domaćina je veoma niska, jer na periferne nikotinske i GABA strukture

deluju tek u izuzetno visokim koncentracijama (koje daleko nadmašuju terapijske).

8. Literatura

1. Adams, R.H., 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edition (Iowa University Press, Ames, IA), 947-980.
2. Alva-Valdes, R., Wallace, D.H., Foster, A.G., Ericsson, G.F., Wooden J.W., 1989. Efficacy of an in-feed ivermectin formulation against gastrointestinal helminths, lungworms, and sarcoptic mites in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50(8), 1392-1395
3. 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
4. Ayoade, G.O., Adejinmi, J.O., Abiola, J.O., Lucas, F., 2003. Efficacy of some anthelmintics used in porcine practice in Ibadan – Nigeria. *African Journal of Biomedical Research*, 6, 109-110
5. Barth, D., Rehbein, S., Reid, J.F.S., Barrick, R.A., 1996. Efficacy of an in-feed formulation of ivermectin against adult worms and somatic larvae of *Strongyloides ransomi*. *Veterinary Parasitology*, 65, 89-97
6. 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
7. Bjørn, H., Roepstorff, A., Waller, P.J., Nansen, P., 1990. Resistance to levamisole and cross-resistance between pyrantel and levamisole in *Oesophagostomum quadrispinulatum* and *Oesophagostomum dentatum* of pigs. *Veterinary Parasitology*, 37(1), 21-30
8. Bogan, J.A., Marriner, S.E., Galbraith, E.A., 1982. Pharmacokinetics of levamisole in sheep. *Research in Veterinary Science*, 32(1), 124-126
9. Borgsteede, F.H.M., Gaasenbeek, C.P.H., Nicoll, S., Domangue, R.J., Abbott, E.M., 2007. A comparison of the efficacy of two ivermectin

- formulations against larval and adult *Ascaris suum* and *oesophagostomum dentatum* in experimentally infected pigs. *Veterinary Parasitology*, 146, 288–293
10. Bouche, N., Fromm, H., 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in plant science*, 9(3), 110-115
 11. Bowman, W.C., 2006. Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology*, 147, S277–S286
 12. Burrows, R.B., 1958. The anthelmintic effect of bephenium on *Ancylostoma caninum*. *Journal of Parasitology*, 607-610
 13. 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
 14. Canga G.A., Prieto S.A., Liebana M., Martinez F.N., Vega S.M., Garcia Vieitez J.J., 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, 179, 25–37
 15. 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
 16. Chavhan, P.B., Bodkhe, A.M., Majed, M.A., Bobde, S.P., Khan, L.A., Suryawanshi, P.R., Salunkhe, S.C., 2009. Efficacy of ivermectin against *Ascaris suum* in swine. *Veterinary World*, 2(6), 228
 17. Coccini, T., Candura, S.M., Manzo, L., Costa, L.G., Tonini, M., 1993. Interaction of the neurotoxic pesticides ivermectin and lindane with the enteric GABA_A receptor-ionophore complex in guinea pig. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 248(1), 1-6

18. 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
19. Copp, F.C., Standen, O.D., Scarnell, J., Rawes, D.A., Burrows, R.B., 1958. A new series of anthelmintics. *Nature*, 181(4603), 183
20. Currie, J.B., Harumal, P., McKinnon, M., Walton, F.S., 2004. First documentation of *in vivo* and *in vitro* ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 8-12
21. 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
22. Drag, M.D., Green, S.E., Howser, R.A., Wallace, D.H., Cox, J.L., Barrick, R.A., 1998. Efficacy of an in-feed formulation of ivermectin against somatic larvae of *Strongyloides ransomi* in pregnant swine. *American Journal of Veterinary Research*, 59(3), 277-9
23. EMEA/MRL/531/98-FINAL, 1999. Piperazine, Summary report (1)
24. Enan, E.E., 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 309-321
25. Encalada Mena, A.L., Ma. Eugenia López Arellano, Pedro Mendoza de Gives, Enrique Liébano Hernández, Víctor Vázquez Prats, Gerardo Vera Ycuspinera, 2008. First report in Mexico on ivermectin resistance on naturally infected calves with gastrointestinal nematodes. *Veterinaria México*, 39(4), 423-428
26. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2007. Ivermectin (*Ivermectinum*), 2496-2498
27. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2007. Moxidectin (*Moxidectinum ad usum veterinarium*), 2448-2451
28. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2007. Piperazine hydrate (*Piperazinum hydricum*), 2696-2697

29. Fiel, A.C., Saumell, A.C., Steffan, E.P., Rodriguez, M.E., 2001. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 97, 211-217
30. Fox, L.M., 2006. Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19, 588-593
31. Furness, J.B., Trussell, D.C., Pompolo, S., Bornstein, J.C., Maley, B.E., Storm-Mathisen, J., 1989. Shapes and projections of neurons with immunoreactivity for gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research*, 256, 293-298
32. Galtier, P., Escoula, L., Alvinerie, M., 1983. Pharmacokinetics of [³H]levamisole in pigs after oral and intramuscular administration. *American Journal of Veterinary Research*, 44(4), 583-587
33. 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
34. Gou, Z., Wang, X., Wang, W., 2012. Evolution of neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, glutamate and their receptors. *Zoological Research*, 33, E75-E81
35. Greco, W.R., Faessel, H., Levasseur, L., 1996. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(11), 699-700
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., Krogsgaard-Larsen, P., Nielsen, L., Walker, R.J., 1989. GABA receptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode, *Ascaris suum*: stereoselectivity indicates similarity to a GABA_A-type agonist recognition site. *British Journal of Pharmacology*, 98, 841-850

38. 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
39. 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
40. 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, e499
41. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: *Levamisoli hydrochloridum* – Levamisole hydrochloride
42. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: *Pyranteli embonas* – Pyrantel embonate
43. International Pharmacopoeia, 2011. 4th edition, Monographs: Pharmaceutical substances: *Bephenii hydroxynaphthoas* – Bephenium hydroxynaphthoate
44. IPCS INCHEM, Levamisole, WHO Food Additives Series 27
45. IPCS INCHEM, Levamisole, WHO Food Additives Series 33
46. IPCS INCHEM, Moxidectin, WHO Food Additives Series 36
47. IPCS INCHEM, Nicotine (PIM 373)
48. 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

49. Jayewardene, G., Ismail, M.M., Wijayaratanam, Y., 1960. Bephenium hydroxynapehthoate in treatment of ascariasis. *British Medical Journal*, 268-271
50. Jessen, K.R., Mirsky, R., Hills, J., 1987. GABA as an autonomic neurotransmitter. Studies on intrinsic GABA-ergic neurons in the myenteric plexus of the gut. *Trends in neurosciences*, 10, 255-258
51. Jin, T., 2010. Near-Infrared Fluorescence Detection of Acetylcholine in Aqueous Solution Using a Complex of Rhodamine 800 and *p*-Sulfonato-calix[8]arene. *Sensors*, 10(3), 2438-2449
52. Jorgensen, E.M., 2005. GABA. (www.wormbook.org)
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. Keiser, J., Shu-Hua, X., Chollet, J., Tanner, M., Utzinger, J., 2007. Evaluation of the In Vivo Activity of Tribendimidine against *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, and *Opisthorchis viverrini*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51, 3, 1096-1098
58. Klafke, M.G., Sabatini, A.G., de Albuquerque, A.T., Martins, J.R., Kemp, H.D., Miller, J.R., Schumaker, T.S., 2006. Larval immersion tests with

- ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142, 386–390
59. 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
60. Köhler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336–345.
61. Krause, R.M., Buisson, B., Bertrand, S., Corringer, P.J., Galzi, J.L., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1998. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology*, 53(2), 283–294
62. 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
63. Lukasiewicz, P.D., 1996. GABA_C receptors in the vertebrate retina. *Molecular Neurobiology*, 12(3), 181–194
64. Marr, J.J., Nilsen T.W., Komuniecki R.W., 2003. *Molecular medical parasitology*, Academic press, London, 359–384
65. Martin, R.J., Clark, C.L., Trailovic, 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
66. 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.
67. 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

68. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 1982. twenty-eight edition, The pharmaceutical press London, 88
69. Martins, J., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Veterinary Record*, 149, 64.
70. 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
71. Milić, M., Divljaković, J., Rallapalli, S., van Linn, M.L., Timić, T., Cook, J.M., Savić, M.M., 2012. The role of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behavioural Pharmacology*, 23(2),191-7
72. Molander, L., Lunell, E., 2001. Pharmacokinetic investigation of a nicotine sublingual tablet. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56(11), 813-819
73. Molento, M.B., Prichard, R.K., 1999. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, 85, 1007-1011
74. Morovjan, G., Csokan, P., Makranszki, L., Abdellah-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
75. 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
76. 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
77. 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
78. Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Hutchens, D.E., 2000. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 482-483
79. Perez-Cogollo, C.L., Rodriguez-Vivas, I.V., Ramirez-Cruz, T.G., Miller, J.R., 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168, 165-169
80. 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
81. Plumb, D.C., 2002. *Veterinary Drug Handbook*, 4th edition, Iowa State University Press/Ames, 1205-1208
82. Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54, 259-268
83. Puttacharya, S., Trailovic, 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
84. 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
85. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K., 2005. *Farmakologija*, peto izdanje (prvo srpsko izdanje), 137-142

86. Rayes, D., De Rosa, M.J., Bartos, M., Bouzat, C., 2004. Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36372-36381.
87. 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
88. Robertson, A.P., Clark, C.L., Burns, T.A., Thompson, D.P., Geary, T.G., Trailovic, 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
89. Robertson, A.P., Martin, R.J., 2007a. Ion-channels on parasite muscle: pharmacology and physiology. *Invertebrate Neuroscience*, 7, 209-217.
90. Robertson, A.P., Martin, R.J., 2007b. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology*, 134, 1093-1104.
91. Roepstorff, A., Bjørn, H., Nansen, P., 1987. Resistance of *Oesophagostomum spp.* in pigs to pyrantel citrate. *Veterinary Parasitology*, 24(3-4), 229-239
92. 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
93. Sangster, N.C., Gill, J., 1999. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. *Parasitology Today*, 15(4), 141-146
94. 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

95. Shu-Hua, X., Hui-Ming, W., Tanner, M., Utzinger, J., Chongc, W., 2005. Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China. *Acta Tropica*, 94, 1–14
96. Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., Verheij, M., Legrand, P., Bertrand, D., Bertrandg, S., Dougherty, D.A., de Esch, I.J.P., Corringer, P.J., Sieghart, W., Lummis, S.C.R., Ulens, C., 2012. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *PNAS Early Edition*, 1-7
97. 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
98. Trailović, S., 2001. Ispitivanje mehanizama neurotoksičnog delovanja ivermektina. *Doktorska disertacija*, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
99. Trailović, S.M., Nedeljković, J., 2011. Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *Journal of veterinary medical science*, 73(5), 591–599
100. 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.
101. Trailovic, S.M., Ivanovic, S.R., Varagic, V.M., 2011. Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. *Research in Veterinary Science*, 91, 426–433
102. 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.
103. Trailovic, 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
104. Varagić, V.M., Milošević, M.P., 2008. *Farmakologija*, 22. prerađeno i dopunjeno izdanje, Elit Medica
105. 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
106. 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

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Ивановић Р. Саша

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Компаративно испитивање механизма антипаразитског и токсичног дејства габаергичких и холинергичких антихелминтика

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 11.10.2013.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивановић Р. Саша

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Компаративно испитивање механизма антипаразитског и токсичног дејства габаергичких и холинергичких антихелминтика

Ментор _____ Проф др Траиловић М. Саша



Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 11.10.2013.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Компаративно испитивање механизма антипаразитског и токсичног дејства габаергичких и холинергичких антихелминтика

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 11.10.2013.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

BIOGRAFIJA

Saša Ivanović rođen je 25.04.1969. godine u Šapcu, gde je završio osnovnu školu. Srednju školu završio je u Leskovcu. Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu završio je 21.07.1999. godine sa prosečnom ocenom 8,17. Po završetku studija obavio je pripravnički staž na Katedri za farmakologiju i toksikologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, a zatim na istoj katedri radio kao stručni saradnik do 2005. godine, kada je izabran u zvanje asistenta-pripravnika. Poslediplomske magistarske studije iz naučne oblasti Patologija i terapija životinja, završio je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,70. Magistarski rad pod naslovom „Ispitivanje razvoja tolerancije na diazinoin kod pacova“ odbranio je 18.06.2009. godine na Katedri za farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Učestvovao je na nekoliko projekata koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije. Član je Srpskog farmakološkog društva od 2009. godine.