

3
4
5 **IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

6
7 **I PODACI O KOMISIJI:**

8
9 1. **Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:** 17.04.2019. godine Nastavno-naučno
10 veće Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

11
12 2. **Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže**
13 **naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,**
14 **ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:**

15 **Napomena:** redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih
16 institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upisuje
17 pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.

18
19
20 Saša Trailović, redovni profesor, farmakologija i toksikologija, 2013, Fakultet veterinarske
21 medicine, Univerzitet u Beogradu.

22
23 Mirjana Milovanović, vanredni profesor, farmakologija i toksikologija, 2017, Fakultet
24 veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.

25
26 Zoran Todorović, redovni profesor, farmakologija i toksikologija, 2008, Medicinski fakultet,
27 Univerzitet u Beogradu.

28
29
30 **II PODACI O KANDIDATU:**

31
32 1. **Ime, ime jednog roditelja, prezime:** Đorđe (Slobodan) Marjanović

33
34 2. **Datum rođenja, opština, Republika:** 27.04.1988. god. Valjevo, Srbija.

35
36 3. **Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:**

37
38 4. **Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:**

39
40 **III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:**

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

44
45 **IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,**
46 **grafikona i sl.):**

47 Doktorska disertacija Đorđa Marjanovića je napisana na 148 stranica, i sastoji se iz 8
48 poglavlja: Uvod 1-4 str., Pregled literature 5-39 str., Cilj i zadaci istraživanja 40-41 str.,
49 Materija i metod 42-52 str., Rezultati 53-105 str., Diskusija 106-129 str., Zaključci 130-135
50 str. i Spisak referenci 136-148 str.

51 U disertaciji je prezentirano 36 tabela i 60 slika (od toga 16 slika-reprodukcija, 21
52 grafik i 23 originalna zapisa kontrakcija nervno-mišićnog preparata *Ascaris suum* ili nervno-
53 mišićnog preparata dijafragme i ileuma pacova).

54
55 **V VREDNOVANJE POJEDINIHI DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
56 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
57 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda - nije ograničeno, rezultata –**
58 **nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u**
59 **doktorskoj disertaciji):**

1 **Uvod:** U uvodu kandidat ukazuje na učestalost, značaj i specifičnosti parazitskih infekcija
2 ljudi i životinja, opisuje karakteristike parazitskih nematoda i kratko analizira posledice
3 nematodnih infekcija. Uvod sadrži pregled najvažnijih činjenica, saznanja i problema
4 antinematodne terapije, direktno vezanih za istraživanja sprovedena u ovoj disertaciji. Nervni
5 sistem nematoda kandidat označava kao glavno ciljno mesto delovanja antihelminatika, lekova
6 koji se koriste u preveniranju i lečenju infekcija parazitskim nematodama. Ovi lekovi su
7 podeljeni u nekoliko grupa a velika većina upravo deluje na nematodni neuromišićni sistem.
8 Kandidat navodi grupe lekova, njihove najvažnije predstavnike koji se nalaze u upotrebi u
9 veterinarskoj i humanoj medicini i ukratko opisuje njihove mehanizme dejstva. Poseban osvrt
10 je u Uvodu posvećen karakteristikama nervnomišićnog sistema nematoda i to na primeru
11 parazitske nematode *Ascaris suum*, koja je jedan od najboljih modela za ispitivanja
12 antinematodnih lekova. Komparativno, kandidaat analizira fiziološke/farmakološke razlike u
13 odnosu na inervaciju mišićnih ćelija i fiziologiju kontrakcija mišića sisara. Ova analiza je
14 posebno važna sa stanovišta procene selektivne toksičnosti antihelminatika. U posebnom delu
15 teksta opisani su najvažniji problemi vezani za farmakoterapiju nematodnih infekcija, pre
16 svega sve viši nivo rezistencije parazita na postojeće konvencionalne lekove, problemi
17 ispoljavanja toksičnosti posle povećanja doza ili ponovne aplikacije i dugačak period karence.
18 Kao novi izvor supstanci sa antiparazitskim svojstvima kandidat ove disertacije navodi
19 esencijalna biljna ulja. Esencijalna biljna ulja (ili njihovi aktivni principi) su bezbedni za
20 upotrebu i potencijalno atraktivna alternativa aktuelnim antiparazitskim lekovima. Posebno se
21 ističe koncept biljnog funkcionalnog hraniva za životinje, koje može biti primenjeno protiv
22 infekcija endoparazitima u cilu da zameni ili da potencira efekat klasične terapije
23 antihelminicima.

24
25 **Pregleda literature:** Sastoji se iz 8 poglavlja u kojima kandidat prezentira podatke iz
26 literature relevantne za njegovo istraživanje. Prvo poglavlje: Antiparazitski efekat aktivnih
27 principa esencijalnih biljnih ulja počinje kratkim uvodom o parazitskim infekcijama ljudi i
28 životinja i razlozima zbog kojih su aktivni sastojci esencijalnih biljnih ulja potencijalna
29 alteraniva klasičnim antinematodnim lekovima. Biljke stvaraju esencijalna ili eterična ulja kao
30 organske produkte sekundarnog metabolizma. Smatra se da su esencijalna ulja (odnosno
31 njihovi aktivni principi) na osnovu farmakoloških karakteristika (antimikrobnih, antiparazitskih,
32 uticaja na imunski sistem i dr.) potencijalno najozbiljniji alternativni lekovi i biocidi. Kandidat
33 prikazuje poreklo i podelu aktivnih sastojaka biljnih ulja i ističe da najviše podataka o
34 antinematodnom dejstvu u literaturi ima o njihovim terpenoidnim sastojcima. Terpenoidi ili
35 terpeni privlače najveću pažnju u odnosu na farmakološka svojstva koja poseduju i ujedno
36 predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka. Postoje i istorijski dokazi da je
37 početkom dvadesetog veka, timol - glavna komponenta etarskog ulja majčine dušice (*Thimus*
38 *vulgaris* L.) korišćen za lečenje askaridoze i ankilostomijaze ljudi. U daljem tekstu opisana su
39 ispitivanja antinematodne efikasnosti nekih esencijalnih ulja ili njihovih aktivnih sastojaka
40 (geraniola, citronelola, citrala, karvakrola, cinamaldehyda, eugenola i drugih) protiv parazitskih
41 nematoda biljaka i životinja. Kandidat posebno ističe da za razliku od relativno brojnih
42 podataka o antinematodnim dejstvima aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja, istraživanja
43 njihovih mehanizmima dejstva gotovo nema. Jedina studija koja pokušava da objasni
44 mehanizam antinematodnog dejstva biljnih terpenoida, odnosi se na njihovu interakciju sa
45 tiraminskim receptorima nematoda (TyrR). Studija pokazuje da timol i karvakrol stupaju u
46 interakciju sa TyrR i da bi nematocidna aktivnost timola i karvakrola mogla biti posredovana
47 kroz nishodnu signalnu kaskadu regulacije ovih receptora. U ovom poglavlju prikazni su i
48 podaci o toksičnosti biljnih terpenoida za sisare, koja je presudna za procenu selektivnosti
49 novih farmakoloških efekata. Naredna četiri poglavlja posvećena su biljnim terpenoidima
50 karvakrolu, karveolu, mentolu i timolu. Kandidat je ove terpenoide označio kao glavne
51 kandidate za potencijalne biljne antihelminike, detaljno prezentirajući njihova hemijska,
52 fizička, farmakološke i toksikološka svojstva. Naredno poglavlje nosi naslov Morfologija i
53 fiziologija nematoda na primeru parazita *Ascaris suum* i slobodnoživeće nematode
54 *Caenorhabditis elegans*. Kandidat citira podatke o morfološkoj i fiziološkoj strukturi nematoda
55 (jedne parazitske i druge slobodnoživeće) opisujući njihov značaj kao modela u
56 biomedicinskim istraživanjima i ispitivanjima antiparazitskih lekova. Evolutivno konzervirani
57 osnovni mehanizmi razvoja tkiva, starenja, uzroka degenerativnih promena i dr. omogućavaju
58 primenu nematoda kao alternativnih eksperimentalnih modela u istraživanjima značajnim za
59 sisare. Kandidat daje pregled primene *C. elegans* u istraživanjima razvoja kancera,
60 apoptoze, etiologije Alchajmerove bolesti, mišićne distrofije i dr. Sa druge strane ove dve

1 nematode su gotovo idealni modeli za ispitivanja antinematodnih lekova. Kandidat kroz
2 literaturne podatke prikazuje morfološke i fiziološke karakteristike neuromišićnog sistema
3 nematoda i analizira razlike u odnosu na sisare. Naredno poglavlje nosi naslov Struktura
4 holinergičkih i GABA receptora sisara i nematoda. Ovi receptori su glavna ciljna mesta
5 delovanja konvencionalnih antinematodnih lekova. Prikazan je osvrt na specifičnosti
6 receptora kod nematoda, njihove farmakološke karakteristike i potencijalna mesta delovanja
7 novih antinematodnih lekova. Kroz prikaz specifičnosti receptorskog sistema nematoda,
8 odgovornog za regulaciju neuromišićne funkcije i lokomociju, kandidat prezentira postojeća
9 saznanja o mehanizmima dejstva antinematodnih lekova i analizira potencijalne mehanizme
10 razvoja rezistencije parazita. Komparacijom sa karakteristikama holinergičkih i GABA
11 receptora sisara objašnjena je selektivna toksičnost antihelmintika. Poslednje poglavlje
12 nazvano je Antinematodni lekovi u kome su prezentirane farmakološke karakteristike
13 tertahidropirimidina (pirantel i morantel), kvaternarnih amonijumovih soli (befinijuma) i
14 aminoacetonitrila (monepantel). Kandidat iznosi literaturne podatke i obrazlaže mehanizme
15 njihovog dejstva na nikotinski acetilholinski receptor (nAChR) nematoda kao razlog za dalja
16 ispitivanja interakcije sa odabranim aktivnim sastojcima esencijalnih biljnih ulja sprovedena u
17 ovoj disterciji.

18 Pregled literature je napisan sistematično, jasno i precizno. Omogućava potpuno
19 razumevanje problematike koju obrađuje disertacija, citira adekvatnu literaturu i pruža
20 dovoljno argumenata da bi se jasno razumeli postavljeni ciljevi istraživanja.

21
22 **Cilj i zadaci istraživanja:** Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je da se ispita
23 potencijalno antinematodno dejstvo odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih
24 principa esencijalnih biljnih ulja i utvrdi mehanizam kojim oni ostvaruju antiparazitski efekat.
25 Kandidat ističe da brojna istraživanja ukazuju da su esencijalna biljna ulja, odnosno njihovi
26 aktivni sastojci bezbedni za primenu kod ljudi i životinja i potencijalno atraktivna alternativa
27 postojećoj antiparazitskoj terapiji. Biljke stvaraju esencijalna ili eterična ulja kao organske
28 produkte sekundarnog metabolizma. Aktivni principi esencijalnih biljnih ulja su zavisno od
29 prekursora primarnog metabolizma iz koga nastaju i različitog metaboličkog puta podeljeni na
30 terpenoide, fenilpropanoide, steroide i alkaloidne. Posebnu pažnju privlače monoterpenoidi:
31 karvakrol, karveol, alfa-pinen, mentol, timol, zatim diterpenoidi: kahveol i karnozol kao i
32 fenilpropanoid cinamaldehyd, kod kojih se među brojnim biološkim efektima spominje i
33 njihovo antiparazitsko dejstvo.

34 Zadatak istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje interakcije aktivnih principa
35 etarskih biljnih ulja sa holinergičkim i GABA-ergičkim receptorima nematoda. Kandidat ističe
36 da pojedine konvencionalno korišćene supstance (avermektini) pored delovanja na nervno-
37 mišićni sistem nematoda, deluju i na farinks, odnosno faringijalno pumpanje. Upravo zbog
38 toga kandidat postavlja za cilj da se ispita dejstvo aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na
39 kontrakcije farinksa nematode *C. elegans*.

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

44 Za cilj istraživanja kandidat postavlja da se ispituju potencijalni antinematodni efekti
45 odabranih biljnih terpenoida, za koje u literaturi postoje podaci (ili za etarska ulja u čijem su
46 sastavu) da imaju izvesna antiparazitska svojstva. Posle preliminarnih testova na izolovanom
47 nervnomišićnom preparatu, jedinjenja sa jasno ispoljenim antinematodnim dejstvom dalje su
48 ispitivana u cilju definisanja preciznog mehanizma antiparazitskog efekta. Jedan od ciljeva
49 istraživanja bio je da se proceni selektivnost dejstva biljnih terpenoida i njihova bezbednost
50 za domaćina. Komparacijom farmakoloških efekata na izolovanim neuromišićnim
51 preparatima nematoda i sisara previđeno je da se definišu efektivne antinematodne, ali i
52 istovremeno bezbedne koncentracije aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja za potencijalnu
53 kliničku primenu. Kandidat postavlja sledeće konkretne zadatke istraživanja u ovoj doktorskoj
54 disertaciji:

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

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

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

1 -dejstvo na GABA receptor.
2 -Da se ispita interakcija odabranih biljnih terpenoida sa najnovijim antinematodnim lekovima
3 derivatima aminoacidonitrila (monepantel).
4 -Da se ispita dejstvo odabranih biljnih terpenoida na faringealno pumpanje nematoda i
5 stepen preživljavanja *Caenorhabditis elegans*.
6 -Da se analizira selektivnost dejstva odabranih terpenoida na neuromišićnim preparatima
7 sisara (izolovana dijafragma i ileum pacova).
8 -Da se analizira selektivnost dejstva odabranih terpenoida i testira njihov efekat na
9 integrisanost nervnog sistema sisara izvođenjem Rota-rod testa na pacovima.
10 U okviru ove disertacije, svi eksperimenti neophodni za rešavanje postavljenih ciljeva i
11 zadataka, izvedeni su u Laboratoriji za Farmakodinamiku Katedre za Farmakologiju i
12 toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

13
14 **Materijal i metode:** Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji podeljena su u četiri dela. Prvi
15 deo čine ispitivanja na neuromišićnom preparatu velike parazitske nematode svinja *Ascaris*
16 *suum*; Drugi i treći deo istraživanja odnosili su se na utvrđivanje i analizu selektivnosti dejstva
17 odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja i podrazumevali su ispitivanja dejstva
18 odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na periferne nikotinske i muskarinske
19 strukture - izolovana dijafragma i ileum i istraživanja njihovog dejstva na integrisanost
20 nervnog sistema sisara, Rota-rod testom na pacovima; Četvrti deo bila su ispitivanja efekata
21 odabranih aktivnih principa esencijalnih biljnih ulja na preživljavanje i intenzitet faringealnog
22 pumpanja slobodnoživeće nematode *Caenorhabditis elegans* (engl. Wild-type-divlji soj).

23 Istraživanja na neuromišićnom preparatu *Ascaris suum* Parazitska nematoda svinja *Ascaris*
24 *suum* je dopremana u specijalno dizajniranim nerđajućim termosima sa klanica u okolini
25 Beograda (IMES i Ambar) neposredno posle čišćenja creva i prikupljanja u posebno
26 pripremljenom rastvoru - Lockes solution. Sastav Lockes solution je standardizovan i
27 vrednosti su izražene u mM: NaCl 155, KCl 5, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1.5 i glukoza 5. Nematode
28 su u laboratoriji čuvane u istom rastvoru koji je održavan na temperaturi od 32-36°C u
29 vodenom kupatilu. Lockes rastvor je menjan svakih 12 sati, što je omogućavalo da se paraziti
30 iz jedne kolekcije mogu koristiti u ispitivanju kontrakcija najduže 5 dana. U ispitivanjima su
31 korišćene adultne ženke askarisa jer su većih dimenzija i čine većinu u populaciji parazita.
32 Neuromišićni preparat za ispitivanje kontrakcija pripreman je disekcijom prednjeg dela tela
33 parazita 2 do 3 cm kaudalno od glave. Daljim odsecanjem tkiva između dve crvene linije,
34 longitudinalno na telu parazita uvek je dobijan preparat (segment) istih dimenzija (dužine
35 1cm). Isečeni segment askarisa zatim je postavljan u komoru (kupačice) zapremine 20ml, koja
36 je bila ispunjena sa *Ascaris Perienteric Fluid Ringer/APF Ringer* standardnog sastava (mM):
37 NaCl 23, Na-acetat 110, KCl 24, CaCl₂ 6, MgCl₂ 5, glukoza 11, HEPES 5, sa vrednosti pH
38 7.6. Postupak fiksiranja preparata je obavljan tako što je jedan kraj segmenta pričvršćen za
39 kukicu na dnu kupatilca, a drugi deo je koncem zakačen za izometrijski transdjuser koji je
40 preko interfejsa i amplifajera povezan sa PC računaru. Kontinuirano mešanje aplikovanih
41 supstanci u kupatilcu obezbeđeno je stalnim ubrizgavanjem smeše vazduha električnom
42 pumpom, pri čemu kretanje mehurića nije uticalo na kontrakcije jer je jačina mešanja
43 kontrolisana ventilom na crevima koja ubrizgavaju vazduh. Nakon disekcije preparata,
44 postavljanja u kupatilce i povezivanja sa izometrijskim transdjuserom, preparat je
45 mikrometarskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen početnoj tenziji od 0.5-1.0g
46 tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao na oko 0.5g, aplikovane su
47 ispitivane supstance a zatim su praćene i merene kontrakcije. Korišćen je protokol aplikacije
48 rastućih koncentracija ispitivanih supstanci koje su poznate kao agonisti nikotinskog
49 receptora (acetilholin, befinijum, pirantel i morantel) i supstanci za koje smo pretpostavili da
50 će delovati agonistički (mentol i karveol u niskim koncentracijama) ili antagonistički
51 (monepantel, karvakrol, piperazin, GABA, karveol). Nakon dobijanja kontraktinog efekta,
52 supstance su ispirane iz kupatilca u pravilnim vremenskim intervalima. Spontana aktivnost
53 preparata askarisa, njegove kontrakcije izazvane agonistima nikotinskog receptora ili
54 relaksacije izazvane antagonistima ili sa GABA registrovane su preko izometrijskog
55 transdjusera i softvera eLAB 11 i eLAB 44 (EI Unit, Beograd) na PC računaru u realnom
56 vremenu. Dobijeni zapisi su kasnije analizirani, kontrakcije merene i rezultati statistički
57 obrađivani.

58 Istraživanja na neuromišićnom preparatu dijafragme i ileuma pacova Za ispitivanja na
59 izolovanoj dijafragmi i ileumu korišćeni su pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne mase
60 150-200g. Životinje su držane u standardnim uslovima regulisanim EU direktivama i

1 predviđenim za kavezne laboratorijske životinje u grupama od po 5, sa kontrolisanim
2 svetlosnim ciklusom 12-h svetlo/tama i pri temperaturi 21-24°C. Životinje su hranjene
3 propisanom kompletnom peletiranom hranom za pacove (Veterinarski Zavod Subotica) i
4 pojene *ad libitum*. Sve procedure koje su primenjivane u skladu su sa EEC Directive 86/609 i
5 odobrene su od strane Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u
6 Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine-Uprava za veterinu broj 323-
7 07-00771/2017-5. Neophodno žrtvovanje oglednih životinja sprovedeno je neposredno pred
8 ispitivanje, odobrenom standardnom metodom, predoziranje tiopenton-Na u skladu sa
9 propisima Home Office Code of Practice (1997). Odmah po žrtvovanju pristupalo se
10 evisceraciji dijafragme i ileuma. Manipulacija i održavanje izolovanog ileuma i dijafragme
11 pacova u *in vitro* uslovima vršeno je u hranjivom Tyrode rastvoru. Sastav Tyrode rastvora
12 (mM) je sledeći: NaCl 139,9; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,04; NaHCO₃ 11,9; NaH₂PO₄ 0,4 i
13 glukoza 5,5. Postupak pripremanja preparata dijafragme obavljan je tako što se najpre cela
14 dijafragma, na koštanoj osnovi od rebara i grudne kosti, prenese u Tyrode rastvor a zatim se
15 makazama pažljivo odvoje leva i desna hemisfera. Od jedne hemisfere dijafragme, preparat
16 je pripreman tako što je isečen poprečni, centralni deo hemisfere, dužine 10mm i širine 5mm.
17 Isečak je odmah zatim postavljan vertikalno u vodeno kupatilo zapremine 20ml, sa Tyrode
18 rastvorom temperature 37°C, pH vrednosti 7,4. Oksigenacija Tyrode rastvora u vodenom
19 kupatilu za izolovane organe vršena je mešavinom kiseonika i ugljen-dioksida (95% + 5%).
20 Mešanje rastvora gasom u vodenom kupatilu nije uticalo na parametre kontrakcije jer je
21 ventilom na dovodnim crevima vršena precizna kontrola jačine oksigenacije preparata.
22 Prilikom manipulacije, jedan kraj preparata dijafragme koncem je pričvršćen za stalak, dok je
23 drugi pričvršćen za izometrijski transdjuser. Dve platinaste elektrode postavljene su paralelno
24 na razdaljini od 3-4 mm od preparata. Elektrode su povezane sa stimulatorom BioSmart 150
25 (EIUnit, Beograd) koji preko softvera eLAB 44 (EIUnit, Beograd) i PC računara omogućava
26 stimulaciju preparata i beleženje kontrakcija na ekranu računara u realnom vremenu. Pre
27 početka ispitivanja preparat je izložen početnoj tenziji od 0,5g tokom 10-15 minuta. Ovakvo
28 opterećenje ne menja dužinu preparata za više od 1mm. Preparat dijafragme je stimulisan
29 tetaničnim pulsevima, "paketom" od 5 stimulacija svakih 30 sekundi (20μs, 50Hz, 30v, 2s) sa
30 pauzom od 3 do 5 minuta između "paketa". Kontrakcije izazvane poljnom električnom
31 stimulacijom registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera eLAB 44 (EIUnit,
32 Beograd). Merene su maksimalne kontrakcije i eventualna pojava "tetanic fade", odnosno
33 blokade presinaptičkog nikotinskog receptora. Na preparatu izolovanog ileuma pacova, koji je
34 pripreman od preterminalnog dela ileuma postupak je bio sledeći. Isečak dužine 4 do 5cm
35 uziman je na rastojanju od oko 10cm od ileocekalne valvule i odlagan u Tyrode rastvoru.
36 Posle preparisanja (uklanjanje masnog tkiva i čišćenja unutrašnjeg dela creva), segment
37 creva dužine 2cm postavljen je u vodeno kupatilo zapremine 20ml, sa Tyrode rastvorom na
38 temperaturi od 37°C, pH 7,4. Oksigenacija Tyrode rastvora u vodenom kupatilu za izolovane
39 organe vršena je mešavinom kiseonika i ugljen-dioksida (95% + 5%). Prvo je jedan kraj
40 preparata ileuma koncem pričvršćen za stalak, dok je drugi kraj pričvršćen za izometrijski
41 transdjuser, tako da se isečak ileuma nalazio u središnjem delu prostora između dve
42 elektrode. Elektrode izrađene od platine postavljene su sa bočnih strana preparata na
43 razdaljinu od 3-4 mm, povezane sa stimulatorom BioSmart 150 (EIUnit, Beograd). Pre
44 početka ispitivanja, preparat je izložen početnoj tenziji od 0,5 g. Posle postizanja stabilnog
45 početnog tonusa preparat ileuma je stimulisan "paketom" od 5 stimulacija na svakih 60
46 sekundi (2 ms, 100 Hz, 45v, 2s). Posle pauze od 5 minuta i ispiranja, istom preparatu
47 aplikovane su rastuće koncentracije acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100 μM) ili drugih ispitivanih
48 supstanci radi određivanja odnosa doze i efekta. Spontana aktivnost ileuma i njegove
49 kontrakcije izazvane poljnom električnom stimulacijom, odnosno acetilholinom ili drugim
50 supstancama registrovane su preko izometrijskog transdjusera i softvera eLAB 44 (EI Unit,
51 Beograd) na PC računaru.

52 Ispitivanje dejstva karvakrola na nervni sistem pacova izvođenjem Rota-rod testa Ovaj test
53 se koristi kao metoda za ispitivanje koordinacije neuromišićne aktivnosti pacova koji su
54 izloženi dejstvu neke ispitivane supstance. Aparat za Rota-rod test pruža jednostavan način
55 da se testiraju efekti lekova, oštećenja mozga, bolesti koje utiču na motornu koordinaciju ili
56 otpornost na zamor pacova. Životinja se postavlja na rotirajući valjke Rota-rod aparata.
57 Pacovi moraju da zadrže ravnotežu na rotirajućem valjku ukoliko im nije ugrožena
58 koordinacija nervnog i mišićnog sistema. Kada životinja padne sa valjka u svojoj koloni,
59 automatski se snima vreme kašnjenja (minute i sekunde) i brzina rotacije pokretnog valjka.
60 Parametri koji se regulišu i ispituju su brzina rotirajućeg valjka, koja se izražava kao RPM (1-

1 100) i vreme rotiranja i kretanja pacova koje se izražava u MIN (1-100). Izmenjivi gornji
2 separator za pacove sprečava uticaj između životinja koje se kreću u susednim trakama. Rad
3 Rota rod aparata kontroliše se naprednim mikroprocesorom koji obezbeđuje preciznu
4 regulaciju vremena okretanja i izuzetno preciznu regulaciju brzine. Dobijeni podaci se grupišu
5 i čuvaju u tabelama. Prečnik rotirajućeg valjka iznosi 5 cm. Na valjku se nalaze četiri
6 pregradne komore na kojima ima mesta za po jednog pacova. Istovremeno se meri kretanje
7 4 jedinke koje se stavljaju na valjak. Na aparatu postoji digitalna kontrola parametara, a
8 ukoliko se poveže sa računarnom, postoji i softverska kontrola pomoću programa RotaSoft
9 (EIUnit, Beograd). Procedura izvođenja ispitivanja je sledeća: sedam dana pre ispitivanja
10 pacovi se treniraju kako bi bili sposobni da se održe na rotirajućem valjku pod zadatim
11 parametrima rotacije bez padova. Parametri koje smo koristili bili su 15 RPM i vreme od 5
12 MIN. Svi pacovi su podeljeni u kaveze u 6 grupa sa po 6 životinja. Pacovi su trenirani dva
13 puta dnevno pre hranjenja kompletnom peletiranom hranom (Veterinarski Zavod Subotica)
14 predviđenom za ovu vrstu ogleđnih životinja. Vodu su dobijali *ad libitum*. Četiri grupe su bile
15 ogleđne, a dve kontrolne. Na dan izvođenja ispitivanja pacovi nisu hranjeni, kavezi su
16 stavljeni u prostoriju za izvođenje ispitivanja 15 minuta pre početka testa. Svaka životinja je
17 izmerena da bi se odredila doza ispitivane supstance. Ispitivanu supstancu (karvakrol)
18 aplikovali smo peroralno u dozama 200, 300, 400 i 500 mg/kg telesne mase, dok je kontrolna
19 supstanca (diazepam) aplikovana intraperitonealno u dozi od 3 mg/kg telesne mase pacova.
20 Nakon aplikacije supstanci obavljan je test u pravilnim vremenskim intervalima. Tako je prvo
21 testiranje izvedeno nakon 30 minuta od momenta aplikacije, a drugo testiranje nakon 90
22 minuta. Tabelarno su prikazani rezultati testa sa brojem padova pojedinačno po grupama i
23 ukupan broj padova na testu po vremenskim intervalima.

24 Ispitivanje uticaja timola i karvakrola na stepen preživljavanja i faringealno pumpanje
25 Caenorhabditis elegans Eksperimentalni deo ovog ispitivanja je izveden u Laboratoriji za
26 Farmakodinamiku Katedre za Farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine
27 Univerziteta u Beogradu, dok je deo ispitivanja koji obuhvata pripremu, razlivanje i inokulaciju
28 podloga urađen u laboratoriji za Mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine. Univerziteta
29 u Beogradu. *Kultura Caenorhabditis elegans*: Materijal za ogleđ bila je laboratorijska kultura
30 *Caenorhabditis elegans*. Divlji tip (eng. wild type) ove nematode se uzgaja za potrebe
31 projekta TR 31087 i to prvi put u Srbiji i u ovom delu Evrope. Treba napomenuti da se za
32 uzgajanje ove specifične neparazitske nematode moraju stvoriti posebni uslovi. Sveže kulture
33 su dobijene presejavanjem na odgovarajućem medijumu sa inokulacijom posebnog soja
34 bakterije *Escherichia coli* OP50. Reproductivni ciklus *C. elegans* kontroliše se temperaturnim
35 uslovima u inkubatoru. Na temperaturi od 20°C, ploče se pesejavaju svaka 4 dana kako ne bi
36 došlo do prerastanja ploča adultnim oblicima ove nematode i da bi na ploči bilo dovoljno
37 hrane i za larvene oblike. *Escherichia coli* OP50: Kao izvor hrane u laboratorijskim uslovima
38 za *C. elegans* koristi se soj *E. coli* OP50 koja je uracil deficitarna. Usled nemogućnosti da
39 metaboliše uracil, navedeni soj tokom inkubacije u ogleđu ne prerasta podlogu ni nematode,
40 pa samim tim se eliminiše nespecifični uticaj na viabilnost *C. elegans*. Nakon razlivanja
41 podloga u Petrijevu ploču inokulisano je po 100 µl bakterijske kulture *E. coli* u turbiditetu od
42 0.5 McFarland jedinica (1-2x10⁸ cfu/ml). Inokulusane ploče su nakon 24 h na 37°C inkubacije
43 u aerobnim uslovima korišćene za dalje presejavanje *C. elegans*. Podloga: Za uzgajanje *C.*
44 *elegans* korišćena je gotova podloga Nematode Growth Medium NGM (US Biological, Life
45 Sciences, SAD). Podloga je pripremljena rastvaranjem prema preporuci proizvođača (23 g) u
46 1 litar destilovane vode uz kuvanje na 100°C do rastvaranja. Rastvorena podloga je
47 sterilisana u autoklavu (Rypa, Španija) 15 min na 121°C, a zatim prohlađena u vodenom
48 kupatilu (Sutjeska) na 50°C u trajanju od pola sata. U prohlađenu podlogu su dodavani
49 odvojeno rastvori pufera. Ovako pripremljena podloga je razlivena u Petrijeve ploče za
50 održavanje kulture. Za potrebe presejavanja, izliveno je po 5ml podloge u Petri ploče
51 dijametra 60mm, dok je za potrebe izvođenja ogleđa razliveno po 2.5 ml podloge u Petri
52 ploče prečnika 30mm. Uzgoj C. elegans i presejavanje: U ovom radu je korišćen metod
53 prenošenja pojedinačnih jedinki metalnom ezom. Ceo proces presejavanja je obavljan u
54 digestoru (BIOBASE Fume hood, NRK), nakon dezinfekcije UV svetlom, kada je izvođen
55 transfer nematoda sa Petri šolja koje su imale adulte na Petri šolje sa NGM agarom za dalja
56 ispitivanja. Metoda izvođenja ogleđa preživljavanja: Izdvajanje C. elegans iz podloge i
57 priprema za ogleđ. Podloga u Petrijevim pločama sa zrelim adultnim oblicima *C. elegans*
58 isečena je na kvadrate 3x3 mm i prebačena u staklene kivete, a potom je dodat fiziološki
59 rastvor u zapremini od 2 ml. Maceriranjem NGM podloge pospešen je izlazak nematoda u
60 tečnu fazu. Kivete sa maceriranim nematodama centrifugirane su na 2500 obrtaja (Lace 24,

1 Colo centrifuge, NRK) u trajanju od 4 min, a zatim je 400 μ l suspenzije supernatanta
2 prebačeno u čistu kivetu. Nakon ponovnog centrifugiranja od 2000 obrtaja u trajanju od 1
3 minuta, po 20 μ l suspenzije nematoda u fiziološkom rastvoru je inokulisano u ogledne
4 Petrijeve ploče prečnika 30 mm.

5 *Priprema oglednih ploča i priprema ispitivane supstance* Timol i karvakrol su rastvoreni u
6 alkoholu, a potom u vodi, tako da je dobijen radni rastvor gde količina apsolutnog alkohola ne
7 prelazi 0.1 % v/v. Radni rastvori koncentracija timola i karvakrola od 10, 100, 1000 i 10000nM
8 pripremljeni su rastvaranjem u destilovanoj vodi, a zatim je dodavan NGM agar pripremljen
9 prema uputstvu proizvođača. Nakon mešanja agara i radnih rastvora timola i karvakrola
10 dobijene su konačne ogledne Petrijeve ploče sa NGM agarom koji je sadržao 1, 10, 30, 100,
11 300 i 1000 nM timola i isto toliko karvakrola. Ploče bez dodatih aktivnih principa biljnih ulja
12 korišćene su kao kontrola. Sve ploče su pripremljene u triplikatu. *Inkubacija i brojanje* Nakon
13 pripreme oglednih i kontrolnih ploča u njih su inokulisane nematode. Ploče su ostavljene u
14 termostatu (Memmert IN30, Nemačka) na 20°C u trajanju od 24 h. Nakon inkubacije, ploče su
15 posmatrane pod invertirnim mikroskopom (Motic AE 31, NRK) i rezultat je zabeležen kamerom
16 (MOTICAM 5MP, NRK). U ispitivanju smo pratili stepen preživljavanja nematoda u
17 podlogama sa i bez aktivnih principa etarskih ulja. Praćen je dozno-zavisni stepen
18 preživljavanja nematoda u podlogama posle 24 i 48 sati inkubacije.

19 *Softverski i hardverski regulisani sistemi za ispitivanja kontrakcija izolovanih organa i*
20 *ispitivanje neuromišićne koordinacije sisara* Kandidat je detaljno opisao mogućnosti i
21 karakteristike sistema za ispitivanja na izolovanim organima i hardvera i softvera za Rota rod
22 test koji su korišćeni u izradi ove doktorske disertacije.

23 *Ogledne supstance i hemikalije korišćene u radu* Kandidat je naveo sve supstance i
24 rastvarače koje je koristio u istraživanjima, kao i njihove proizvođače.

25 *Statistička analiza rezultata* Obavljena je programom Graph Pad Prism, Version 6.0 (San
26 Diego, Ca, USA). Razlike između serija rezultata poređene su t-testom (parni), analizom
27 varijanse (ANOVA), odnosno Tukey-testom, dok je dozna zavisnost dobijenih efekata
28 analizirana nelinearnom regresijom i određivanjem srednjih efektivnih koncentracija (EC_{50})
29 odnosno srednjih efektivnih doza (ED_{50}).

30
31 **Rezultati:** U ovom delu doktorata kandidat prikazuje dobijene rezultate i to tekstem, u 36
32 tabela, 23 grafika i 23 reprezentativna originalna zapisa kontrakcija nervnomišićnih
33 preparata *Ascaris suum*, izilovane dijafragme i ileuma pacova. Prvo poglavlje je nazvano
34 *Ispitivanje dozno-zavisnog dejstva odabranih biljnih mono i diterpenoida na kontrakcije*
35 *neuromišićnog preparata Ascaris suum* Kandidat navodi da je u preliminarnim ispitivanjima
36 testiran veći broj terpenoidnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja na neuromišićnom preparatu
37 *A. suum*. Testirane su koncentracije od 1 do 300 μ M biljnih monoterpenoida: alfa-pinena i p-
38 cimena, diterpenoida: kahveola i karnozola kao i fenilpropanoida cinamaldehida. Međutim,
39 nikakvi farmakološki efekti na kontakciju *A. suum* nisu zabeleženi, pa ovi rezultati nisu
40 prikazani u disertaciji. U daljem tekstu disertacije prikazani su samo rezultati dejstva
41 terpenoida koji su ispoljili jasne farmakološke efekte na primenjenim modelima: karvakrola,
42 karveola, mentola i timola. Istraživanje je započelo ispitivanjem dozno-zavisnog efekta
43 acetilholina (ACh) na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* i određena je vrednost
44 njegove srednje efektivne koncentracije (EC_{50}). Testirane su rastuće koncentracije ACh od 1,
45 3, 10, 30 i 100 μ M i izmeren je njihov maksimalni kontraktilni efekat. Vrednosti kontrakcija
46 izražene su u apsolutnim jedinicama, gramima (g) kao i u svim narednim ispitivanjima. ACh
47 je endogeni agonist nAChR nematoda i njegovom aplikacijom dobijaju se kontrakcije koje
48 odgovaraju fiziološkoj stimulaciji nervnomišićnog sistema. Ovakva metoda omogućava
49 ispitivanje uticaja različitih hemijskih agenasa na kontraktilnu sposobnost (samim tim i
50 lokomociju) parazita. U ovom ispitivanju testirano je ukupno 6 preparata iz dve kolekcije
51 askarisa a na osnovu dobijenih rezultata izračunata je vrednost EC_{50} ACh za kontrakcije
52 preparata *A. suum* od 5.66 μ M, sa granicama sigurnosti (95%) 3.93 - 8.14 μ M. Statistički
53 preračunati maksimalni kontraktilni efekat ACh (E_{max}) u ovom ispitivanju iznosio je 2.12g sa
54 granicama sigurnosti (95%) 2.01 g - 2.23 g. Na osnovu preliminarnih rezultata i literaturnih
55 podataka, prvo je ispitano dejstvo terpenoida karvakrola na kontrakcije *A. suum* izazvane
56 acetilholinom. Cilj ispitivanja je bio da se utvrdi mehanizam kojim karvakrol deluje na
57 nervnomišićni preparat askarisa. Protokol testiranja je podrazumevao početnu kontrolnu
58 seriju od 5 kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina (1, 3, 10, 30 i 100
59 μ M), a zatim testiranje uticaja 100 i 300 μ M karvakrola na dozno-zavisni kontraktilni efekat
60 ACh. Na kraju protokola, urađena je kontrolna serija kontrakcija posle ispiranja preparata.

1 Ukupan broj testiranih preparata u ovom ispitivanju iznosio je osam. Kontrolna EC₅₀ ACh bila
2 je 8.8 μM i u prisustvu 100 μM karvakrola nije se značajnije promenila (7.66 μM), ali je 300
3 μM karvakrola povećalo vrednost EC₅₀ na 27.71 μM. Posle ispiranja (i samim tim uklanjanja
4 karvakrola), EC₅₀ je smanjena na 14.69 μM, što je i dalje bilo skoro dvostruko više od
5 kontrolnog nalaza. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila E_{max} sa
6 kontrolnih 2.53 g na 2.20 g a druga na čak 1.63 g. Posle ispiranja, maksimalni efekat je
7 ponovo dostigao početnu vrednost (2.61 g). Statistička analiza je pokazala da karvakrol u
8 koncentraciji od 100 μM smanjuje kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane
9 svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh ali to smanjenje nije dostiglo stepen
10 statističke značajnosti. Međutim, trostruko viša koncentracija karvakrola (300 μM) je visoko
11 signifikantno inhibisala kontrakcije. Iz prikazanih rezultata se vidi da karvakrol ispoljava jasno
12 inhibitorno dejstvo na kontraktilnost mišićnog sistema parazitske nematode *A. suum*. U
13 narednom delu istraživanja ispitan je efekat gama-aminobuterne kiseline (GABA) i karvakrola
14 na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane sa ACh. GABA je nasuprot ACh
15 glavni inhibitorni neurotransmiter u nervno-mišićnom sistemu nematoda. GABA izaziva
16 relaksaciju somatske muskulature i na GABA receptor delujuju lekovi piperazin i verovatno
17 makrociklični laktoni (avermektini i milbemicini). Primenjeni protokol podrazumevao je
18 kontrolnu seriju kontrakcija izazvanih rastućim koncentracijama ACh (1, 3, 10, 30 i 100 μM),
19 zatim seriju kontrakcija izazvanih istim koncentracijama ACh, ali u prisustvu 1 μM GABA i
20 kombinacije 1 μM GABA + 100 μM karvakrola, zatim seriju kontrolnih kontrakcija posle
21 ispiranja preparata i na kraju efekat 10 μM GABA + 100 μM karvakrola na iste koncentracije
22 izazvane acetilholinom. Kontrolna vrednost EC₅₀ za ACh u ovom ispitivanju iznosila je
23 13,50 μM a maksimalni kontraktilni efekat 1,37 g. Inkubacija sa 1 μM GABA nije značajnije
24 promenila vrednost EC₅₀ acetilholna (12,19 μM) niti vrednost maksimalnih kontrakcija (1,21 g).
25 Kombinacija GABA 1 μM i karvakrol 100 μM takođe nije značajnije promenila EC₅₀ ACh
26 (15,63 μM) ali je smanjila maksimalni kontraktilni efekat za više od 0.5 g, pa je E_{max} iznosio
27 0,80 g. Međutim, kombinacija viših koncentracija GABA 10 μM i karvakrola 100 μM, gotovo je
28 potpuno inhibisala kontrakcije izazvane sa ACh. U narednom istraživanju testiran je uticaj
29 3 μM GABA i 100 μM karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane
30 acetilholinom. Ukupan broj preparata korišćenih u ovom ispitivanju bio je šest. Kombinacija
31 3 μM GABA i 100 μM karvakrola dovodi do smanjenja maksimalnog efekta za skoro pola
32 grama. U kombinaciji 10 μM GABA i 100 μM karvakrola vrednost E_{max} je skoro 10 puta manja
33 (sa 1,37 g na 0,15 g). Kontrolna vrednost EC₅₀ za ACh iznosila je 7,47 μM a E_{max} 1,91 g.
34 Inkubacija preparata sa 3 μM GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀ na 17,87
35 μM dok je maksimalni efekat opao na 1,34 g. Kombinacija GABA 3 μM i karvakrola 100 μM
36 posle 3 minuta inkubacije, još intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane ACh. Vrednost
37 EC₅₀ bila je 25,84 μM, a E_{max}=0,95 g. kandidat dalje ukazuje na jasnu sinergističku interakciju
38 inhibitornog dejstva monoterpenoida karvakrola sa GABA, što je naredna ispitivanja usmerilo
39 na potrebu provere interakcije karvakrola sa antinematodnim lekom piperazinom (GABA-
40 agonistom). Primenjen je sličan protokoli kao i u prethodnom ispitivanju. Kontrolna vrednost
41 EC₅₀ za ACh u ovoj seriji iznosila je 11,75 μM, a E_{max} 2,88 g. Inkubacija preparata sa
42 300 μM piperazina imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀ za ACh na 13,24 μM, dok
43 je maksimalni efekat opao na 2,31 g. Kombinacija 300 μM piperazina i 100 μM karvakrola
44 posle 3 minuta inkubacije, još intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane sa ACh. Vrednost
45 EC₅₀ bila je 33,25 μM, a E_{max}=1,31 g. Rezultati analize varijanse pokazali su da je piperazin u
46 koncentraciji od 300 μM smanjio kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, ali je to
47 smanjenje dostiglo stepen statističke značajnosti prilikom aplikacije 1, 3 i 30 μM ACh.
48 Međutim, kombinacija 300 μM piperazina i 100 μM karvakrola ispoljila je visoko signifikantnu
49 inhibiciju kontrakcija izazvanih svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh. Sledeće
50 podpoglavlje nazvano je Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A.*
51 *suum* izazvanih pirantelom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA Istraživanja u ovom
52 poglavlju kandidat obrazlaže činjenicom da je kod parazitskih nematoda dokazano postojanje
53 najmanje tri tipa nAChR i postavlja pitanje da li karvakrol podjednako inhibira sve do sada
54 opisane tipove ovog receptora. Ispitan je uticaj karvakrola na kontrakcije izazvane pirantelom
55 (agonista N-tipa nAChR) na preparatu *A. suum*. Kontrolna EC₅₀ pirantela bila je 4,97 μM a u
56 prisustvu 100 μM karvakrola povećala se na 17,05 nM, dok je 300 μM karvakrola povećalo
57 vrednost EC₅₀ pirantela na 19,32 nM. Prva testirana koncentracija karvakrola je smanjila E_{max}
58 sa kontrolnih 1,72 g, na 1,22 g a druga na čak 0,50 g. U narednom ispitivanju posmatran je
59 uticaj GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane pirantelom. Ukupan broj testiranih preparata

1 iznosio je šest. Kontrolna vrednost EC₅₀ pirantela iznosila je 8,44 nM, a E_{max}=1,52 g.
2 Inkubacija preparata sa 3 μM GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀ na 28,11
3 nM, dok je maksimalni efekat opao na 1,38 g. Kombinacija GABA 3μM i karvakrola 100 μM
4 posle 5 minuta inkubacije, još intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane pirantelom.
5 Vrednost EC₅₀ pirantela bila je 44,64 nM, a E_{max}=0,47 g. GABA je u koncentraciji od 3 μM
6 signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 3, 10 i 30 nM pirantela, dok je 3 μM GABA u
7 kombinaciji sa 100 μM karvakrola visoko signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim
8 testiranim rastućim koncentracijama pirantela (1, 3, 10, 30 i 100 nM). Naredno podpoglavlje
9 je Ispitivanje dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata A. suum izazvanih
10 morantelom i inhibicija kontrakcija karvakrolom i GABA Za razliku od pirantela i oksantela,
11 specifičnost dejstva morantela, trećeg antinematodnog tetrahidropirimidina u odnosu na
12 podtipove nikotinskog receptora nije potpuno definisana. Kandidat je sproveo ispitivanja na
13 neuromišićnom preparatu A. suum u kome je koristio rastuće koncentracije morantela (1, 3,
14 10, 30 i 100 nM) za izazivanje kontrakcija, a zatim preparate inkubirao sa 100 i 300 μM
15 karvakrola. Ukupno je testirao šest preparata. Kontrolna EC₅₀ morantela bila je 7,59 nM.
16 Inkubacija preparata sa 100μM karvakrola imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀
17 morantela na 22,45 nM, dok je tri puta viša koncentracija (300 μM) karvakrola samo manje
18 promenila prethodnu vrednost EC₅₀ na 24,25 nM. Posle ispiranja preparata EC₅₀ je i dalje bila
19 na istom nivou od 22,29 nM. Prva testirana koncentracija karvakrola je međutim smanjila
20 E_{max} sa kontrolnih 1,79 g, na 1,09g a druga na čak 0,36 g. Karvakrol u koncentraciji od 100
21 μM signifikantno je inhibisao kontrakcije izazvane svim primenjenim koncentracijama
22 morantela, dok je 300 μM karvakrola visoko signifikantno smanjilo te kontrakcije. I kod
23 morantela je testiran inhibitorni efekat GABA i njene kombinacije sa karvakrolom. Kontrolna
24 vrednost EC₅₀ morantela iznosila je 3,72 nM, a E_{max} 1,16 g. Inkubacija preparatata sa 3 μM
25 GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀ na 5,60 nM, dok je maksimalni efekat
26 opao na 0,99 g. Kombinacija GABA 3μM i karvakrola 100μM posle 5 minuta inkubacije, još
27 intezivnije je inhibisala kontrakcije izazvane morantelom, EC₅₀ bila je 7,94 nM, a E_{max}=0,39 g.
28 GABA je u koncentraciji od 3 μM signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 1 i 3 nM
29 morantela, dok je 3 μM GABA u kombinaciji sa 100 μM karvakrola visoko signifikantno
30 smanjila kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama morantela (1, 3, 10,
31 30 i 100 nM). Poslednje podpoglavlje u ovom delu nosi naslov Ispitivanje dozno-zavisnih
32 kontrakcija neuromišićnog preparata A. suum izazvanih befinijumom i inhibicija kontrakcija
33 karvakrolom i GABA Befinijumu je agonista B-podtipa nAChR parazitskih nematoda. U
34 ispitivanju njegovog kontraktalnog dejstva primenjen je isti protokol kao i prethodno. Kontrolna
35 EC₅₀ befinijuma iznosila je 0,36 μM, u prisustvu 100 μM karvakrola bila je 0,89 μM, dok je
36 inkubacija sa 300 μM karvakrola povećala vrednost EC₅₀ befinijuma na 1,74 μM. Prva
37 testirana koncentracija karvakrola je smanjila E_{max} sa kontrolnih 1,40 g, na 1,23 g a druga na
38 čak 0,35 g. Karvakrol je u koncentraciji od 100 μM signifikantno inhibisao kontrakcije A. suum
39 nakon aplikacije 0,1 μM i 0,3 μM befinijuma, dok je 300 μM karvakrola visoko signifikantno
40 smanjilo kontrakcije izazvane svim testiranim rastućim koncentracijama befinijuma (0.1, 0.3,
41 1, 3 i 10 μM). U daljoj analizi dejstva karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata A.
42 suum izazvane befinijumom, ispitan je njegov zajednički efekat sa GABA. Kontrolna vrednost
43 EC₅₀ za kontraktalni efekat befinijuma iznosila je 0,62 μM, a E_{max} 2,20 g. Inkubacija preparatata
44 sa 3 μM GABA imala je za posledicu povećanje vrednosti EC₅₀ na 0,96 μM, dok je
45 maksimalni efekat ostao nepromenjen 2,18 g. Kombinacija GABA 3μM i karvakrola 100 μM
46 posle 5 minuta inkubacije, još intenzivnije je inhibirala kontrakcije izazvane befinijumom tako
47 da je vrednost EC₅₀ bila je 1,40 μM, a E_{max}=0,89 g. GABA je u koncentraciji od 3 μM
48 signifikantno inhibisala kontrakcije izazvane sa 0,1 μM befinijuma, dok je 3 μM GABA u
49 kombinaciji sa 100 μM karvakrola signifikantno smanjila kontrakcije izazvane svim
50 aplikovanim rastućim koncentracijama befinijuma (0.1, 0.3, 1, 3 i 10 μM). Drugo poglavlje
51 Rezultata nosi naslov Ispitivanje dejstva tiramina na izometrijske kontrakcije izazvane
52 acetilholinom Kandidat je u ovom delu istraživanja proverio podatke da karvakrol kod
53 nematoda deluje preko tiraminskih receptora. Ispitano je dejstvo tiramina na kontrakcije
54 neuromišićnog preparata A. suum izazvane acetilholinom. Dobijeni rezultati su analizirani
55 nelinearnom regresijom, ali se vrednosti EC₅₀ acetilholina i E_{max} nisu razlikovale od kontrolnih
56 posle inkubacije sa tiraminom, odnosno tiramin nije ispoljio nikakvo dejstvo na kontraktlnost
57 neuromišićnog preparata A. suum, što je potpuno različito od jasnog inhibitornog dejstva
58 koje ispoljava karvakrol. Treće poglavlje je nazvano Ispitivanje mehanizma dejstva
59 monepantela (derivat aminoacidonitrila) i njegova interakcija sa karvakrolom na

1 neuromišićnom preparatu A. suum Monepantel sada u aminoacetonitrilne derivate (AAD) koji
2 predstavljaju jednu od najnovijih klasa antihelmintika za koje se smatra da deluju kao
3 alosterični modulatori nikotinskog receptora nematoda. U prvom delu istraživanja Kandidat je
4 ispitao uticaj 1, 3, 10 i 30 μM monepantela na kontrakcije *A. suum* izazvane rastućim
5 koncentracijama acetilholina. Prezantirani rezultati ukazuju da se monepantel ponaša kao
6 nekompetitivni antagonist nAChR i bilo je vrlo ineteresantno proveriti njegovu interakciju sa
7 karvakrolom. Kontrolna EC_{50} acetilholina u ovom ispitivanju bila je 13,13 μM , a $E_{\text{max}}=1,59$ g.
8 Karvakrol 100 μM je samo donekle povećao EC_{50} acetilholina na 19,20 μM i neznatno
9 smanjio maksimalni kontraktilni efekat na 1,32 g. Sličnu inhibiciju kontrakcija je izazvao i
10 monepantel 1 μM . U prisustvu ovog aminoacidonitrila EC_{50} acetilholina bila je 15,86 μM , a
11 maksimalni efekat 1,25 g. Međutim, kombinacija ove dve supstance je ispoljila jače dejstvo
12 od pojedinačnih efekata. EC_{50} acetilholina bila je 34,17 μM , a maksimalni efekat samo 0,87 g.
13 Rezultati ANOVA testa pokazuju da je karvakrol u koncentraciji od 100 μM smanjio
14 kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, bez statističke značajnosti. Takođe, 1 μM
15 monepantela je nesignifikantno smanjio kontrakcije izazvane acetilholinom. Međutim, kada
16 su ove dve supstance u istim koncentracijama primenjene zajedno, smanjenje kontrakcija je
17 dostiglo stepen visoke statističke značajnosti. Peto poglavlje je nazvano Ispitivanje dejstva
18 karveola na neuromišićnom preparatu A. suum Karveol je prirodni monociklični
19 monoterpenoid koji na osnovu prikazanih rezultata za razliku od karvakrola stimuliše
20 kontrakcije *A. suum* izazvane sa ACh. Kontrolna EC_{50} ACh iznosila je 15,97 μM sa E_{max} od
21 1,38 g. Posle inkubacije 5 minuta sa 10 μM karveola, EC_{50} je iznosila 6,62 μM dok je E_{max}
22 povećana na 1,51 g. Zabeleženi porast kontrakcija se nastavio i posle ispiranja karveola,
23 EC_{50} je iznosila 6,14 μM dok je E_{max} nastavio da raste do vrednosti od 1,71 g. Rezultati
24 analize varijanse pokazuju da je karveol u koncentraciji od 10 μM signifikantno povećao
25 kontrakcije nakon aplikacije 3, 10, 30 i 100 μM ACh. Peto poglavlje je Ispitivanje mehanizma
26 dejstva mentola na neuromišićnom preparatu A. suum Mentol je monoterpenoid koji je u
27 preliminarnim ispitivanjima pokazao farmakološke efekte na neuromišićnom preparatu *A.*
28 *suum*. Iz tog razloga ispitano je njegovo dejstvo na kontrakcije izazvane ACh. Kontrolna EC_{50}
29 ACh bila 12,93 μM , u prisustvu 100 nM mentola smanjila se na 10,82 μM , da bi nakon
30 ispiranja preparata EC_{50} nastavila da opada do 8,68 μM . Testirana koncentracija mentola
31 pojačala je kontrakcije izazvane sa ACh, pa je vrednost E_{max} od kontrolnih 1,62 g porasla na
32 1,90 g. Posle ispiranja, maksimalni efekat je nastavio da raste i dostigao je 1,98 g u
33 kontrolnoj seriji. Mentol je u koncentraciji od 100 nM visoko signifikantno povećao kontrakcije
34 izazvane svim primenjenim rastućim koncentracijama ACh. Signifikantno povećanje
35 intenziteta kontrakcija je nastavljeno i posle ispiranja preparata, što je posebno interesantan
36 nalaz. U ovom delu istraživanja kandidat je ispitao i efekat monepantela na potencirajuće
37 kontraktilno dejstvo mentola. Mentol je kao i u prethodnoj seriji testiranja signifikantno
38 potencirao kontraktilno dejstvo ACh, dok je monepantel taj efekat statistički značajno
39 inhibirao. Šesto poglavlje Rezultata je nazvano Ispitivanje stepena preživljavanja adultnih
40 oblika C.elegans u prisustvu timola i karvakrola U ovom poglavlju su opisani rezultati *in vivo*
41 testa na slobodnoživućoj nematodi *C. elegans*. Ispitivan je uticaj timola i karvakrola na stepen
42 preživljavanja i faringijalno pumpanje nematode. Vrednost srednje letalne koncentracije
43 timola (LC_{50}) iznosila je 117,9 nM nakon 24h i 62,89 nM posle 48h inkubacije. Fiziološki
44 mehanizam faringealnog pumpanja se u potpunosti zaustavlja nakon 48h inkubacije sa
45 timolom u hranljivoj podlozi. LC_{50} karvakrola za adultne oblike *C. elegans*, nakon 24 sata
46 inkubacije, iznosila je 53,03 nM. Nakon 48 sati inkubacije, LC_{50} karvakrola iznosio je 33,83
47 nM. U intervalu između 24 i 48 sati, primećeno je da se faringealno pumpanje *C. elegans*
48 potpuno zaustavlja. Sedmo poglavlje Rezultata Ispitivanje uticaja biljnih monoterpenoida na
49 kontrakcije dijafragme pacova primenom metode električne poljne stimulacije (EFS) imalo je
50 za cilj da testira koncentracije biljnih terpenoida sa prethodno dokazanim antinematodnim
51 dejstvom na nervnomišićnom preparatu sisara (pacova). Karvakrol u koncentracijama od 10
52 do 300 μM nije uticao na amplitudu kontrakcija izolovane dijafragme, ali su dve najviše
53 testirane koncentracije povećale bazalni tonus preparata i izazvale tetanično slabljenje
54 (*tetanical fade*). Sa druge strane karveol u koncentracijama od 10 do 1000 μM , nije uticao na
55 amplitudu kontrakcija dijafragme niti je izazvao tetanično slabljenje. Monepantel je u ovom
56 ispitivanju inhibirao povećanje bazalnog tonusa preparata dijafragme koji izaziva karvakrol.
57 Osmo poglavlje Rezultata nazvano je Ispitivanje efekta monoterpenoida na kontrakcije
58 izolovanog ileuma pacova Karveol je koncentraciji od 100 μM umereno inhibirao kontrakcije
59 ileuma izazvane rastućim koncentracijama ACh ali je signifikantno inhibirao kontrakcije ileuma

1 izazvane sa EFS. Poslednje poglavlje Rezultata odnosi se na Ispitivanje dejstva karvakrola
2 na neuromišićnu koordinaciju pacova izvođenjem Rota-rod testa Rota-rod test se koristi kao
3 metod u ispitivanju neuromišićne koordinacije i integrisanosti nervnog sistema pacova. U
4 ovom ispitivanju praćena je sposobnost pacova da se održe na rotirajućoj osovini odnosno,
5 beležen je broj padova posle aplikacije karvakrola (testirane su doze 200, 300, 400 i 500
6 mg/kg telesne mase). Karvakrol je aplikovan peroralno, želudačnom sondom i prvo testiranje
7 je obavljeno posle 30 minuta od aplikacije. Međutim, tada su iz sve 4 tretirane grupe sa
8 rotirajuće osovine pala samo 2 pacova. U sledećem kontrolnom periodu, 90 minuta posle
9 aplikacije karvakrola, padova je bilo u svim tretiranim grupama. Ovo je omogućilo
10 preračunavanje srednje efektivne doze (ED₅₀) karvakrola na Rota rod testu, koja je iznosila
11 421,6mg/kg telesne mase. U ovom ispitivanju su bile i dve kontrolne grupe, jedna grupa
12 pacova tretirana diazepamom, koji je aplikovan intraperitonealno i druga netretirana kontrola.
13

14 **Diskusija:** U ovom poglavlju kandidat detaljno tumači dobijene rezultate i upoređuje ih sa
15 podacima iz literature.

16 **Spisak referenci:** Kandidat je citirao 142 reference.

17 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 18 **disertaciji):**

19 Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata u istraživanjima kandidat navodi sledeće
20 zaključke:
21

22 1. Terpenoidi alfa-pinen, p-cimen, kahveol, karnozol i cinamaldehyd ne ispoljavaju nikakve
23 farmakološke efekte na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*.
24

25 2. Monoterpenoid karvakrol pokazuje osobine kompetitivnog/nekompetitivnog antagonistu
26 nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) *A. suum* i efikasno i signifikantno inhibira
27 kontrakcije neuromišićnog preparata izazvane rastućim koncentracijama acetilholina (ACh).

28 -100 μM karvakrola ne menja vrednost EC₅₀ acetilholina ali smanjuje maksimalni
29 kontraktilni efekat (E_{max}) sa kontrolnih 2,53 na 2,20 g.

30 -300 μM karvakrola vrednosti EC₅₀ ACh povećava tri puta (sa 8,87 na 27,71 μM a
31 E_{max} smanjuje sa 2,53 na 1,63 g.

32 -Jedan deo inhibitornog dejstva karvakrol verovatno ostvaruje vezujući se za mesto
33 na nAChR receptoru koje je različito od mesta vezivanja ACh.
34

35 3. Tiramini u koncentraciji od 300 μM ne utiče na kontrakcije neuromišićnog preparata *A.*
36 *suum* izazvane sa ACh. Sigmoidne krive odnosa koncentracije i efekta ACh bez i u prisustvu
37 tiramina su skoro potpuno poklopljene što ukazuje da tiramin (i tiraminski receptor) nema
38 uticaja na lokomotorne funkcije *A. suum*.
39

40 4. Karvakrol potencira inhibitorne efekte GABA na neuromišićnom preparatu *A. suum*. Ovde
41 se radi o sinergističkom inhibitornom dejstvu GABA i karvakrola na kontrakcije izazvane
42 avetilholinom.

43 -Karvakrol (100 μM) i GABA (3 μM) nisu ispoljili isključivo efekte kompetitivnog
44 odnosno nekompetitivnog antagonistu. Verovatno da kod nematoda zbog specifične
45 uloge inhibitornih i ekscitatornih interneurona i aktivacije/inhibicije motoneurona
46 postoji kombinovani antagonistički efekat, zavisno da li su u reakciju uključeni
47 sinaptički ili ekstrasinaptički nACh i GABA receptori.
48

49 5. Dejstvo piperazina i karvakrola na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum* izazvane
50 acetilholinom je sinergističko:
51

52 -300 μM piperazina je vrednosti EC₅₀ acetilholina povećala sa kontrolnih 11,75 μM
53 na 13,24 μM a E_{max} smanjila sa kontrolnih 2,88 na 2,31 g.

54 -Piperazin je za razliku od GABA ispoljio isključivo nekompetitivni antagonizam u
55 odnosu na kontraktilni efekat ACh. Ovo je posledica činjenice da piperazin deluje
56 samo na ekstrasinaptičke GABA receptore, dok efekat na inhibitorne interneurone
57 izostaje, a samim tim i kompetitivna komponenta antagonizma.
58
59

- 1 -Karvakrol signifikantno potencira inhibitorne efekte piperazina što ukazuje na
2 mogućnost primene ove kombinacije u terapijske svrhe.
- 3 6. U ispitivanju dozno-zavisnih kontrakcija neuromišićnog preparata *A. suum* izazvanih
4 pirantelom, morantelom i befinijumom (agonistima različitih tipova nAChR nematoda),
5 karvakrol i GABA su ispoljili sinergističko inhibitorno dejstvo:
- 6 -100 μM karvakrola je smanjio E_{max} pirantela za 29%, morantela za 39% i befinijuma
7 za 12%. EC_{50} pirantela se povećala sa 4,97 na 17,05nM (3,4 puta), morantela sa
8 7,59 na 22,45nM (2,9 puta) i befinijuma sa 0,36 na 0,89 μM (2,5 puta).
- 9 -300 μM karvakrola smanjilo je E_{max} pirantela za 71%, morantela za 80% i befinijuma
10 za 75%. Sa druge strane karvakrol je povećao vrednost EC_{50} pirantela 3,9 puta,
11 morantela 3,2 puta i befinijuma 4,8 puta.
- 12 -Istovremenom inkubacijom 3 μM GABA i 100 μM karvakrola vrednost EC_{50} pirantela
13 povećana je više od 5,3 puta, a R_{max} smanjen za 69%. EC_{50} za morantel povećana je
14 2,1 puta, sa smanjenjem R_{max} 66%. EC_{50} za befinijum povećana je 2,3 puta, uz
15 smanjenje R_{max} za 60%.
- 16 -GABA je u relativno niskoj koncentraciji potencirala pre svega nekompetitivnu
17 komponentu antagonističkog dejstva karvakrola, što ukazuje da lekovi agonisti nACh
18 receptora parazitskih nematoda deluju pre svega ekstrasinaptički, upravo tamo gde
19 je dokazano prisustvo različitih tipova ovog receptora. Sa druge strane karvakrol je
20 sam po sebi ispoljio najsnažniji inhibitorni efekat na kontrakcije izazvane morantelom,
21 što ukazuje na potencijalno poseban tip nAChR na koji deluje morantel.
- 22 -Sinergistički efekat karvakrola i GABA je vrlo sličan sinergističkom efektu
23 derkvantela i abamektina, što direktno može biti iskorišćeno u farmakoterapiji
24 parazitskih infekcija životinja i ljudi.
- 25
- 26 7. Ispitivanja mehanizma dejstva monepantela (derivat aminoacidonitrila) na neuromišićnom
27 preparatu *A. suum* pokazala su da:
- 28 -Monepantel 1 μM dovodi do povećanja EC_{50} acetilholina za 1,58 puta bez promene
29 E_{max} što ukazuje na kompetitivni antagonizam koji on ispoljava u odnosu na ACh.
- 30 -Tri puta viša koncentracija monepantela (3 μM) je vrednost EC_{50} acetilholina
31 povećala 2,15 puta, a E_{max} smanjila za 25%, što ukazuje na nekompetitivni
32 antagonizam.
- 33 -Posle inkubacije sa 10 μM monepantela, EC_{50} acetilholina je porasla za 4,31 puta,
34 dok je E_{max} smanjen za 41%.
- 35 -Inkubacija sa 30 μM monepantela nije značajnije promenila EC_{50} acetilholina u
36 odnosu na prethodnu seriju, ali je smanjila E_{max} za 78%.
- 37 -Monepantel ispoljava karakteristike kompetitivnog i nekompetitivnog antagoniste
38 nAChR, što ukazuje na multipla mesta delovanja i heterogenu populaciju nikotinskog
39 receptora u neuromišićnom sistemu parazitskih nematoda.
- 40
- 41 8. Kombinacija karvakrola (100 μM) i monepantela (1 μM) ispoljava sinergističko inhibitorno
42 dejstvo na kontrakcije neuromišićnog preparata *A. suum*, pa je EC_{50} acetilholina porasla tri
43 puta, a maksimalni kontraktilni efekat je smanjen za 50%. Sami po sebi karvakrol i
44 monepantel u primenjenim koncentracijama nisu signifikantno inhibirali kontrakcije izazvane
45 sa ACh, međutim njihova kombinacija je ispoljila visoko signifikantan inhibitorni efekat. S
46 obzirom na sve veći nivo rezistencije na monepantel ova kombinacija bi pouzdano mogla da
47 pojača njegovo antinematodno dejstvo i spreči razvoj rezistencije.
- 48
- 49 9. Ispitivanje mehanizma dejstva karveola na neuromišićnom preparatu *A. suum* pokazalo je
50 sledeće:
- 51 -10 μM karveola signifikantno pojačava kontrakcije neuromišićnog preparata
52 izazvane acetilholinom, direktnom ili indirektnom interakcijom sa nikotinskim
53 receptorom. Ovaj efekat može biti iskorišćen za pojačavanje efekata svih lekova
54 agonista nACh receptora.
- 55
- 56 10. U ispitivanjima mehanizma dejstva mentola na neuromišićnom preparatu *A. suum*:
- 57 -Testirana koncentracija mentola (100 nM) promenila je vrednost EC_{50} acetilholina sa
58 kontrolnih 12,93 μM na 10,82 μM , dok je E_{max} povećan sa 1,62 g na 1,90 g. Mentol ispoljava
59 potencirajući efekat na kontrakcije izazvane acetilholinom na neuromišićnom preparatu *A.*
60 *suum*.

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

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

5 -Timol je ispoljio dozno i vremenski zavisni letalni efekat na adultne *C. elegans*.
6 Vrednost srednje letalne koncentracije (LC₅₀) timola iznosila je 117.9 nM nakon 24h i
7 62.89 nM posle 48h. Faringealno pumpanje se u potpunosti zaustavlja nakon 48h
8 inkubacije.

9 -Karvakrol je pokazao veću antinematodnu efikasnost u odnosu na timol. LC₅₀
10 karvakrola nakon 24 sata, iznosila je 53.03 nM a 33.83 nM nakon 48h. Faringealno
11 pumpanje potpuno prestaje u periodu između 24-48 h inkubacije.

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

15 -Rastuće koncentracije karvakrola (10, 30, 100 i 300 μM) nisu ispoljile bilo kakve
16 promene u amplitudi kontrakcija. Pojava tetaničnog slabljenja posle inkubacije sa
17 100 i 300 μM ukazuje na presinaptički efekat karvakrola na neuronski tip nikotinskog
18 acetilholinskog receptora sisara (autoreceptor). Takođe, samo ove dve koncentracije
19 karvakrola povećale su bazalni tonus preparata.

20 -Rastuće koncentracije karveola (10, 30, 100, 300 i 1000 μM) nisu imale uticaja na
21 amplitudu kontrakcije, niti su izazvale tetanično slabljenje.

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

24
25 13. Ispitivanje mehanizma delovanja terpenoida karveola na kontrakcije izolovanog ileuma
26 pacova pokazalo je da:

27 -100 μM karveola nesignifikantno inhibira kontrakcije ileuma pacova izazvane
28 rastućim koncentracijama acetilholina.

29 -100 μM karveola signifikantno smanjuje maksimalni efekat kontrakcije ileuma, bez
30 uticaja na bazalni tonus.

31
32 14. Ispitivanje dejstva karvakrola na integrisanost nervnog sistema Rota-rod testom na
33 pacovima pokazalo je da:

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

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

38
39 Karvakrol, timol, karveol i mentol su na osnovu naših rezultata veoma ozbiljni
40 kandidati za samostalnu primenu u antinematodnoj terapiji ili primenu u kombinaciji sa
41 lekovima agonistima GABA receptora nematoda (avermektini, piperazin), agonistima nAChR
42 nematoda (tetrahidropirimidini i imidazotiazoli) ili aminoacidonitrilima.

43 44 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li 45 su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li 46 zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

47 Prikazani rezultati su u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja i iz njih jasno
48 proističu izneti zaključci.

49 50 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

51
52 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

53 Doktorska disertacija je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi.

54
55 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

56 Disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

57
58 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

59 Ova doktorska disertacija predstavlja originalni doprinos nauci jer se bavi
60 istraživanjima antinematodnih svojstava aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja koji su

1 najozbiljnija alternativa postojećim antiparazitskim lekovima. Ovo je prva obimnija studija koja
2 opisuje mehanizme antinematodnog dejstva terpenoidnih sastojaka biljnih ulja. Sve veći nivo
3 rezistencije parazitskih nematoda na klasične lekove, duga karenca i pojave toksičnosti posle
4 povećanja doza, ograničavaju primenu i umanjuju efikasnost postojeće farmakoterapije
5 infekcija parazitskim nematodama. Aktivni sastojci esencijalnih biljnih ulja ispoljavaju
6 specifične mehanizme antiparazitskog dejstva koji su opisani u ovoj disertaciji, različite od do
7 sada poznatih, mogu se primenjivati samostalno duže vreme zajedno sa hranom, ili u
8 kombinaciji sa konvencionalnim lekovima na koje je zabeležen povećan nivo rezistencije.
9 Ova disertacija nedvosmisleno pruža dokaze o antinematodnoj efikasnosti i selektivnom
10 dejstvu aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja koji omogućavaju njihova klinička ispitivanja
11 i formulisanje farmaceutskih preparata za kliničku primenu. Poseban doprinos ove doktorske
12 disertacije je standardizovanje i kultivisanje slobodnoživuće nematode *C. elegans* po prvi put
13 na ovim prostorima. Slobodnoživuća nematoda *C. elegans* je jedan od najčešće korišćenih
14 alternativnih modela u biomedicinskim istraživanjima, koji omogućava različita biomedicinska
15 ispitivanja uključujući i testiranja antinematodnih lekova. O vrednosti ove disertacije govori i
16 činjenica da su dobijeni rezultati publikovani u 4 rada u časopisima kategorije M21 i 22.

17
18 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
19 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne):**

20
21 Ne

22
23 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
24 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
25 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM** (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov rada, naziv
26 časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu vrednovanja, i kvantitativnom
27 iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):

28
29 **1. Marjanović S.Dj**, Bogunović Danica, Milovanović Mirjana, Marinković D., Zdravković N.,
30 Magaš V., Trailović S.M. (2018) Antihelmintic Activity of Carvacrol, Thymol, Cinnamaldehyde
31 and P-Cymen Against the Free-Living Nematode *Caenorhabditis elegans* and Rat Pinworm
32 *Syphacia muris*. Acta veterinaria. 68(4): 445-456. **M22**

33
34 **2. Abongwa M.¹, Marjanovic S.Dj¹**, Tipton J.G., Zheng F., Martin R.J., Trailovic S.M.,
35 Robertson A.P. (2018) Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine
36 receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. Int J Parasitol Drugs Drug
37 Resist. 8(1): 36-42. **M21**

38 ¹Contributed equally.

39
40 **3. Choudhary S., Marjanović S.Dj.**, Wong C.R., Zhang X., Abongwa M., Coats J.R., Trailović
41 S.M., Martin R.J., Robertson A.P. (2019) Menthol acts as a positive allosteric modulator on
42 nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. Int J Parasitol Drugs Drug
43 Resist. 9: 44-53. **M21**

44
45 **4. Trailović S.M., Marjanović S.Dj.**, Nedeljković Trailović J., Robertson A.P., Martin R.J.
46 (2015) Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and
47 gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. Parasitol
48 Res. 114(8): 3059-68. **M22**

49
50
51 **X PREDLOG:**

52
53
54 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabрати jednu od tri**
55 **ponuđenih mogućnosti):**

56
57
58 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana.
59
60
61

1 DATUM
2 09.05.2019.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

Dr. Saša Trailović, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Dr. Mirjana Milovanović, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Dr. Zoran Todorović, redovni profesor
Medicinski fakultet
Univerzitet u Beogradu