

UNIVERZITET EDUCONS
Fakultet zaštite životne sredine
Sremska Kamenica

DISTRIBUCIJA I ODREĐIVANJE NIKLOZAMIDA
U TKIVIMA I ORGANIMA ŠARANA
(*CYPRINUS CARPIO*)
PRIMENOM HPLC-DAD-FLD I MS-MS-a

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof.dr Mira Pucarević, red.prof.

Kandidat:

Brankica Kartalović

Sremska Kamenica, 2018.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: DT	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TR	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl, mag, dr): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Brankica Kartalović, dipl.ing.teh.
Mentor (titular, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Mira Pucarević
Naslov rada: NR	Distribucija i određivanje niklozamida u tkivima i organima šarana (<i>Cyprinus carpio</i>) primenom HPLC-DAD-FLD i MS-MS-a
Jezik publikacije: LP	Srpski
Jezik izvoda/apstrakta: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Srbija
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet Educons, Fakultet za zaštitu životne sredine, Vojvode Putnika 87, Sremska Kamenica

Fizički opis rada: FO	Osam poglavlja, 92 strane, 33 tabele, 31 slika, 98 referenci
Naučna oblast: NO	Zaštita životne sredine
Naučna disciplina: ND	Zaštita životne sredine
Predmetne odrednice, ključne reči: PO	Niklozamid, metaboliti, šaranski mladunci, distribucija, HPLC, validacija
UDK	
Čuva se u: ČU	Biblioteka Univerziteta Educons, Sremska Kamenica
Važna napomena: VN	Nema.
Izvod/Apstrakt: IZ	<p>Niklozamid je lek koji se koristi za lečenje infekcija izazvanih pantljičarama kod životinja i ljudi. Njegova najvažnija upotreba kod šarana (<i>Ciprinus carpio</i>) je za lečenje obolenja botriocefaloze koju izaziva pantljičara <i>Bothriocephalus acheilognathi</i>. Cilj ove doktorske disertacije je da se optimizuje metoda određivanja niklozamida (NIC) i njegovih metabolita 2-hloro 4-nitro anilina (CNA) i 5-hloro salicilne kiseline (CSA) u jetri, bubrezima, koži i mišićnom tkivu šaranskih mladunaca. i takva primeni na ispitivanje dinamike nastajanja ovih supstanci primenom HPLC-DAD-FLD-MS-MS tehnike. Limiti kvantifikacije određeni na HPLC-DAD-FLD-u za niklozamid i metabolite su se nalazili u opsegu od 1,5-1,6 µg/kg za NIC; 3,3-3,7 µg/kg za CSA i 3,3-3,6 µg/kg za CNA. Limiti kvantifikacije za niklozamid i metabolite određeni na LC-MS-MS-u su iznosili 0,4 µg/kg za NIC, dok su se za CSA kretale u opsegu od 0,6-1 µg/kg, a za CNA u opsegu od 0,5-0,6 µg/kg. Limit detekcije za NIC, CSA i CNA određeni na HPLC-DAD-FLD-u su iznosili 0,5 µg/kg; 1 µg/kg i 1 µg/kg. Limiti detekcije za NIC, CSA i CNA određeni na LC-MS-MS-u su iznosili 0,1 µg/kg. Ribe za eksperiment su dobijene iz ribnjaka Kapetanski rit i aklimatizovane su slovima testa na $20,5 \pm 1$ °C. Šaranski mladunci sa prosečnom masom od 60 ± 10 g tretirani su sa niklozamidom u koncentraciji od 2 g/kg hrane u toku pet uzastopnih dana. Na kraju tretmana, nivoi</p>

	<p>niklozamidnih ostataka su određeni korišćenjem tečne hromatografije visokih performansi (HPLC), analizom tokom 13 dana. Srednje vrednosti koncentracije niklozamida u mišnom tkivu su se kretale od 27,7 µg/kg počev od prvog dana do <0,5 µg/kg jedanaestog dana; u jetri od 51,5 µg/kg do <0,5 µg/kg trinaestog dana; bubrezima od 29,4 µg/kg do <0,5 µg/kg trinaestog dana i koži od 77,8 µg/kg počev od prvog dana do <0,5 µg/kg petog dana. Metabolit CSA u mišićima i koži je bio <1 µg/kg tokom čitave studije, dok je koncentracije CSA u jetri dostigla maksimalni nivo od 11,5 µg/kg sedmog dana a u bubrezima 8,4 µg/kg petog dana nakon primene leka i potom pala na vrednost <1 µg/kg trinaestog dana. Koncentracija CNA u mesu i mišnom tkivu je opala od 14,5 µg/kg do <1 µg/kg jedanaestog dana, dok je zabeležena koncentracija u jetri, odnosno bubrezima bila 170 µg/kg, odnosno 39,4 µg/kg. U koži šaranskih mladunaca zabeležena koncentracija CNA iznosila je 3,2 µg/kg, i zabeležena je samo prvog dana nakon primena leka. Podaci dobijeni tokom ove studije pružili su informacije o koncentraciji, dinamici nestajanja i optimalnim uslovima ekstrakcije i određivanja niklozamida i njegovih ostataka CNA i CSA u jetri, bubrezima, koži i mišićima šaranskih mladunaca tretiranih oralno.</p>
<p>Datum prihvatanja od strane NN veća: DP</p>	
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije (ime i prezime, titular, zvanje, naziv institucije, status): KO</p>	<p>Predsednik: Prof. dr Mira Pucarević, redovni profesor, Univerzitet Educons Član: Prof.dr Miroslav Ćirković, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo “Novi Sad” Član: dr Željko Mihaljev, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo “Novi Sad” Član: dr Nataša Stojić, docent, Univerzitet Educons Član: dr Snežana Štbac, vanredni profesor, Univerzitet Educons</p>

KEY DOCUMENT INFORMATION

Number *consecutive: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code (BA/BSc, MA/MSc, PhD): CC	PhD
Author: AU	Brankica Kartalović, dipl.ing.teh.
Mentor (title, name, post): MN	Prof. dr Mira Pucarević
Document title: TI	
Language of main text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Serbia
Year of publication: PY	2018
Publisher: PU	Author
Place of publication: PP	
Physical description: PD	8 chapters, 92 pages, 33 tables, 31 figures, 98 references
Scientific field: SF	Environmental Science
Scientific discipline: SD	Environmental Science
Subject, Key words SKW	Niclosamide, carpio, metabolites, HPLC, validation
UC (universal class. code)	
Holding data: HD	In the Library of the Educons Uversity, Sremska Kamenica
Note:	No note

N	
<p>Abstract: AB</p>	<p>Niclosamide is a medication used to treat tapeworm infestation in animals and humans. Its most important use in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) is for the treatment of <i>Bothriocephalus acheilognathi</i>, which is a very common parasite in this fish species. The aim of this study was to optimize method determination of niclosamide (NIC) and its metabolite 2-chloro 4-nitro aniline (CNA) and 5-chloro salycilic acid (CSA) in the muscles, liver, kidneys and skin of common carp fingerlings by using HPLC-DAD-FLD-MS-MS technique. The quantification limits determined on the HPLC-DAD-FLD for the nicolosamide and the metabolites were in the range of 1,5-1,6 µg/kg for the NIC; 3,3-3,7 µg/kg for CSA and 3,3-3,6 µg/kg for CNA. LOQ, quantification limits for nicosamide and metabolites determined on LC-MS-MS were 0,4 µg/kg for NIC, while CSA ranged in the range of 0,6-1 µg/kg, and for CNA in the range from 0,5 to 0,6 µg/kg. The detection limit for NIC, CSA and CNA determined on HPLC-DAD-FLD was 0,5 µg/kg; 1 µg/kg and 1 µg/kg. The detection limits for NIC, CSA and CNA determined on LC-MS-MS were 0.1 µg / kgThe fish for the experiment were obtained from Kapetanski Rit fish pond, and were acclimated to test conditions at 20,5 ± 1°C. Common carps with an average mass of 60 ± 10 g were treated with niclosamide concentration of 2 g/kg of feed during five consecutive days. At the end of the treatment, the levels of niclosamide residues were determined using a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis during over 13 days. The mean values of niclosamide concentrations in the muscles ranged from 27,7µg/kg starting from the first day to <0,5 µg/kg on the 11th day in muscles. The niclosamide concentration in the liver were found to be 51,5 µg/kg the first day and decreased proportionally to <0,5 µg/kg on the 13th day; in kidneys concentration were in range of 29,4 µg/kg to <0,5 µg/kg 13th day and in skin from 77,8 µg/kg starting first day to <0,5 µg/kg at 5th day. CNA level in the liver of treated common carps amounted to 170,1 µg/kg on the first day and continuously declined until the 13thday when recorded values were <1 µg/kg, in kidneys from 39,4 µg/kg to <1 µg/kg, in muscles concentration</p>

	<p>of CNA was in range 14,5 µg/kg to <1 µg/kg 11th day and in skin from 3,2 µg/kg to <1 µg / kg. CSA concentrations in the liver reached a maximum level of 11,5 µg/kg on the 7th day and fell to <1 µg/kg on the 13th day, and in kidneys reached maximum level of 8,4 µg/kg on the 5th day and fell to <1 µg/kg on the 13th day. CSA was not detected in skin. Data obtained during this study provided information about the concentration and fate of niclosamide and it's residues CNA and CSA in the liver and muscles of common carp treated orally.</p>
<p>Accepted by Sc. Board on: AS</p>	
<p>Defended/Viva voce Ph D exam. on: DE</p>	
<p>PhD Examination Panel: DB</p>	<p>Chairperson: PhD Mira Pucarević, Full Professor, Educons University Member: PhD Miroslav Ćirković, Science Advisor, Scientific Veterinary Institute “Novi Sad” Member: PhD Željko Mihaljev, Scientific Associate, Scientific Veterinary Institute “Novi Sad” Member: PhD Nataša Stojić, Assistant Professor, Univerzitet Educons Member: PhD Snežana Štbac, Associate Professor, Univerzitet Educons</p>

SADRŽAJ:

1. UVOD	13
1.1. Cilj istraživanja.....	14
2. PREGLED LITERATURE	16
2.1. Fizičko-hemijske karakteristike niklozamida.....	16
2.2. Metaboliti niklozamida.....	19
2.3. Fizičko-hemijske karakteristike CSA.....	21
2.4. Fizičko-hemijske karakteristike CNA	22
2.5. Farmakokinetika	24
2.6. Antiparazitsko delovanje niklozamida	28
2.7. Antikancerogeno delovanje niklozamida	29
2.8. Analitičke metode za određivanje niklozamida i njegovih metabolita.....	30
2.9. Validacija analitičke metode	33
2.9.1 Linearnost	34
2.9.2. Ponovljivost	34
2.9.3. Reproductivnost.....	34
2.9.4. Tačnost (Recovery vrednost)	34
2.9.5. Granica detekcije	35
2.9.6. Granica kvantifikacije.....	35
3. OPŠTA HIPOTEZA.....	40
4. MATERIAL I METODE	41
4.1. Hemijski reagensi, standardni rastvori i oprema	41
4.2. Uslovi hromatografskih razdvajanja.....	43

4.3.	Uzorci ribe i dobrobit životinja	44
4.4.	Eksperimentalni uslovi uzgajanja ribe ishranom sa dodatkom niklozamida.....	45
4.4.1.	Parametri kvaliteta mesa šarana.....	47
4.4.2.	Analize za određivanje sadržaja niklozamida i njegovih metabolita CSA i CNA u tkivu i organima šaranskih mladunaca	47
4.5.	Postupak izvođenja validacije metode.....	48
4.5.1.	Linearnost	48
4.5.2.	Ponovljivost	48
4.5.3.	Reproduktivnost.....	49
4.5.4.	Tačnost (prinos metode)	49
4.5.5.	Granica detekcije	50
4.5.6.	Granica kvantifikacije.....	50
5.	REZULTATI.....	51
5.1.	Hemijski kvalitet mesa	52
5.2.	Rezultati validacije metode	53
5.2.1.	Linearnost	54
5.2.2.	Ponovljivost.....	61
5.2.3.	Reproduktivnost.....	62
5.2.4.	Tačnost metode određivanja	64
5.2.5.	Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).....	65
5.3.	Distribucija i dinamika nestajanja NIC-a u tkivima i organima ribe.....	67
5.4.	Distribucija i dinamika nestajanja metabolita NIC-a u tkivima i organima ribe.	69
6.	DISKUSIJA.....	77
7.	ZAKLJUČCI.....	82
8.	LITERATURA.....	85

Spisak tabela:

Tabela 1. Analitičke metode za određivanje NIC-a, CSA i CNA	32
Tabela 2. Hromatografski uslovi određivanja NIC-a na HPLC-u sa DAD detektorom. 43	
Tabela 3. Hromatografski uslovi određivanja CNA i-CSA HPLC-u opremljenim sa DAD i FLD detektorom.....	43
Tabela 4. Hromatografski uslovi određivanja CSA HPLC-u opremljenim sa FLD detektorom.....	44
Tabela 5. Hromatografski uslovi određivanja NIC-a, CSA i CNA na LC-MS-MS-u ...	44
Tabela 6. Parametri akvizicije za MS - MS određivanje niklozamida i njegovih metabolita	44
Tabela 7. Šematski prikaz/algorithm ogleda na životinjama.....	46
Tabela 8. Kriterijumi prihvatljivosti metode za određivanje NIC, CSA i CNA	48
Tabela 9. Prikaz reprezentativnih matrixa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja preciznosti, reproduktivnosti i tačnosti merenja.....	49
Tabela 10. Prikaz reprezentativnih matriksa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja LOQ i LOD.....	50
Tabela 11. Prosečne, minimalne, maksimalne vrednosti pH, elektroprovodljivosti i rastvorenog kiseonika u bazenima za uzgajanje.....	51
Tabela 12. Prosečne nasadne mase riba u kontrolnoj i oglednoj grupi	52
Tabela 13. Hemijski sastav mesa jednogodišnjih šarana.....	52
Tabela 14. Jednačina prave za NIC	54
Tabela 15. Jednačina prave za CNA.....	54
Tabela 16. Jednačina prave za CSA	54
Tabela 17. Ponovljivost određivanja koncentracije niklozamida u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćen sa NIC	61

Tabela 18. Ponovljivost određivanja koncentracije CSA ($\mu\text{g/g}$) u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćenim sa CSA	61
Tabela 19. Ponovljivost određivanja koncentracije CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćenim sa CNA	62
Tabela 20. Rezultati određivanja reproduktivnosti za NIC dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-DAD i LC-MS-MS-u toku dva dana.....	63
Tabela 21. Rezultati određivanja reproduktivnosti za CSA dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-FLD i LC-MS-MS-u toku dva dana.	63
Tabela 22. Rezultati određivanja reproduktivnosti za CNA dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-DAD i LC-MS-MS-u toku dva dana.....	64
Tabela 23. Tačnost metode određivanja NIC, CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži, izražena kao prinos metode (%), određena na aparatu HPLC DAD-FLD	64
Tabela 24. Tačnost metode određivanja NIC, CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži, izražena kao prinos metode (%), određena na aparatu LC-MS-MS-u. .	65
Tabela 25. Limit kvantifikacije (LOQ) za NIC određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u	65
Tabela 26. Limit kvantifikacije (LOQ) za CNA određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u	65
Tabela 27. Limit kvantifikacije (LOQ) za CSA određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u	66
Tabela 28. Limit detekcije (LOD) za NIC određeni na HPLC- DAD-FLD i LC-MS-MS-u	66
Tabela 29. Limit detekcije (LOD) za CNA određeni na HPLC- DAD-FLD i LC-MS-MS-u	66
Tabela 30. Limit detekcije (LOD) za CNA određeni na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u	66
Tabela 31. Distribucija niklozamida u tkivima i organima ribe, praćena nakon petodnevnog tretmana sa peletiranom hranom koja je sadržala 2g/kg niklozamida.	67
Tabela 32. Srednje koncentracije ($\mu\text{g/kg}$) CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca koji su bili izloženi dozi od 2g/kg niklozamida.	69

Tabela 33. Srednja koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$) CSA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca koji su bili izloženi dozi od $2\text{g}/\text{kg}$ niklozamida. 71

Spisak slika:

Slika 1. Strukturna formula niklozamida.....	16
Slika 2. Strukturna formula salicilanilida.....	17
Slika 3. Degradacija niklozamida (Doran i Stevens, 2014).....	19
Slika 4. Strukturna formula CSA.....	22
Slika 6. Kalibraciona kriva NIC-a snimljena na HPLC-DAD.....	55
Slika 7. Hromatogram NIC-a snimljena na HPLC-DAD (UV 335nm.....	55
Slika 8. Kalibraciona kriva CNA snimljena na HPLC-DAD	56
Slika 9. Hromatogram CNA snimljen na HPLC-DAD (UV 211 nm).....	56
Slika 10. Kalibraciona kriva CSA snimljena na HPLC-FLD	57
Slika 11. Hromatogram CSA snimljen na HPLC-FLD (Ex-315 / Em-470 nm)	57
Slika 12. Kalibraciona kriva NIC snimljena na HPLC-MS-MS	58
Slika 13. Hromatogram NIC snimljen na HPLC-MS-MS.....	58
Slika 14. Kalibraciona kriva CNA snimljena na HPLC-MS-MS.....	59
Slika 15. Hromatogram CNA snimljen na HPLC-MS-MS.....	59
Slika 16. Kalibraciona kriva CSA snimljena na HPLC-MS-MS.....	60
Slika 17. Hromatogram CSA snimljen na HPLC-MS-MS.....	60
Slika 18. Grafički prikaz dinamike nestajanja niklozamida u mišićnom tkivu i organima ribe	68
Slika 19. Grafički prikaz distribucije niklozamida u mišićnom tkivu i organima ribe ..	68
Slika 20. Grafički prikaz dinamike nestajanja CNA u mišićnom tkivu i organima ribe	70
Slika 21. Grafički prikaz distribucije CNA u mišićnom tkivu i organima ribe.....	70

Slika 22. Grafički prikaz dinamike nestajanja CSA u mišićnom tkivu i organima ribe	72
Slika 23. Grafički prikaz distribucije CSA u mišićnom tkivu i organima ribe	72
Slika 24. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca	73
Slika 25. Distribucija NIC, CNA i CSA u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca tokom trinaest dana.....	73
Slika 26. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u jetri šaranskih mladunaca tokom trinaest dana.....	74
Slika 27. Distribucija NIC, CNA i CSA u jetri šaranskih mladunaca tokom trinaest dana	74
Slika 28. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u bubrežima šaranskih mladunaca tokom trinaest dana.....	75
Slika 29. Distribucija NIC, CNA i CSA u bubrežima šaranskih mladunaca.....	75
Slika 30. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u koži šaranskih mladunaca tokom trinaest dana.....	76
Slika 31. Distribucija NIC, CNA i CSA u koži šaranskih mladunaca tokom trinaest dana	76

1. UVOD

Niklozamid (5-hloro-N-(2-hloro-4-nitrofenil)-2-hidroksibenzamid) je oralni antihelmintik koji pripada strukturalnoj porodici salicilanilida (Martin, 1997). Ova velika grupa jedinjenja se prvobitno koristila kao fungicid, za lokalnu primenu i kao antimikrobni sastojak sapuna (Kraushaar, 1954). Kasnije, sa otkrićem snažne antihelmintske aktivnosti, po kojoj se izdvojio niklozamid (Hecht i Gloxhuber, 1960), širok spektar halogenih salicilanilida je počeo da se koristi protiv crevnih i drugih parazita (Broome i Jones, 1966; Brown i sar., 1985; Coles, 1974).

Niklozamid se široko koristi za tretman infekcija cestoda kod riba i drugih vrsta životinja. Prvobitno je uveden kao limacid, za tretman i kontrolu puževa koji prenose šizostomijazu (puževa groznica), (Dai i sar., 2008). Danas se u značajnoj meri koristi u poljoprivredi za uništavanje ciljnih štetočina, a najčešće protiv zlatnog puža jabuka (*Pomacea canaliculata*) u poljima pirinča (Andrews i sar., 1982).

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da niklozamid može imati i široku kliničku primenu za lečenje bolesti koje nisu uzrokovane parazitima. Postoje podaci o njegovoj upotrebi za sprečavanje rasta i razvoja malignih ćelija (citostatsko dejstvo) u terapiji raka, bakterijskih i virusnih infekcija, bolesti metabolizma kao što su dijabetes tipa II, konstrikcija arterija, endometrijoza, neuropatski bol, reumatoidni artritis, sklerodermatozna bolest "graft-versus-host" i sistemska skleroza (Li i sar., 2017; Liu i sar., 2016). Niklozamid je zajedno sa oksiklozanidom, pokazao i jaku *in vivo* i *in vitro* aktivnost protiv metafilin-otporne *Staphilococcus aureus* (MRSA) (Rajamuthiah i sar., 2015). Smatra se da može inhibirati replikaciju virusa Zika u *in vitro* uslovima (Xu i sar., 2016).

Mehanizam dejstva niklozamida nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da niklozamid deluje tenicidno tako što zaustavlja Krebsov ciklus u mitohondrijama, odnosno da ometa oksidacione procese u ćelijama inhibiranjem kiseonika (Tripathi, 2008). Kod cestoda, inhibiranjem oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, dolazi do njihovog odvajanja od zida creva nakon čega one digestijom bivaju izbačene iz organizma (Andrews i sar., 1982). Sprovedena ispitivanja su pokazala da primarno

dejstvo niklozamida uključuje inhibiciju proizvodnje energije u mitohondrijama parazita kroz inhibiciju anaerobne fosforilacije adenozin difosfata (ADP), (Huq, 2006).

U tretmanu parazitskih bolesti kod riba, niklozamid je korišćen kao kupka i bio je efikasan u uskom koncentracionom opsegu od 0,075-0,1 mg / mL (90 min) (Schmahl i Taraschewski, 1987). Takođe je korišćen umešan sa hranom za kontrolu infekcije cestoda. Kod šaranskih mladunaca koristi se isključivo umešan sa hranom za lečenje botriocefaloze, bolesti koju izaziva izaziva pantljičara *Bothriocephalus acheilognathi* (Ćirković i sar., 2015).

Analiziranje sadržaja niklozamida i njegovih metabolita vrši se, uglavnom, hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC) sa UV detektorom (Muir i Grift, 1980). Muir i Grift (1980) su pokazali da se sadržaj niklozamida i njegovih metabolita može odrediti i gasnom hromatografijom (GC) nakon derivatizacije sa metil jodidom (CH_3I), dok se u novije vreme koriste tehnike tačne hromatografije sa dva masena detektora (LC-MS-MS), (Doran i Stevens, 2014).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je da se na nivou naučnog objašnjenja utvrdi distribucija niklozamida (NIC) i njegovih metabolita, 2-hloro-4-nitroanilina (CNA) i 5-hlorosalicilne kiseline (CSA) kao i vreme zadržavanja u mišićnom tkivu i organima šaranskih mladunaca. Ispitivanje distribucije niklozamida i njegovih metabolita će se vršiti primenom tačne hromatografije visokih performansi a radi jasnijeg sagledavanja distribucije niklozamida i njegovih metabolita postavljeni su sledeći zadaci istraživanja:

- razvoj hromatografske metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje NIC-a i njegovih metabolita CNA i CSA,
- validacija HPLC-DAD-FLD-MS-MS instrumentalnih metoda za određivanja niklozamida i njegovih metabolita,
- utvrđivanje vremena zadržavanja NIC -a u mišićnom tkivu i organima šaranskih mladunaca,
- utvrđivanje vremena zadržavanja CNA i CSA u mišićnom tkivu i organima šaranskih mladunaca.

U ovom istraživanju očekuje se da će se utvrditi koncentracija niklozamida i njegovih metabolita u mišićnom tkivu i organima šaranskih mladunaca, kao i vreme njihovog zadržavanja u organizmu.

Originalan naučni doprinos ovog istraživanja, ogleda se u definisanju vremena zadržavanja niklozamida i njegovih metabolita u mišićnom tkivu i organima šaranskih mladunaca, koji se koristi za lečenje obolenja izazvanog pantljičarom *Bothriocephalus acheilognathi*. Rezultati ovog istraživanja će biti prvi predstavljeni rezultati o upotrebi niklozamida u akvakulturi na teritoriji Srbije.

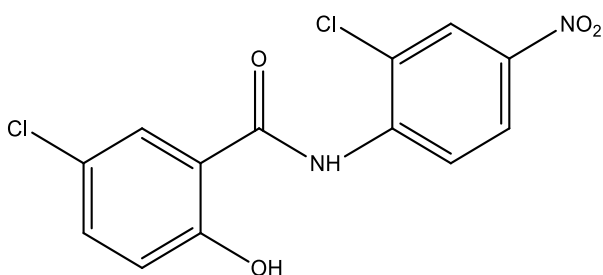
2. PREGLED LITERATURE

Niklozamid je opisan u literaturi, definisane su njegove fizičko-hemijske karakteristike, njegovi metaboliti, farmakokinetika, antikancerogene osobine kao i metode određivanja.

2.1. Fizičko-hemijske karakteristike niklozamida

Niklozamid je anthelmintik biofarmaceutske klase (BCS) II, lek koji ima nisku rastvorljivost i visoku propustljivost. To je bledo-žuti prah, bez mirisa i bez ukusa. Nerastvorljiv je u vodi, slabo rastvorljiv u alkoholu, etru i hloroformu, može se rastvoriti u vrućem etanolu, cikloheksanonu i vodenom rastvoru natrijum hidroksida. Niklozamid ili prema IUPAC-u 5-hloro-N-(2-hloro-4-nitrofenil)-2-hidroksibenzamid, je organsko jedinjenje koje sadrži 13 atoma ugljenika i ima molekulska masu od 327,120 g/mol.

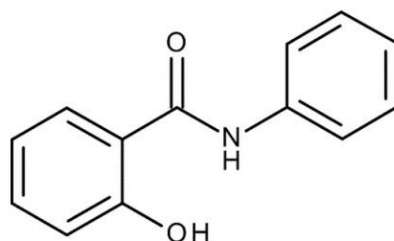
Molekulska formula niklozamida je $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$ a strukturna formula je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Strukturna formula niklozamida

Niklozamid spada u grupu salicilanilida. Salicilanilidi su amidi salicilne kiseline i anilina. Klasifikovani su i kao salicilamidi i anilidi. Salicilna kiselina je beli kristalni prah ili kristal u obliku igle slatkog ukusa, rastvorljiv u acetonu, etru, alkoholu, ključajućoj vodi, benzenu i terpentinu. Slabo je rastvorljiv u hloroform-benzenu i toploj vodi na 158 °C. Sadrži i hidroksilnu i karboksilnu grupu koje reaguju sa kiselinom ili

alkoholom. Karboksilna grupa formira estere sa alkoholom, koji se koristi u aromama za hranu, konzervansima u losionima za sunčanje i dr. Hidroksilna grupa reaguje sa sircetnom kiselinom kako bi se formirala acetilsalicilna kiselina (nazvana aspirin).



Slika 2. Strukturna formula salicilanilida

Salicilna kiselina je važna za pripremu drugih farmaceutskih proizvoda, boja, aroma i konzervansa. Derivati salicilne kiseline se koriste u formulisanju ukusa, konzervansa i UV filtera za hranu i kozmetiku, kao i plastiku. Koriste se u proizvodnji farmaceutskih proizvoda, uglavnom analgetika i antipiretika za olakšavanje bolova i groznice. Anilid je amid u kome se jedan ili više atoma vodonika zamenjuju fenilom koji ima $C_6H_5NH_2$ grupu (Afaf i sar., 2008).

Derivati salicilanilida imaju različitu farmakološku upotrebu. Hlorisani derivati, uključujući niklozamid, oksiklozanide i rafoksanid, koriste se kao anthelmintici, posebno kao fungicidi dok se bromirani derivati, uključujući dibromsalan, metabromsalan i tribromsalan, koriste kao dezinfekciona sredstva sa antibakterijskim i antifungalnim aktivnostima (Caldow i sar., 2009)

Amid je grupa organskih hemikalija sa opštom formulom $RCO-NH_2$ u kojoj je atom ugljenika vezan za kiseonik u dvostrukoj vezi, a takođe je vezan i za hidroksilnu grupu, gde se grupe R kreću od vodonika do različitih linearnih i prstenastih struktura ili jedinjenje sa metalom koji zamenjuje vodonik u amonijaku kao što je natrijum amid, $NaNH_2$. Amidi su podeljeni u podklase prema broju supstituenata na azotu. Primarni amid se formira zamenom karboksilne hidroksilne grupe pomoću NH_2 , amino grupe. Amid se dobija reakcijom kiselog hlorida, anhidrida kiseline ili estra sa aminom. Amid se može formirati iz amonijaka (NH_3). Sekundarni i tercijalni amidi su jedinjenja koja jedan ili oba vodonika u primarnim amidima zamenjuju druge grupe. Imena sekundarnih i tercijarnih amida označavaju zamenjene grupe sa prefiksom N (što znači

azot) pre naziva starijih amida. Amidi, male molekulske mase, su rastvorljivi u vodi usled formiranja vodoničnih veza. Primarni amidi su više tačke topljenja i ključanja od sekundarnih i tercijarnih amida. Anilid je amid izveden iz anilina supstitucijom acil grupe za vodonik NH_2 . Acetanilid je čvrsta supstanca bez mirisa ili kristalnog praha (čista forma), rastvorljiv u alkoholu, toploj vodi, etru, hloroformu, acetonu, glicerolu. Tačka ključanja je $304\text{ }^\circ\text{C}$ i može se podvrgnuti zapaljenju na $545\text{ }^\circ\text{C}$, ali inače je stabilan u većini uslova. Acetanilid koji se može dobiti acetilacijom anilina. Acetil grupa može se ukloniti hidrolizom katalizovanim kiselinama kako bi se dobio para-nitroanilin. Iako se aktivna afektivnost amino grupe može smanjiti, acetilni derivat ostaje orto / para-orijentacija i aktivira supstituent. Primeri aromatičnog anilida su benzanilid, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCOC}_6\text{H}_5$ ili karbanilid (N, N'-difenilkarbamid). Neki strukturni amidi su: acetamidi, akrilamidi, anilidi, benzamidi, naftilamidi, formamidi, laktami, salicilamidi, sulfonamidi, tioamidi.

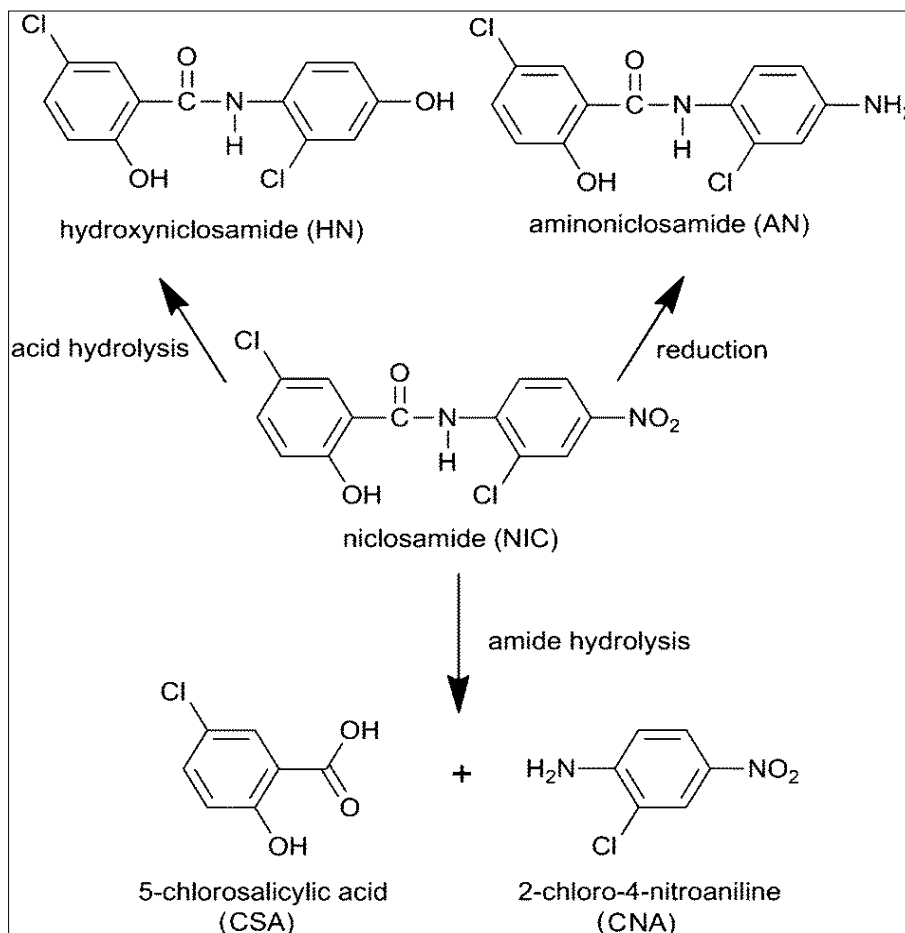
Hidrolizom amida se dobija amin i karboksilna kiselina u jako kiselim uslovima. Obrnuti proces dovodi do gubitka vode tokom povezivanja amino kiselina, široko je prisutan u prirodi tokom formiranja protein. (Brown i sar., 1985). Acil halogenidi su najreaktivniji amidi najmanje reaktivni među derivatima karboksilne kiseline, kao po redu "acil halidi > anhidridi > estri > kiseline > amidi". U homogenim sistemima rastvarača, amidi reaguju sa vodom samo u prisustvu jakih kiselih ili baznih katalizatora pri zagrevanju. Zbog azota, bez vezanog elektronskog para sa karbonilnom grupom, amidi su veoma polarni i u osnovi slabiji od amina. Elektrofili se vezuju za atom kiseonika u odnosu na azot u amidu. Dodavanjem vode nitriju (trostruka veza ugljenik-azot) dajući amid. Sulfonamidi su analogi amida u kojima je atom vezan za kiseonik u dvostrukoj vezi je sumpor umesto ugljenika. Sulfonamidi reaguju sa alkil halidima, halidnim kiselinama, sulfonil halidima, epihalohidrinima, ketonima i aldehydima.

Salicilanilide karakteriše uzan spektar aktivnosti, i svaki je efikasan samo protiv određenih parazita. Koriste se uglavnom kod goveda i ovaca, a vrlo sporadično kod kućnih ljubimaca ili konja. Antihelmintik salicilanilid je uveden 1960. i 1970. godine od strane nekoliko farmaceutskih kompanija. Svi salicilanilidi su veterinarski anthelmintici koji su davno izgubili patentnu zaštitu. Oni koji su još u upotrebi dostupni su kao generički proizvodi brojnih hemijskih kompanija (najčepće u Kini, Indiji, Izraelu, Brazilu itd.), (Afaf i sar., 2008; Caldow i sar., 2009).

Najvažniji salicilanilidi koji imaju veterinarsku upotrebu su klozantel i niklozamid. Klozantel se efektivno koristi protiv određenih metilja i krupnih crva, dok se u nekim zemljama, niklozamid odobrava i kao ljudski lek za lečenje parazitskih obolenja.

2.2. Metaboliti niklozamida

Do degradacije NIC-a može doći različitim mehanizmima, (Dawson, 2003) ali njegovi primarni metaboliti su 2-hloro-4-nitroanilin (CNA), aminoniklozamid (AN), hidroksiniklozamid (HN) i 5-hlorosalicilna kiselina (CSA) (Slika 3.). Hidroliza amidne veze u NIC-u rezultira nastankom CSA i CNA dok kisela hidroliza NIC-a rezultira nastankom HN, Slika 3, (Doran i Stevens, 2014).



Slika 3. Degradacija niklozamida (Doran i Stevens, 2014)

Metabolizam faze I, može dovesti do hidrolitičkog cepanja amidne veze kako bi nastali 5-hlorosalicilna kiselina (CSA) i 2-hloro-4-nitroanilin (CNA) kao glavni metaboliti (Slika 3), (Doran i Stevens, 2014). Drugi manji metabolit je 2', 5-dihloro-4'-aminosalicilanilid (TFDCAS). Testovi bakterijskih mutagenosti sa ova dva jedinjenja su pokazala da CSA nije mutagen dok je CNA na nižim nivoima od niklozamida toksičan (Espinosa-Aguirre i sar., 1991). Analize molekularnog modeliranja na osnovu molekularne mehanike pokazale su da se niklozamid i njegovi metaboliti pokazuju energetske razlike između orbitala na najvišem energetskom nivou (HOMO) i nepopunjene orbitale na najnižem energetskom nivou (LUMO), a time i kinetičku labilnost. CNA ima najmanju LUMO-HOMO energetsku razliku i samim tim najveću reaktivnost. Takođe ima nižu rastvorljivost u vodi i eventualno nižu termodinamiku stabilnost. Ova svojstva mogu učiniti CNA toksičnim i mutagenim metabolitom (Huq, 2006).

U svojoj studiji, Zazaa i sar. (2014) su niklozamid podvrgli alkalnoj hidrolizi. Niklozamid su rastvorili u smeši metanola i 1N NaOH i podvrgli refluku tokom 6 časova na 80°C. Kao rezultat alkalne hidrolize niklozamida nastali su CSA i CNA, prema Britanskoj farmakopeji (BP, 2009) i Evropskoj farmakopeji (EP, 2007). Graebing i sar. (2004) su u svojoj studiji pokazali da je fotodegradacija niklozamida u pH 5 puferu, 4,3 puta brža nego kod pH 9 pufera i 1,5 puta brže nego u puferu pH 7. U mraku, niklozamid degradira samo u puferu pH 5. Posle 360 časova kontinualnog zračenja u puferu sa pH 9, hromatografski obrazac degradacije bio je isti bez obzira na koji je prsten bio radioaktivno označen.

Proizvod fotodegradacije niklozamida je ugljen-dioksid i dvo- i četiri-karbonske alifatske kiseline formirane cepanjem dva aromatična prstena. Ugljendioksid je glavni degradacioni proizvod, a drugi degradacioni oblici su oksalna kiselina, maleinska kiselina, glioksilna kiselina i glioksal. Pored toga, u ozračenom testiranom rastvoru označenom hloro-nitroanilinom, CNA je primećen i identifikovan nakon 48 časova zračenja, ali nije otkriven nakon toga.

Niklozamid je otporan na hidrolizu na pH 5, 7 i pH 9 tokom više od 4 meseca (El-Dib i Aly, 1976) ali fotoliza formulacije koju čini 70% praha u vodenim rastvorima

rezultira značajnim smanjenjem biološke aktivnosti u roku od 24 časa (Gillet i Bruaux, 1961; Statham i Lech, 1975).

Uprkos svojoj opštoj upotrebi, utvrđeno je da je niklozamid toksičan za neke vode organizame (Lardans i Dissous, 1998; Andrevs i sar., 1982). Duga grupa naučnika je otkrila da niklozamid izaziva probleme kopnenim i vodenim biljkama (Lardans i Dissous, 1998). Utvrđeno je i da se niklozamid vezuje za DNK nakon reduktivne aktivacije koja može biti uzrok toksičnosti (Abreu i sar., 2002). Američka agencija za hranu i lekove je niklozamid odobrila kao supstancu koja se koristi kod ljudi gotovo 40 godina (Ditzel i Schwartz, 1967). Komercijalno naziv niklozamida je poznat kao Bayer 73 u Nemačkoj ili *Bayluscide* ili Niclocide u Kanadi i Sjedinjenim Državama (Jurgeit i sar., 2012; Van Tonder i sar., 2004).

Sprovedene studije o genotoksičnosti kod glodara i ljudi ukazale su da je niklozamid lek koji se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a da se kao dva glavna degradaciona produkta izlučuju CSA i CNA (Liu i sar., 2016), jedinjenja sa mutagenim dejstvom (Espinosa-Aguirre i sar., 1991; Zazaa i sar., 2014). Ova dva degradaciona produkta su identifikovana sa infracrvenom (IR) i masenom (MS) spektrometrijom (Zazaa i sar., 2014).

Svetska zdravstvena organizacija (WHO, 2002) je izdala podatke o letalnoj toksičnosti niklozamida. Letalna doza, LD_{50} , je količina materijala, hemikalije, koja data odjednom uzrokuje smrt polovine (50%) testiranih životinja. LD_{50} je jedan od načina za merenje potencijala kratkotrajnog trovanja (akutne toksičnosti). Letalna doza za niklozamid, kod riba je LC_{50} je 0,03-0,23 mg/L.

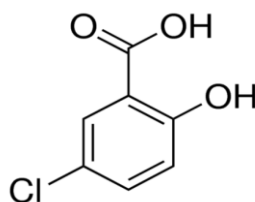
Podaci o akutnoj toksičnosti CSA nisu dostupni, dok je CNA prema Evropskoj regulativi svrstan u grupu supstanci koje pokazuju akutnu toksičnost i za oralnu primenu je svrstan u kategoriju 4, dok u vodi pokazuje hroničnu toksičnost kategorije 2.

2.3. Fizičko-hemijske karakteristike CSA

5-hlorosalicilna kiselina ili prema IUPAK-u 5-hloro-2-hidroksibenzoeva kiselina je organsko jedinjenje molekulske mase 172,56 g/mol. CSA je bela, kristalna supstanca, rastvorljiva u etru, alkoholu i hloroformu. Stabilna je na sobnoj temperature i normalnom pritisku. To je polarno jedinjenje koje gradi vodonične veze.

CSA je monohidroksi benzoeva kiselina koja je nastala od 2-hidroksibenzoeva kiselina (salicilna kiselina) u kojoj je vodonik na poziciji 5 zamenjen hlorom (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Hloro-salicalna kiselina je bezbojna kristalna organska kiselina koja se široko koristi u organskoj sintezi i funkcioniše kao biljni hormon. Izvodi se iz metabolizma salicina. Pored toga što služi kao važan aktivni metabolit aspirina (acetilsalicilne kiseline), koja delom djeluje kao prolek za salicilnu kiselinu, verovatno je najpoznatija po svojoj upotrebi kao ključni sastojak u topikalnim anti-akni proizvodima. Molekulska formula CSA je $C_7H_5ClO_3$. Strukturna formula CSA je prikazna na Slici 4.



Slika 4. Strukturna formula CSA

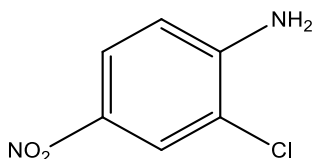
Soli i esteri salicilne kiseline poznati su kao salicilati. Derivat salicalne kiseline, CSA koristi se za proizvodnju različitih farmaceutskih i biološki aktivnih jedinjenja. Koristi se za sintezu derivata N-aril-salicilamida koji se koriste kao antitumorni agensi (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4. Fizičko-hemijske karakteristike CNA

CNA ili prema IUPAC-u 2-hloro-4-nitroanilin je organsko jedinjenje molekulske mase 172.568 g/mol. To je žuta kristalna supstanca, rastvorljiva u alkoholu, benzenu, etru; slabo rastvorljiva u vodi i jakim kiselinama. 2-hloro-4-nitroanilin ($C_6H_5ClN_2O_2$).

CNA je nitro-aromatično jedinjenje (Slika 5), koje se koristi kao intermedijer u sintezi boja, farmaceutskih proizvoda, inhibitora korozije i u proizvodnji niklozamida (Hampercht i Westerkamp, 2000; Lewis, 2002; Schnorbach i sar., 2008).

Molekulska formula 2-hloro-4-nitroanilina je $C_6H_5ClN_2O_2$. Strukturna formula CNA je prikazana na Slici 5.



Slika 5. Strukturna formula CNA

Ispitivanjem metabolizma niklozamida koji se koristio kao antihelmintički lek su se bavili Graebing (2004) i Espinosa-Akuirre (1991). Oni su utvrdili da cepanje amidne veze rezultira stvaranjem metabolita CNA i CSA. S obzirom na široku primenu i proizvodnju, CNA može dospeti u okruženje različitim tokovima otpada i predstavlja pretnju životnoj sredini i životnim formama (Borcherding i Wolf, 2001).

Ispitivanja su pokazala da CNA uzrokuje teška oštećenja ćelije, što je potvrđeno eksperimentima na pacovima (Cottalasso i sar., 1991). Ako se pusti u vodu, očekuje se da se CNA adsorbuje na suspendovanim čvrstim materijama i sedimentu. Isparavanje CNA sa površine tla i površine vode se ne smatra važnim što je zaključeno na osnovu vrednosti Henrijeve konstante (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Slično tome, CNA ne sadrži nikakvu funkcionalnu grupu pomoću koje bi se hidrolizovala u životnoj sredini (Lyman i sar., 1990). Međutim, CNA sadrže hromofore koji mogu apsorbovati svetlost na talasnoj dužini većoj od 290 nm i mogu biti podložni fotolizi (Lyman i sar., 1990). Dakle, za remedijaciju kontaminacije u životnoj sredini, mikrobiološka transformacija i degradacija mogu se koristiti kao najefikasniji, ekološki i tehnički zahtevni pristup za dekontaminaciju zemljišta, sedimenata, vodnih tela itd.

CNA se smatra nebiorazgradivim u vodenoj sredini, kao i u industrijskim postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda (Struijs i Stoltenkam, 1986). Slično tome, Canton i sar. (1985) su klasifikovali CNA kao supstancu na crnoj listi zbog svoje slabe biorazgradljivosti.

Metabolizam CNA ispitivali su Khan i sar., (2013) putem aerobne degradacije i zaključili da je *Rhodococcus sp.* jedna od prvih aerobnih bakterija sposobnih da razgrade CNA do ugljenika i azota.

2.5. Farmakokinetika

Farmakokinetikom niklozamida i preparata na bazi niklozamida su se bavili mnogi naučnici. Farmakokinetika je grana farmakologije koja se bavi izučavanjem promena supstanci doziranih u žive organizme, omogućavajući da se utvrde kvantitativne analize odnosa između organizma i leka od unosa u organizam do momenta njegovog kompletnog eliminisanja iz tela (Benet, 1984). U otvorenim vodotokovima niklozamid se najviše koristio i koristi protiv larvi puževa. Međutim, tretmani koji se sprovode u cilju kontrole populacije puževa se odražavaju i na neciljane organizme, prvenstveno ribe. Stoga je bilo neophodno ispitati da li se i koliko dugo niklozamid zadržava u tkivima i organima riba.

Preparat *Bayer 73* (B73), na bazi niklozamida se tokom 70-tih godina koristio za kontrolu morskih larvi puževa u pritokama Velikih jezera. Međutim, pored morskih larvi tretmanu su bile izložene i ribe u tretiranim vodotokovima, koje se koriste za ljudsku upotrebu. Zbog toga su Schultz i Herman (1978) u svom eksperimentu određivali koncentraciju niklozamida u tkivu i organima pastrmke. Oni su niklozamid radioaktivno označili radi lakšeg praćenja i njihova ispitivanja pokazala su da je koncentracija radioaktivno označenog niklozamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) bila povećana u svakom periodu uzorkovanja u krvi, mozgu, žuči, mišićima i bubrezima uzorkovane ribe. Radioaktivnost u slezini bila je varijabilna tokom 4, 8, i 12 časova, ali se više nego udvostručila u period od 12 do 24 časova nakon tretmana. Varijabilnost koncentracije radioaktivno označenog niklozamida je bila najveća u jetri i dostigla je vrednost od $14,27 \mu\text{g}/\text{kg}$ za 2 časa, dok je 4 časa nakon izlaganja koncentracija radioaktivno označenog niklozamida pala na $9,18 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Scultz i Herman (1978) su vršili eksperiment u kome su pastrmku izlagali preparatu na bazi niklozamida tokom 24 i 144 časa. Nakon 24-časovnog izlaganja utvrđeno je da je koncentracija preparata niklozamida u rastvoru za izlaganje opala od početne koncentracije od $5,0 \times 10^{-5}$ do $2,4 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{L}$. Kod drugog eksperimenta u trajanju od 144 časa, koncentracija radiaktivnog niklozamida je bila povećana u svim tkivima pastrmke tokom celog perioda uzorkovanja. U ovom eksperimentu vidimo da se koncentracija radioaktivno označenog niklozamida kretala od niske u iznosu od 0,35

µg/kg u mišićima do od 141,94 µg/kg u žuči. Zabeležene su koncentracije (µg/kg) i u drugim tkivima. U mozgu je zabeležena koncentracija od 0,44 µg/kg, u slezini 1,73 µg/kg; jetri 2,32 µg/kg; krvi 4,15 µg/kg i bubrezima 4,95 µg/kg.

Statham i Lech (1975) su tokom svog eksperimenta šarenu pastrmku izložili rastvoru radioaktivno označenog niklozamida (preparat *Bayer 2353*) u koncentraciji od $5,0 \times 10^{-5}$ µg/L tokom 12 časova. Odmah nakon 24 časa izlaganja urađene su analize i dobijene su sledeće vrednosti: u krvi 4,2 µg/kg, jetri 13,4 µg/kg i u mišićima 0,08 µg/kg. Utvrđeno je da je niklozamid, kod šarene pastrmke, metabolizovao do alfa glukuronida.

Niklozamid se kao pesticid se u SAD već više od 40 godina uspešno koristi sam, a u kombinaciji sa 3-trifluorometil-4-nitrofenolom (TFA) za kontrolu morskih larvi (*Petromizon marinus*) u tokovima pritoka prema Velikim jezerima (Hubert i sar., 2005). Kako se niklozamid uglavnom nanosi direktno u vodene tokove naseljene ribom, postoji i potencijal da se ostaci niklozamida akumuliraju u ribljem mišićnom tkivu i organima. Eksperiment sa pastrmkom (*Oncorhincus mykiss*) s ciljem određivanja koncentracije niklozamida u telu pastrmke u pritokama Velikih jezera izveo je Hubert i sar., (2005). On je pastrmku izložio radioaktivno označenom lampricidu 3-trifluorometil-4-nitrofenol (TFM), u koncentraciji od 2100 µg/L i radioaktivno označenom niklozamidom u koncentraciji od 55 µg/L tokom 24 časa. Odmah nakon ekspozicije riba izvršeno je žrtvovanje i analiziranje uzoraka mišićnog tkiva. Analize su pokazale da je tkivo ribe koje je bilo izloženo niklozamidom sadržalo niklozamid u koncentraciji od 464,51 +/- 166,83 µg/kg, metabolit niklozamid-glukuronid u koncentraciji od 24,01 +/- 10 µg/kg, kao i metabolit koji prethodno nije bio prijavljen, niklozamid sulfatni estar u koncentraciji od 46,56 +/- 128,04 µg/kg.

Brzina i veličina eliminacije niklozamida i njegovih ostataka praćena je i na pastrmci koja je tretirana preparatom niklozamida, *Baylucidom*, u pritokama Velikih jezera. Na eksperimentu koji je rađen na šarenim pastrmkama (*Oncorhinchus mikiss*), Dawson i sar. (1999) su pokazali da je uzimanje niklozamida iz vode od strane pastrmke brzo, a da ostaci dostignu ravnotežu 3 dana nakon izlaganja. Nakon 24 sata izlaganja, u samo 9% tela pastrmke (filetima) su nađeni ostaci niklozamida. Po završetku eksperimenta, riba je prebačena u čistu vodu, gde je dalje praćen sadržaj ostataka niklozamida u tkivu ribe. Utvrđeno je da nakon 2-3 dana dana boravka ribe u čistoj vodi, se ne detektuje prisustvo niklozamida u tkivima pastrmke, odnosno da je

detektovana koncentracija manja od LOD vrednosti od 10,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Schreier i sar., 2000).

Na reci Ford u Mičigenu, Smit (1996), je izveo eksperiment na pastrmci i somu (200-400 g), koji su pri kaveznim uslovima gajenja bili izloženi tretmanu sa niklozamidom u koncentraciji od 0,02 mg/L. Nakon dvanaestočasovnog izlaganja po pet uzoraka od obe vrste riba je uzeto na analizu. Uzorci su homogenizovani, ekstrahovani i analizirani na HPLC-DAD, detektorom sa nizom fotodioda. Dobijeni rezultati pokazali su da je maksimalna koncentracija u filetima pastrmke zabeležena 12 časova nakon izlaganja i iznosila je $40,0 \pm 25,0 \mu\text{g}/\text{kg}$, dok je kod soma maksimalna koncentracija zabeležena 18 časova nakon izlaganja i kretala se u opsegu od 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 68 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ispitivanja koja je sproveo Takougang i sar. (2007) su pokazala da je primena preparata niklozamida (*Baylucidom*) u vodi protiv vodenih puževa, prouzrokovala žućkasta obojenja vode što je sam preparat učinilo manje prihvatljivim za upotrebu. Kada su isti preparat primenili u manjoj dozi dobili su dobre rezultate tj. došlo je do značajnog smanjenja brojnosti vodenih puževa. Oni su svojim eksperimentom pokazali da se primenom manjih koncentracija preparata na bazi niklozamida postižu dobri rezultati i delovanje samo na ciljane organizme (puževe) a da pri tome ne dolazi do promene kvaliteta vode niti utiče na druge vodene organizme.

U studiji u severnom Kamerunu, *Baylucidom* je primenjivan na ribnjake u koncentracijama od 0; 0,25; 0,5 ili 1 g/m^3 (Chen i sar., 2017). Ispitivanja su pokazala da se primenom preparata *Baylucida* u nižim koncentracijama (0,25 ili 0,5 g/m^3) postižu bolji rezultati nego kod primene preparata u koncentraciji od 1 g/m^3 , čime je pokazano da su i relativno niske doze preparata efikasne u kontroli puževa.

Ćirković i sar. (2015) su izveli seriju laboratorijskih ispitivanja pri kojima su šaranske mladunce izložili dejstvu niklozamida u koncentraciji od 2g/kg, tokom pet dana. Prosečna težina tretiranih šaranskih mladunaca bila je oko 60 g. U njihovom eksperimentu je utvrđeno da se niklozamid najviše deponuje u jetri 72,42 %, dok je zastupljenost niklozamida u bubrezima i slezini je bila znatno niža i iznosila je 18,79 %, odnosno 7,79 % a da je do najmanjeg deponovanja došlo u mesu, svega 3 %. Ovim eksperimentom je takođe pokazano da se tretiranjem ribe sa niklozamidom postiže brza, efikasna i potpuna eliminacija pantljičare.

Spektrofotometrijska kinetička studija alkalne degradacije niklozamida kao funkcija koncentracije leka, pH i temperature utvrđena je korišćenjem spektrofotometrijskog metoda (Zazaa i sar., 2014). Razvijena metoda je omogućila određivanje niklozamida u prisustvu proizvoda alkalne razgradnje gde nastaje CNA, kao prvi i CSA, kao drugi proizvod razgradnje. Utvrđeno je da kinetika razgradnja niklozamida prati pseudo-prvi red pod utvrđenim eksperimentalnim uslovima sa konstantnom brzinom degradacije (k) od 0,0829 mol/h i poluvremenu ($t_{1/2}$) od 8,35 h. Ukupna konstanta stope degradacije kao funkcija temperature pod datim uslovima podudarala je sa Areniusovom jednačinom gde je izračunata energija aktivacije od 3,41 kcal/mol (Zazaa i sar., 2014).

Graebing i sar. su 2004. godine izveli seriju eksperimenata gde je analizirana kinetika i mehanizam degradacije niklozamida u aerobnim i aneobnim uslovima. Aerobni metabolizam niklozamida u vodi, proučavan je u mešavinama rečne vode i sedimentnih mešavina. Testirani sistemi su održavani pod aerobnim uslovima, tretirani niklozamidom i inkubirani u mraku na $25,0 \pm 1,0$ °C tokom 30 dana. U vodi u aerobnim uslovima, poluvek raspada metabolita CSA i CNA je bio 4,9 i 5,4 dana respektivno. Za ispitivanje anaerobnog vodenog metabolizma niklozamida, testirani sistemi su inkubirani pod anaerobnim uslovima tokom 365 dana. Primećeno je da od 0 do 3 dana nakon tretmana, dolazi do transformacije niklozamida u aminoniklozamid. U ekstraktima vode i sedimenata primećeni su još neki analiti, mada nijedan od tih metabolita nije bio formiran u značajnoj količini. Graebing i sar. (2004) koji su takođe utvrdili da je niklozamid-glukuronid glavni metabolit niklozamida u žuči šarene pastrmke.

Griffiths i Facchini (1979) su svojim ispitivanjem pokazali da koncentracija niklozamida u ribama počinje da opada 12-17 sati posle izlaganja, pošto jedinjenje metaboliše u niklozamid glukuronid nakon čega se i eliminiše.

Ispitivanja Svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2002) pokazala su da se niklozamid, nakon oralnog davanja, samo neznatno apsorbuje u krvotok. Apsorbovani niklozamid se brzo metaboliše i izlučuje, dok neapsorbovani niklozamid ostaje nepromenjen u probavnom traktu i izlučuje se fecesom, gotovo potpuno kao nepromenjeno osnovno jedinjenje čime se može i objasniti niska toksičnost za domaće životinje i kućne ljubimce. Prilikom istraživanja ni niklozamid ni njegovi metaboliti

nisu detektovani u krvi i urinu a upravo niska apsorpcija omogućava visoku sigurnosnu granicu za njegovu upotrebu na životinjama (WHO, 2002).

2.6. Antiparazitsko delovanje niklozamida

Antihelmintik niklozamid, deluje tenicidno tako što zaustavlja Krebsov ciklus u mitohondrijama. Mehanizam delovanja antiparazitskih lekova se zasniva, uglavnom, na inhibiciji transporta glukoze i procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama parazita - inhibišu beta tubulin parazita (neophodan za polimerizaciju mikrotubula parazita) i sprečavaju proces razmnožavanja.

U dosada dostupnim literarnim podacima vidimo da se niklozamid, što se tiče akvakulture, koristio za lečenje parazitskih oboljenja kod pastrmke i soma (Huq, 2006; Hubert i sar., 2005, Dawson i sar., 1999), dok se prvi literarni podatak o primeni niklozamida za lečenje kod šarana pojavljuje tek 2015.godine (Ćirković i sar., 2015). U laboratorijskim uslovima

U periodu dužem od 40 godina niklozamid se koristio kao lavricid i kao limacid u pritokama Velikih jezera (Huq, 2006; Hubert i sar., 2005, Dawson i sar., 1999). Nakon otkrića grupe naučnika da je niklozamid toksičan za neke vodene organizme (Lardans and Dissous, 1998; Andrews i sar., 1982) i da može izazvati probleme kopnenim i vodenim biljkama (Lardans i Dissous, 1998), s ciljem eliminisanja uticaja na zdravlje ljudi, ispitivana je mogućnost deponovanja niklozamida u jestivom tkivu, odnosno mišićnom tkivu riba kao neciljanih organizama. U gore navedenim ispitivanjima, preparat na bazi niklozamida nanosio se direktno u vodene tokove, i ispitivana je mogućnost deponovanja niklozamida i njegovih metabolita u tkivu pastrmke.

Ping i sar. (2017) su ispitivali dejstvo estarskog derivata niklozamida (*5-chloro-2-[(2-chloro-4-nitrophenyl) carbamoyl] phenyl-4-methoxybenzoate* (salicylanilidata) na puževe koji prenose šistozomijazu (puževa groznica), koji pripadaju rodu *Biomphalaria species*. Po preporuci Svetske zdravstvene organizacije protiv puževa se više desetina godina koristio samo niklozamid. Međutim, s obzirom da je on toksičan za vodene organizme koji nisu ciljani, radilo se na razvoju novih limacida koje bi karakterisala smanjena toksičnost na neciljane organizme. Dobijeni derivat niklozamida, 5- hloro-2-

[(2-hloro-4-nitrofenil) karbomil] fenil-4-metoksibenzoat, je pokazao zadovoljavajuću toksičnost za puževe roda *Biomphalariaspecies* a sa druge strane vrlo nisku toksičnost za *D. rerio*, što ukazuje na njegovu široku potencijalnu primenu (Ping i sar., 2017).

U nekim zemljama niklozamid se koristi u obliku litijumovih i natrijumovih soli, jer u tom obliku pokazuje bolje dejstvo. Najpoznatiji preparat niklozamida je *Bayer 73*. Malo je rastvorljiv u destilovanoj vodi (5-8 µg/mL) na 20 °C. Za upotrebu u vodenim sredinama se uglavnom koristi njegova aminoetanolna so *Bayer 2353*, koja ima rastvorljivost od 230±50 µg/mL u vodi na 25 °C. Rastvorljivost u vodi se povećava sa temperaturom, tako da na 20°C iznosi 145±33 µg/mL do 372±86 µg/mL na 50 °C. Delovanje preparata *Bayer 73*, odnosno aktivne materije niklozamida nije u potpunosti razjašnjeno ali se smatra da deluje slično kao 3-trifluorometil-4-nitrofenol (TFM).

U našem ispitivanju posmatran je uticaj niklozamida na lečenje botriocefaloze kod šaranskih mladunaca. Naime u intenzivnim uslovima gajenja riba dolazi do velikih promena abiotičkih i biotičkih činioca i do kompleksnog uticaja organizama jednih na druge (Novakov i sar., 2015), pri čemu prisustvo parazita izazivaju poremećaje osnovnih fizioloških parametara izraženih preko kliničkih simptoma, promena u tkivima i organima a vrlo često i uginućima. Botriocefaloza je obolenje koje se često sreće kod šarana. Uzročnik botriocefaloze je parazit *Bothriocephalus acheilognathi* (Novakov i sar., 2015). Kod botriocefaloze lečenje se veoma efikasno sprovodi upotrebom niklozamidskih preparata u peletiranim kompletnim krmnim smešama za mladunce (Novakov i sar., 2015). Ispitivanja su pokazala da je i lek Prazikvantel takođe efikasan u tretiranju ovog obolenja.

2.7. Antikancerogeno delovanje niklozamida

U novije vreme niklozamid je identifikovan i kao potencijalni antikancerogeni agens koji ima citotoksičnu i citostatsku aktivnost protiv širokog spektra karcinoma, uključujući leukemiju, karcinom dojke, rak prostate, hepatocelularni karcinom i glioblastom, kao i dijabetes (Hamdoun i sar., 2017; Storz, 2005; Liou i Storz, 2010; Wartenberg i sar., 2005; Jin i sar., 2010; Lee i sar., 2014; Arend i sar., 2014; Imperi i sar., 2013; Housman i sar., 2014; Li i sar., 2010; Li i sar., 2014), sa tim da njegov precizni mehanizam protiv tumornog dejstva nije još uvek u potpunosti shvaćen.

Niklozamid, deluje protiv ćelija raka, čijoj reorganizaciji delovanja se pristupilo i nađene su nove indikacije za njegovu primenu (Ashburn i Thor, 2004; Tada i sar., 2006; Hoelder i sar., 2012; Kraljević, 2004). Ispitivanja su pokazala da niklozamid izaziva povećanje nivoa reaktivnih kiseonika i nivoa glutaciona u ćelijama leukemije (Hamdoun i sar., 2017). On utiče na većinu karcinoma i karakteriše se unakrsnom otpornošću na široki spektar najčešće korišćenih hemoterapeutskih lekova (Bartsevich i Juliano, 2000; Bellamy, 1996). Fonseca i sar. (2012) su utvrdili da antiparazitski lek niklozamid snažno inhibira i signalni put kompleksa proteina. Ispitano je i hemijsko svojstvo niklozamida da poseduje karakteristične protonofore, uključujući slabo kiselu OH grupu koja može reverzibilno vezati protone u fiziološkom opsegu pH-a, masivni hidrofobni deo odgovoran za membransku rastvorljivost i elemente koji povlače elektrone te delokalizovati negativni naboj anionskog oblika protonofora, omogućavajući mu da ostane povezana sa membranama (Terada, 1990; Wang i sar., 1995). Ove osobine omogućavaju takvim hemikalijama da se ugrade u plazma membranu i intracelularne membrane i sprovode brze cikluse vezivanja protona i oslobađanja, čime se smanjuju protonski gradijenti preko membrana.

Park i sar. su 2011. godine pokazali da je niklozamid i snažan induktor mitohondrijske fisije. Njihovim eksperimentom utvrđeno je da tretman sa niklozamidom dovodi do poremećaja potencijala mitohondrija indukujući njihovu fragmentaciju i smanjenje nivoa ATP-a. S druge strane, fenotipske analize koje su izvodili Imperi i sar. (2013) su pokazale da niklozamid sprečava formiranje biofilma i utiče na transkripciju oko 250 gena.

2.8. Analitičke metode za određivanje niklozamida i njegovih metabolita

Analitičke metode za kvalitativno i kvantitativno određivanje niklozamida i njegovih metabolita su zadnjih decenija doživele razvoj i zasnivaju se u većini slučajeva na već utvrđenim metodama za amide, hlorovana i nitrovana aromatična jedinjenja. Ubrzanim razvojem instrumenata za analitička određivanja željenih analita omogućen je i razvoj metoda boljih karakteristika koje karakteriše veća osetljivost i selektivnost.

Izbor instrumentalne metode za određivanje zavisi od fizičkih osobina nekog elementa ili jedinjenja. Bilo da se radi o sposobnosti obojenih rastvora da apsorbuju

svetlost, kapacitetu rastvora da provodi struju ili sposobnosti razdvajanja na gasnu, tečnu ili čvrstu fazu, sve navedene fizičke osobine mogu da se koriste za kvalitativno ili kvantitativno određivanje određenih elemenata ili jedinjenja. Hromatografija je analitička (kvalitativna i kvantitativna) metoda koja se zasniva na raspodeli komponenti neke smeše na osnovu njihovog afiniteta vezivanja za određenu fizičku fazu. Kvalitativnim analitičkim metodama se potvrđuje prisustvo ili odsustvo posmatranog analita od interesa u uzorku, dok se kvantitativnim analitičkim metodama utvrđuje količina analita od interesa. Kod tečne hromatografije, kao i kod svih hromatografskim metoda, vreme zadržavanja komponente (retenciono vreme) pod datim uslovima predstavlja njenu karakteristiku.

Kvantitativno određivanje kod tečne hromatografije svodi se na merenje površina koncentracionih zona (pikova) na hromatogramu, što podrazumeva linearan odgovor detektora u širokom opsegu koncentracija.

Razvoj analitičkih metoda za određivanje NIC, CSA i CNA je komplikovan zbog složenosti matriksa biološkog materijala i zbog najčešće niskih koncentracija ciljanih jedinjenja. U osnovi NIC, CSA i CNA se ekstrahuju iz uzorka, prečišćavaju i po potrebi koncentruju pre analize.

Instrumentalna metoda koja je korišćena za određivanje niklozamida i njegovih metabolita je metoda tečne hromatografije visokih performansi (HPLC). Tečna hromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC), je tehnika hromatografskog razdvajanja kod koje je mobilna faza tečnost. Tečna hromatografija može biti planarna (hromatografija na papiru ili tankom sloju) ili hromatografija u koloni. Od 2004.godine, tečna hromatografija ultra performansi, UPLC (engl. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*), dramatično je podigla mogućnosti tečne hromatografije na još viši nivo (Antić i Antić, 2014).

HPLC sistem pruža mogućnosti razdvajanja, identifikacije i kvantitativnog određivanja jedinjenja koja su prisutna u bilo kom uzorku koji se može rastvoriti u tečnosti. Danas, jedinjenja u tragovima, čije su koncentracija reda veličine delova milijarde (ppt), mogu lako da se identifikuju uz pomoć tečne hromatografije visokih performansi. Ova tehnika može da se primeni na skoro svaki uzorak, kao što su lekovi, prehrambeni proizvodi, kozmetika, uzorci iz životne sredine, forenzički uzorci i industrijske hemikalije. Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analizirane

supstance (ili smeše) kroz kolonu (cev napunjenu materijalom sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tečnosti (mobilna faza) pod visokim pritiskom kroz kolonu. Mala zapremina uzorka se unosi u tok mobilne faze i na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smeše.

Tabelarni prikaz nekih od metoda za određivanje niklozamida i njegovih derivata dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Analitičke metode za određivanje NIC-a, CSA i CNA

Uzorak	Analit	Analitički metod	Prinos, %	Referenca
Pastrmka	NIC	HPLC	88	Schreier i sar., 2000
Som i	NIC	HPLC	113	Schreier i sar., 2000
Riba	NIC	GC-ECD	88	Luhning i sar., 1979
Beskičmenjaci	NIC	GC-ECD	82	Luhning i sar., 1979
Voda	NIC	HPLC	99-116	Muir i Grift, 1980
Voda	NIC	GC-ECD	82	Luhning i sar., 1979
Voda	NIC, CSA, CNA	LC-MS/MS	98	Doran i Stevens, 2014
Ribe	NIC	GC-ECD	82	Luhning i sar., 1979
Sediment	NIC	HPLC	73-126	Muir i Grift, 1980
Farmaceutski preparat	NIC	RP HPTC, DAD	100,67	Paghadar i Vadia, 2015
Farmaceutski preparat	NIC	HPTLC, PDA,	99,85	Paghadar i Vadia, 2015
Farmaceutski preparat	NIC	RP HPTC, DAD	-	Van Tonder i sar., 1996
Farmaceutski preparat	NIC	Spektrometrija	99,93	Khier i sar., 2008
Ribe	NIC	Spektrometrija	-	Dawson i sar., 1978
Farmaceutski preparat	NIC	Spektrometrija	100,07	Daabees, 2000
Farmaceutski preparat	NIC	Spektrometrija	99,8	Othman i Sultan, 2014
Farmaceutski preparat	NIC	Spektrometrija	98,8	Onur i Tekin, 1994
Farmaceutski preparat	NIC	Voltametrija	-	Alemu i sar., 2002
Farmaceutski preparat	NIC	HPLC	98	Caldov i sar., 2009

Nakon istraživanja literature može se videti da se za određivanje NIC-a, uključujući određivanje u čistom obliku ili u kombinaciji sa drugim lekovima, koriste uglavnom spektrofotometrijske metode i metode određivanja sa spektrofluorimetrima (Algarra i sar., 2012.; Onur i Tekin, 1994.; Daabees, 2000.). Za analize niklozamida su korišćene i hromatografske metode uključujući HPLC (Schreier i sar., 2000; Caldov i sar., 2009.; Dawson, 1982., Doran i Stevens, 2014) i metode gasne hromatografije nakon derivatizacije (Churchill i Ku, 1980; John i Geoffrey, 1980; Luhning, i sar., 1979). Muir i Grift (1980) su ispitivali sadržaj niklozamida u vodi i sedimentu. Oni su uzorke vode ekstrahovali sa etil acetatom dok su uzorke sedimenta ekstrahovali sa

smešom metanola i vode u odnosu 4:1. Nakon metilizacije sa metil jodidom niklozamid je određivan gasnom hromatografijom uz pomoć detektora sa zahvatom elektrona (*Electron Capture Detector*, ECD) ili na HPLC-u sa UV detektorom na talasnoj duzini od 313 nm.

Metoda za simultano određivanje niklozamida i njegovih primarnih metabolita CNA i CSA, primenom tečno masene-masene hromatografije (LC-MS-MS) razvijena je 2014.godine (Doran i Stevens, 2014). U svojoj studiji Doran i Stevens (2014) su pokazali da granica detekcije u mnogome zavisi od primenjene mobilne faze kao i da je osetljivost LC-MS-MS metode od 10-250 puta manja od ranije izvođenih metoda na HPLC –UV/VIS detektoru.

Elektrohemijske metode za određivanje niklozamida su bazirane na voltimetriji kvadratnih talasa (Alemu i sar., 2003), ili cikličnoj voltimetriji na staklenoj karbonskoj elektrodi (Abreu i sar., 2002) kao i analizama na modifikovanoj elektrodi za elektrokatalizu (Ghalkani i Shahrokhianab, 2010). Polarografske metode određivanja su bazirane na redukciji niklozamida (Alemu i sar., 2002) i to je zapravo indirektna metoda analize jer se njome analiziraju produkti hidrolize.

2.9. Validacija analitičke metode

Standardna EPA metoda broj 8131 se koristi za određivanje anilina i njegovih derivata i može se primeniti za određivanje NIC, CNA i CSA. U ovoj metodi su prikazane validacione studije za određivanje anilina i derivata u vodi a isto tako su date i smernice za validaciju i određivanje aniline i derivate u drugim matriksima.

Kod primene modifikovanih metoda za analize validacija metoda je neophodan korak. Validaciju analitičkih metoda zahtevaju razne državne regulatorne agencije i industrijski odbori. Tako, američka Agencija za lekove i hranu, FDA, zahteva da analitičke metode budu validovane, pri čemu je potrebno pokazati i dokumentirati njihovu tačnost, osetljivost, specifičnost i ponovljivost. Ujedno daju i vodič za kvalitetnu i uspešnu validaciju. Slično zahteva i Evropska agencija za medicinu, EMEA, koja se u svojim smernicama u potpunosti uskladila s predlozima ICH-a (*International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*), međunarodnom inicijativom predstavnika regulatornih

agencija i farmaceutske industrije Evrope, SAD-a i Japana u cilju osiguranja sigurnih, kvalitetnih i efikasnih medicinskih proizvoda.

Analitičke metode moraju se validovati, verifikovati ili revalidovati pri razvoju i uvođenju nove metode, pri promeni bio kog dela analitičke metode koja je bila validovana, promena postojeće metode, prenošenje metode u drugu laboratoriju, pobošaljavanje postojeće metode i prenošenje metode na drugi instrument. Pri validacije metode potrebno je odrediti: linearnost, ponovljivost, reproduktivnost, tačnost, granicu detekcije (LOD), granicu kvantifikacije (LOQ).

2.9.1 Linearnost

Linearnost metode potvrđuje da se rastvori uzorka nalaze u koncentracijskom opsegu u kome je odgovor detektora linearno proporcionalan koncentraciji.

2.9.2. Ponovljivost

Ponovljivost (*Repeatability*) je parameter validacije kojim se izražava preciznost rezultata analiza istog uzorka kojeg pod istim uslovima analizira isti analitičar, u istoj laboratoriji, na istoj opremi u kratkom vremenskom periodu.

2.9.3. Reproductivnost

Reproduktivnost predstavlja podudaranje rezultata dobijenih uzastopnim merenjem nekoliko istih uzoraka istom metodom u različitim laboratorijama (različiti operater, različiti radni uslovi unutar specifičnih parametara metode). Parametri za određivanje reproduktivnosti su standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD).

2.9.4. Tačnost (Recovery vrednost)

Tačnost analitičke metode je stepen saglasnosti između stvarne i vrednosti dobijene primenom analitičkog postupka određeni broj puta, odnosno ona ukazuje na ispravnost merenja. U praksi se tačnost analitičke metode proverava: analizom

Standardnih Referentnih Materijala-SRM, određivanjem procenta prinosa (“*recovery*”), upoređivanjem sa drugom metodom, (ili sa više) koja je potvrđena kao tačna.

Dobijena tačnost u velikoj meri zavisi od načina pripreme uzorka, matriksa i koncentracije uzorka.

2.9.5. Granica detekcije

Najniža koncentracija analita koja se može detektovati u uzorku, ali ne i kvantitativno odrediti, naziva se granicom detekcije (LOD- eng. Limit of Detection). LOD se može odrediti na više načina: vizuelno; na osnovu odnosa signal/šum bazne linije (S/N; na osnovu standardne devijacije kalibracione odgovora detektora i nagiba prave (S/N) se određuje merenjem signala analita koji se nalazi u poznatoj, veoma niskoj koncentraciji i uzorka bez analita, pri čemu se utvrđuje najniža koncentracija analita koju je moguće detektovati.

Za granicu detekcije obično se uzima vrednost koncentracija koje daju S/N = 3 ili S/N = 2. Teorijska granica detekcije se izračunava po formuli:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{a}$$

gde je:

σ standardna devijacija odgovora detektora dobijena višestrukim merenjem slepe probe,

a– nagib kalibracione krive

σ se dobija kao standardna devijacija serije merenja signala uzorka bez analita, ili kao standardna devijacija odsečka na ordinate dobijenog iz kalibracione prave sa koncentracijama bliskim LOD.

2.9.6. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije se naziva i Limit kvantifikacije (LOQ) i definiše se kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Ovaj parameter je naročito važan kod analize nečistoća ili

degradacionih produkata. Određuje se analogno određivanju detekcionog limita, koristeći $S/N = 10$ ili korišćenjem jednačine:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{a}$$

gde je:

σ – standardna devijacija odgovora detektora dobijena višestrukim merenjem slepe probe,

a – nagib kalibracione krive

3. OPŠTA HIPOTEZA

Postoji mogućnost određivanja i distribucije niklozamida u tkivima i organima šarana primenom HPLC-DAD-FLD i MS-MS-a. Ta distribucija biće registrovana instrumentima u kontrolisanim uslovima.

Razrađujuće hipoteze:

1. Primenom HPLC-DAD metode moguće je odrediti NIC i CNA u mesu i organima šaranskih mladunaca.
2. Primenom HPLC-FLD metode moguće je odrediti CSA u mesu i organima šaranskih mladunaca.
3. Određivanje NIC, CSA i CNA u mesu i organima šaranskih mladunaca, moguće je primenom HPLC-MS-MS tehnike.
4. U mišićnom tkivu šaranskih mladunaca se primenjenom analitičkom tehnikom ne mogu naći ostaci NIC, CSA i CNA nakon jedanaest dana od tretmana sa peletiranom hranom koja sadrži niklozamid.
5. U organima šaranskih mladunaca se primenjenom analitičkom tehnikom ne mogu naći NIC, CSA i CNA trinaest dana od tretmana sa peletiranom hranom koja sadrži niklozamid.

4. MATERIAL I METODE

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći hemijski reagensi, standardni rastvori i oprema.

4.1. Hemijski reagensi, standardni rastvori i oprema

- Acetonitril (ACN), HPLC čistoće, Sigma Aldrich, (USA), kataloški broj: 271004;
- Metanol (MeOH), HPLC čistoće (Sigma Aldrich) (USA), kataloški broj: 322415;
- Fosforna kiselina (85%, Vt), (Fisher Scientific-a(USA), kataloški broj: 28905;
- Mravlja kiselina (FA); Sigma Aldrich, (USA), kataloški broj: F0507;
- Amonijum acetat (NH₄OAc), Sigma Aldrich, (USA), kataloški broj: A1542;
- Standard niklozamida (98,7 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Nemačka), kataloški broj: C15510000;
- Standard CNA (99,3 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Nemačka), kataloški broj: C11452800;
- Standard CSA (98 %), Sigma Aldrich, (USA), kataloški broj: 101468079;
- Siringe filter, nylon, 13mm; 0,4µm. Cronus Filter (UK), kataloški broj: FFNN1345-100.

Radni rastvori:

Za sva razblaženja korišćena je dejonizovana voda predhodno filtrirana kroz membranski filter prečnika pora od 0,2 µm, proizvođača Lab Logistics Group GmbH.

Osnovni rastvor (OR) NIC, CSA, CNA pripremljen je rastvaranjem 10 mg NIC, CSA i CNA sa metanolom u normalnom sudu od 10 mL. Osnovni rastvor NIC-a je napravljen u koncentraciji od 987 µg/mL, CSA u koncentraciji od 980 µg/mL i CNA u koncentraciji od 993 µg/mL u ukupnoj količini od 10 mL rastvora. Rastvori su čuvani zaštićeni od svetlosti na 4°C. Osnovni rastvor je pravljen prema sledećoj formuli:

$$W=V \times C$$

W-masa (mg) NIC, CSA, CNA potrebna za pripremu osnovnog rastvora

V-potrebna zapremina rastvora (mL)

C- koncentracija osnovnog rastvora ($\mu\text{g/mL}$).

Radni rastvori 1 (RR_1), približne koncentracije od $5 \mu\text{g/mL}$, pravljene su svakodnevno razblaživanjem $0,05 \text{ mL}$ osnovnog rastvora u ukupnoj zapremini od 10 mL . Dobijene radne koncentracije NIC, CSA i CNA su retrospektivno iznosile: $4,93$; $4,90$ i $4,96 \mu\text{g/mL}$.

Radni rastvor 2 (RR_2) približne koncentracije od $0,5 \mu\text{g/mL}$ je pravljene na dnevnom nivou razblaživanjem RR_1 rastvora. Dobijene radne koncentracije RR_2 za NIC, CSA i CNA su retrospektivno iznosile: $0,493$; $0,490$ i $0,496 \mu\text{g/mL}$.

- Mravlja kiselina (FA) (1%), je pripremana svakodnevno rastvaranjem 1 mL mravlje kiseline u 99 mL ACN.
- 1 M amonijum acetat(NH_4OAc), dobijen je rastvaranjem $19,27 \text{ g}$ NH_4OAc u 250 mL dejonizovane vode. Rastvor se čuva na $4 \text{ }^\circ\text{C}$;

Korišćena oprema:

- LC-MS-MS, Agilent 1290 opremljen sa kvatenerna pumpom, autosemplerom (G4226A) sa termostatom (G1330B) i termostatiranom pećnicom za kolonu u kojoj je smeštena kolona Agilent Poroshell 120 EC-C18; $2,1 \times 150 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$. Detekcija je rađena na MS-MS detektoru (6410).

Mobilna faza A (voda) i B (acetonitril) su zakišeljene sa 0.1% mravlje kiseline.

- HPLC, Thermo Scientific Ultimate 3000 opremljen sa kvatenernom pumpom, autosemplerom sa termostatom (AC3000) i termostatiranom pećnicom za kolonu u kojoj je smeštena kolona Thermo C18; $250 \text{ mm} \times 3 \mu\text{m} \times 4,6$. Detekcija je rađena sa UV-VIS i FLD detektorima. HPLC sistem je kontrolisan softverom *Chromeleon*.

- Vaga (Shimadzu AX20), Shimadzu Corporation, Japan;
- Centrifuga (Humax 14k), GlobeTech Media, USA;
- Ultrazvučno vodeno kupatilo (Iskra);
- Aparat za dejonizovanu vodu (TKA Micromed), Thermo Scientific, USA;
- Vazdušni kompresor za obogaćivanje vode kiseonikom (Resun LP-60), Kina;
- Sonda sa OxyGuard sistemom za praćenje koncentracije kiseonika, Danska;
- Instrument za automatsko merenje provodljivosti i sadržaja rastvorenog kiseonika, MULTI 340i/SET (WTW), Nemačka;
- Automatska hranilica sa trakom (AGK Kronawitter GmbH), Nemačka.

Za pripremu rastvora i uzoraka je korišćen uobičajni laboratorijski pribor a eksperiment je izveden u laboratoriji akreditovanoj prema zahtevima standarda ISO 17025.

4.2. Uslovi hromatografskih razdvajanja

Uslovi hromatografskog određivanja NIC, CSA i CNA-a na HPLC-u su dati u Tabelama 2, 3 i 4.

Tabela 2. Hromatografski uslovi određivanja NIC-a na HPLC-u sa DAD detektorom

Vreme (min)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)	Temperatura pećnice (°C)	Detektor
0	0,9	40	60	30	DAD (335 nm)
10	0,9	40	60		

A-Voda sa 0,1% H₃PO₄

B-Acetonitril

Tabela 3. Hromatografski uslovi određivanja CNA i-CSA HPLC-u opremljenim sa DAD i FLD detektorom

Vreme (min)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)	Temperatura pećnice (°C)	Detektor
0	0,8	40	60	30	DAD (211nm);
10	0,8	40	60		

A-Voda sa 0,1% H₃PO₄

B-Metanol

Tabela 4. Hromatografski uslovi određivanja CSA HPLC-u opremljenim sa FLD detektorom

Vreme (min)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)	Temperatura pećnice (°C)	Detektor
0	0,8	40	60	30	FLD (Ex-315; Em-470nm)
10	0,8	40	60		

A-Voda sa 0,1% H₃PO₄

B-Metanol

Hromatografski uslovi sa određivanje NIC, CSA i CNA na LC-MS-MS-u dati su u Tabeli 5.

Tabela 5. Hromatografski uslovi određivanja NIC-a, CSA i CNA na LC-MS-MS-u

Vreme (min)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)	Temperatura pećnice (°C)	Detektor
0	0,3	90	10	40	MS-MS
0,5	0,3	90	10		
8	0,3	0	100		

A- Voda sa 2% mravlje kiseline (v/v)

B- Acetonitril sa 2% mravlje kiseline (v/v)

Tabela 6. Parametri akvizicije za MS - MS određivanje niklozamida i njegovih metabolita

MS-MS parametri	NIC	CSA	CNA
Interfejs	ESI-	ESI-	ESI-
Jonska tranzicija (m/z)	325.0→171.0	170.8→126.8	170.7→134.7
Fragmentaciona energija (V)	145	130	110
Koliziona energija	15	11	12
Retenciono vreme (min)	11.27	8.87	8.27

4.3. Uzorci ribe i dobrobit životinja

Za izvođenje eksperimenta, za potrebe ove doktorske disertacije, korišćena je jednogodišnja šaranska mlađ izlovljena iz ribnjaka Kapetanski Rit. Eksperiment sa ribama je izveden u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja ("Službeni glasnik RS" br. 41/09), a odobren je od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine,

Rešenje br: 22/346-3. Vodeći računa o humanom postupanju sa životinjama u skladu sa Zakonom, izlovljene ribe su transportovane do Laboratorije za ishranu riba, Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu, u kojoj je izveden eksperiment. Laboratorija je takođe, ovlašćena od strane nadležnog Ministarstva za oglede nad životinjama (ribama). Sačinjavale su je dve povezane prostorije, jedna za pripremu i realizaciju eksperimenata, sa bazenima za pripremu vode i gajenje riba, a druga za skladištenje, čuvanje i pripremu hrane i uzimanje uzorka riba.

Pri izvođenju eksperimenta vodilo se računa da voda kojom su punjeni tankovi i u koje je smeštena riba bude dobrog kvaliteta, da je oslobođena organskih materija i rezualnog hlora. Fizičke i hemijske osobine vode (temperatura, koncentracija kiseonika, zasićenje vode kiseonikom, elektroprovodljivost i pH) su svakodnevno merene u svakom tanku multifunkcionalnim mernim instrumentima. Riba je žrtvovana u laboratoriji, pri čemu se vodilo računa o prikladnom načinu postupanja i žrtvovanja. U skladu sa etičkim principima nakon žrtvovanja ribe su sekcirane a meso i organi razvrstani u petri šolje i jasno obeležavani. Uzorci su skladišteni u frižiderima do analize. Za analizu je uzeto ukupno 66 uzoraka mišićnog tkiva, jetre, bubrega i kože.

4.4. Eksperimentalni uslovi uzgajanja ribe ishranom sa dodatkom niklozamida

Za eksperiment uzgajanja šaranske ribe uz dodatak niklozamida uzeto je 96 jedinki prosečne mase od oko 60g. Po 24 jedinke su ubačene u četiri bazena A₀, A₁, A₂, A₃ U bazenu A₀, bila je kontrolna grupa riba koja je hranjenja sa peletiranom hranom bez dodatka niklozamida. Riba u bazeni A₁, A₂, A₃ je tokom pet dana hranjenja sa peletiranom hranom koja je sadržaja 2 g/kg niklozamida. Nakon pet dana tretmana ribe sa hranom koja je sadržala niklozamid, počelo je praćenje koncentracije i distribucije niklozamida i njegovih metabolita u mišićnom tkivu i organima ribe.

Iz kontrolne grupe, bazen A₀, uzorkovane su tri jedinke šestog dana od početka eksperimenta. Nakon seciranja i razvrstavanja organa urađena je analiza koja je potvrdila odsustvo niklozamida i metabolita. Riba iz kontrolne grupe je dalje korišćena za potrebe validacije metode kroz matriks.

U bazenima A₁, A₂, A₃ uzorkovanje je vršeno svakog drugog dana od prestanka hranjenja ribe sa peletiranom hranom koja je sadržala niklozamid.

Tabela 7. Šematski prikaz/algorithm ogleda na životinjama

Period aklimatizacije i adaptacije jedinki na laboratorijske uslove.			
Kontrolna grupa A ₀	Grupa riba tretirana hranom sa dodatkom 0,2% niklozamida		
Bazen A ₀	Ogledna grupa A ₁	Ogledna grupa A ₂	Ogledna grupa A ₃
24 jedinke	24 jedinke	24 jedinke	24 jedinke
Prosečna nasadna masa jedinki oko 60 grama			
Hranjenje 5 dana kontrolnom hranom	Hranjenje 5 dana hranom sa dodatkom 0,2% niklozamida		
Prvi dan nakon perioda hranjenja riba hranom sa dodatkom niklozamida, vršeno je anesteziranje, žrtvovanje i uzorkovanje jedinki (organa i tkiva)			
3 jedinke	3 jedinke	3 jedinke	3 jedinke
Analiziranje izdvojenih organa na prisustvo rezidua niklozamida kao i njegovih metabolita primenom instrumentalne tehnike tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC)			
Obrada rezultata			
Nastavljeno sa hranjenjem svih riba hranom koja je korišćena u kontrolnoj grupi.			
Svakog drugog dana, obavljanje uzorkovanje do momenta kada utvrđivanja odsustva niklozamida i njegovih metabolita u uzetim uzorcima tkiva i organa			
Nema potrebe za daljim žrtvovanjem riba u ovoj grupi	3 jedinke	3 jedinke	3 jedinke
Kada je ustanovljeno odsustvo niklozamida i njegovih metabolite, uzorkovanje se prekinulo, eksperiment se završio a preostale jedinke iz kontrolnih grupa su vraćene u prirodne uslove.			

Iz svakog bazena je uzorkovano po po tri jedinke 1, 3, 7, 9, 11, 13 i 15 dana, računato od dana prestanka hranjenja ribe sa hranom koja sadrži niklozamid. Za potrebe eksperimenta žrtvovano je ukupno 66 jedinki šaranskih mladunaca.

4.4.1. Parametri kvaliteta mesa šarana

Tokom ovog eksperimenta praćeni su osnovni parametri kvaliteta mesa:

- Sadržaj vlage, gravimetrijska metoda (SRPS ISO 1442:2008)
- Sadržaj pepela, gravimetrijska metoda (SRPS ISO 936:1999)
- Sadržaj proteina, metoda totalnog sagorevanja, AOAC 992: 2015;
- Sadržaj masti, gravimetrijska metoda (SRPS ISO 1443:1992)
- Ukupan holesterol, gasno-hromatografska metoda (SRPS EN ISO 11702:2017),
- Sadržaj masnih kiselina, gasno-hromatografska metoda (SRPS EN ISO 12966-4:2016).

4.4.2. Analize za određivanje sadržaja niklozamida i njegovih metabolita CSA i CNA u tkivu i organima šaranskih mladunaca

Kontrolni uzorci ribe, riblje meso, jetra, bubrezi i koža zamrznuti su i skladišteni u plastićnim kontejnerima u zamrzivaću do analize. Pre analize uzorci su delimićno odleđeni i homogenizovani. Od homogenizovanih uzoraka je odmereno približno 1g i preneto u centrifugalne tube od 25 mL. Uzorci mesa, jetre, bubrega i kože (n = 7) i jedna kontrola su obogaćena sa 1 mL radnog rastvora RR₁ koji je sadržao NIC, CSA i CNA, uz pomoć volumetrijske pipete. Obogaćeni uzorci tkiva i organa su ostavljeni da odstoje najmanje 30 minuta pre ekstrakcije. Ekstrakcija uzoraka je vršena sa 3 mL mobilne faze u ultrazvućnom kupatilu tokom 30 minuta.

Po završenoj ekstrakciji uzorci su centrifugirani i dekantovan je sirovi ekstrakt. 1 mL ekstrakta je filtriran kroz mikrofiltere prećnika pora od 0,45 µm (*Cronus Siringe Filter Najlon*). Dobijeni ćisti ekstrakt je injektovan u HPLC sistem kolićini od 10 µL. Priprema realnih uzorak je vršena na isti naćin. Analiza dobijenih ekstrakata je izvedena na HPLC-u (*Thermo Fisher Scientific*) u skladu sa validovanom EPA 8131 metodom. Za razdvajanje analita korišćena je C18 kolona.

4.5. Postupak izvođenja validacije metode

Za potrebe validacije metode EPA 8131, za određivanje NIC, CSA i CNA, ispitana je linearnost, ponovljivost, reproduktivnost, tačnost, granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ), (SANCO; 2013). Metoda je optimizovana kako za HPLC-DAD-FLD tako i za HPLC-MS-MS. Zahtevi za validaciju metode za određivanje NIC, CSA i CNA su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Kriterijumi prihvatljivosti metode za određivanje NIC, CSA i CNA

Kriterijumi prihvatljivosti	HPLC-DAD-FLD			HPLC-MS-MS		
	NIC	CSA	CNA	NIC	CSA	CNA
Opseg kalibracije	0,05-1 µg/mL			0,15-2,20 µg/mL	1,10-2,0 µg/mL	0,001-0,6 µg/mL
Linearnost (R^2)	>0,99			>0,99		
Ponovljivost	≤5%			≤5%		
Reproduktivnost	≤5%			≤5%		
Tačnost	70-130%			70-130%		

4.5.1. Linearnost

Linearnost detektora kod HPLC-DAD-FLD određivanja je testirana u opsegu od 0.05-1 µg/mL. Pripremljeno je 5 rastvora različitih koncentracija: 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 i 1 µg/mL i snimljena je standardna prava u pet koncentracionih nivoa.

Linearnost detektora kod HPLC-MS-MS određivanja je testirana u opsegu od 0,15-2,2 µg/mL za NIC; 0,10-2,0 µg/mL za CSA i u opsegu od 0,001-0,6 µg/mL za CNA.

4.5.2. Ponovljivost

Ponovljivost je ispitana u pet ponavljanja, korišćenjem kontrolnih (blanko) uzoraka mišićnog tkiva, jetre, bubrega i kože šaranskih mladunaca obogaćenih sa NIC,

CSA i CNA. Svaki od pet uzoraka tkiva i organa je obogaćen sa RR₁ rastvorom i ostavljen da odstoji na sobnoj temperaturi, najmanje pola sata. Nakon isteka ovog vremena uzorak je pripremljen u skladu sa metodom a prečišćen ekstrakt injektovan u HPLC sistem.

4.5.3. Reproductivnost

Reproduktivnost u eksperimentu je određena određena na obogaćenom uzorku mesa, jetre bubrega i kože, analiziranjem serije od pet uzoraka na HPLC-u i LC-MS-MS-u. U Tabeli 9 su date vrednosti odvage uzoraka i količina radnih rastvora koje su korišćene za obogaćivanje uzoraka u svrhu određivanja preciznosti, reproduktivnosti i tačnosti merenja.

4.5.4. Tačnost (prinos metode)

Određivanje procenta prinosa ili tzv. “*recovery*” vrednost je izvedena tako što se uzorku i slepoj probi dodata poznata količina čistog standarda (RR₁), Tabela 9. Nakon ekstrakcije i prečišćavanja je određena koncentracija analita NIC, CSA i CNA u obogaćenim uzorcima mesa, bubrega, jetre i kože.

Tabela 9. Prikaz reprezentativnih matrixa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja preciznosti, reproduktivnosti i tačnosti merenja

Matrix	Odmerena masa uzorka (g)	Količina radnog rastvora za obogaćenje(μl) (RR ₁ ~5 μg/mL)	Očekivana koncentracija u matriksu (μg/g)		
			NIC	CSA	CNA
Meso	3	30	0,0496	0,0490	0,0493
Bubreg	1	10			
Jetra	0.5	5			
Koža	0.5	5			

4.5.5. Granica detekcije

Granica detekcije je izračunata kao koncentracija analita koja daje signal veći tri puta od signala bazne linije. Granica detekcije je ispitana merenjem signala detektora sa padajućim nizom koncentracija.

Prikaz reprezentativnih matrixa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja LOD dat je u Tabeli 10.

4.5.6. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (LOQ) je izračunata kao koncentracija analita koja daje signal veći deset puta od signala bazne linije.

Prikaz reprezentativnih matrixa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja LOQ dat je u Tabeli 10.

Tabela 10. Prikaz reprezentativnih matrixa i količina radnih rastvora za obogaćenje s ciljem određivanja LOQ i LOD.

Matrix	Odmerena masa uzorka (g)	Količina radnog rastvora za obogaćenje(μ l) (RR ₂ ~0,5 μ g/mL)	Očekivana koncentracija u matrixu (μ g/g)
Meso	3	30	0,005
Bubreg	1	10	0,005
Jetra	0,5	5	0,005
Koža	0,5	5	0,005

5. REZULTATI

U ovom poglavlju su prikazani rezultati optimizacije uslova za izvođenje eksperimenta kao i rezultati optimizacija metode za određivanje sadržaja NIC, CSA i CNA primenom HPLC-DAD-FLD i LC-MS-MS tehnike. U tabeli 11 su prikazane fizičko-hemijske osobine vode u bazenima u kojima je uzgajana riba tokom eksperimenta.

Tabela 11. Prosečne, minimalne, maksimalne vrednosti pH, elektroprovodljivosti i rastvorenog kiseonika u bazenima za uzgajanje

	Bazen A ₀ (kontrolne grupe)	Bazen A ₁ , A ₂ , A ₃ (ogledne grupa)		
pH				
Prosek	7,43	7,52	7,46	7,45
Min	7,34	7,35	7,37	7,36
Max	7,6	7,69	7,61	7,64
Elektroprovodljivost (μS/cm)				
Prosek	463	464	462	462
Min	433	434	431	431
Max	514	517	511	512
Rastvoreni kiseonik (mg/L O ₂)				
Prosek	8,02	8,07	8,37	8,49
Min	6,58	6,58	6,75	6,74
Max	8,66	9,27	9,22	9,33

Kako bi se dokazao uticaj tretmana a izbegao uticaj drugih faktora, prilikom postavke eksperimenta vodilo se računa o jednakosti nasadnih masa riba (da u svim bazenima bude isti broj riba sa istim, odnosno približnim ukupnim i prosečnim masama), a tokom trajanja eksperimenta da posmatrane vrednosti ambijentalnih uslova budu jednake, odnosno što približnije zahtevima ogledne vrste riba (Tabela 12) U danima kada je bilo uginuća ili kada je uzorkovana riba, ukupna količina hrane, od tog dana pa na dalje, korigovana je za količinu hrane koja je bila proporcionalna masi uginule ili žrtvovane ribe.

Tabela 12. Prosečne nasadne mase riba u kontrolnoj i oglednoj grupi

Red. br. riba	Bazen A ₀ (kontrolne grupe)	Bazen A ₁ , A ₂ , A ₃ (ogledne grupa)		
	Masa (g)			
1.	57,1	59,9	65,0	71,0
2.	63,1	57,2	69,6	73,6
3.	46,1	58,9	41,4	58,5
4.	33,6	48,7	42,1	61,5
5.	52,3	54,4	68,6	47,6
6.	68,0	67,6	63,3	51,6
7.	77,0	82,1	70,0	54,8
8.	60,8	61,5	57,3	62,4
9.	61,8	64,1	45,7	51,7
10.	66,9	81,9	91,4	58,5
11.	45,8	63,9	55,8	62,3
12.	56,7	63,0	70,1	45,5
13.	66,0	51,4	59,6	72,4
14.	90,5	81,4	48,0	74,7
15.	56,7	38,6	67,1	67,2
16.	73,2	54,9	55,6	55,6
17.	39,8	75,8	60,2	60,6
18.	58,2	46,8	62,2	72,4
19.	62,4	41,9	79,1	68,2
20.	76,7	60,5	42,5	40,8
21.	55,8	51,5	53,4	51,1
22.	56,2	62,9	58,7	71,7
Ukupna masa	1324,4	1328,8	1326,6	1333,4
Prosečna masa	60,2	60,4	60,3	60,6
Min	33,6	38,6	41,4	40,8
Max	90,5	82,1	91,4	74,7

5.1. Hemijski kvalitet mesa

U Tabeli 13. su date vrednosti hemijskog sastava mesa jednogodišnjih konzumnih šarana.

Tabela 13. Hemijski sastav mesa jednogodišnjih šarana

Parametar	Šaran
Sadržaj vlage (%)	80,36
Sadržaj proteina (%)	16,21
Sadržaj masti (%)	2,42

Sadržaj pepela (%)	1,02
Ukupni holesterol (mg/100 g)	55,81
Masna kiselina, %	
Kaprilna kiselina (C8:0)	0 ^c
Miristinska kiselina (C14:0)	2,87
Pentadekanska kiselina (C15:0)	0,56
Palmitinska kiselina (C16:0)	19,4
Palmitoleinska kiselina (C16:1)	13,84
Heptadekanska kiselina (C17:0)	0,71
Stearinska kiselina (C18:0)	3,91
Oleinska kiselina (C18:1cis-9)	30,20
Vakcenska kiselina (C18:1cis-11)	7,17
Linolna kiselina (C18:2, n-6)	8,79
γ-Linolenska kiselina (C18:3, n-6)	0,23
Linolenska kiselina (C18:3, n-3)	2,71
Arahidska kiselina (C20:0)	0,14
cis 11-eikosenska kiselina (C20:1)	1,74
Eikozadienska kiselina C20:2	1,52
Eikozatrienska kiselina (C20:3, n-6)	0,76
Eikozatrienska kiselina C20:3, n-3	0,38
Arahidonska kiselina (C20:4, n-6)	2,42
Eikozapentaenoična kiselina (C20:5, n-3)	1,36
Eikozapentaenoična kiselina (C22:5, n-3)	0,65
Dokosaheksaenoična kiselina (C22:6, n-3)	0,87
SFA	27,59
MUFA	52,94
PUFA	19,7
n-6	13,73
n-3	5,97
n-3/ n-6	0,44
n-6/n-3	2,30
PUFA/SFA	0,71
USFA/SFA	2,63

Legenda: SFA – zasićene masne kiseline; MUFA –mononezasićene masne kiseline; USFA –nezasićene masne kiseline, PUFA –polinezasićene masne kiseline iz grupa n-3 (n-3 PUFA) i n-6 (n-6 PUFA), Ljubojević i sar., (2013).

5.2. Rezultati validacije metode

Rezultati dobijeni tokom validacije metode koji su obuhvatili proveru linearnosti, reproduktivnosti, ponovljivosti, tačnosti kao i određivanje LOQ i LOD vrednosti su prikazani u tačkama 5.2.1 do 5.2.6.

5.2.1. Linearnost

U Tabelama 14, 15 i 16 prikazane su jednačine prave (zavisnost odgovora detektora od koncentracije) za NIC, CSA i CNA i vrednost koeficijenta korelacije dobijene primenom HPLC-DAD-FLD i MS-MS-a.

Na Slikama 6-11 prikazane su kalibracione krive i hromatogrami NIC-a, CNA i CSA dobijeni na HPLC-DAD-FLD-u.

Tabela 14. Jednačina prave za NIC

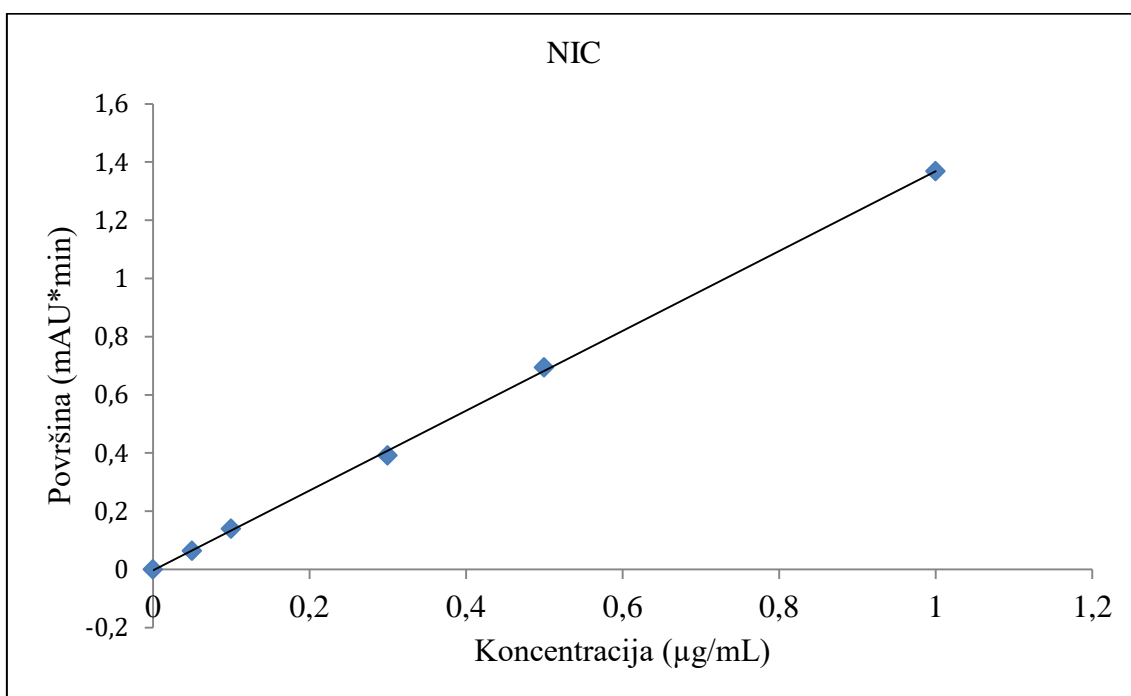
Analit	Detektor	Jednačina prave	R ²
NIC	DAD	$Y=1,3747X-0,0049$	0,9958
	MS-MS	$Y=11,955-11,77$	0,9986

Tabela 15. Jednačina prave za CNA

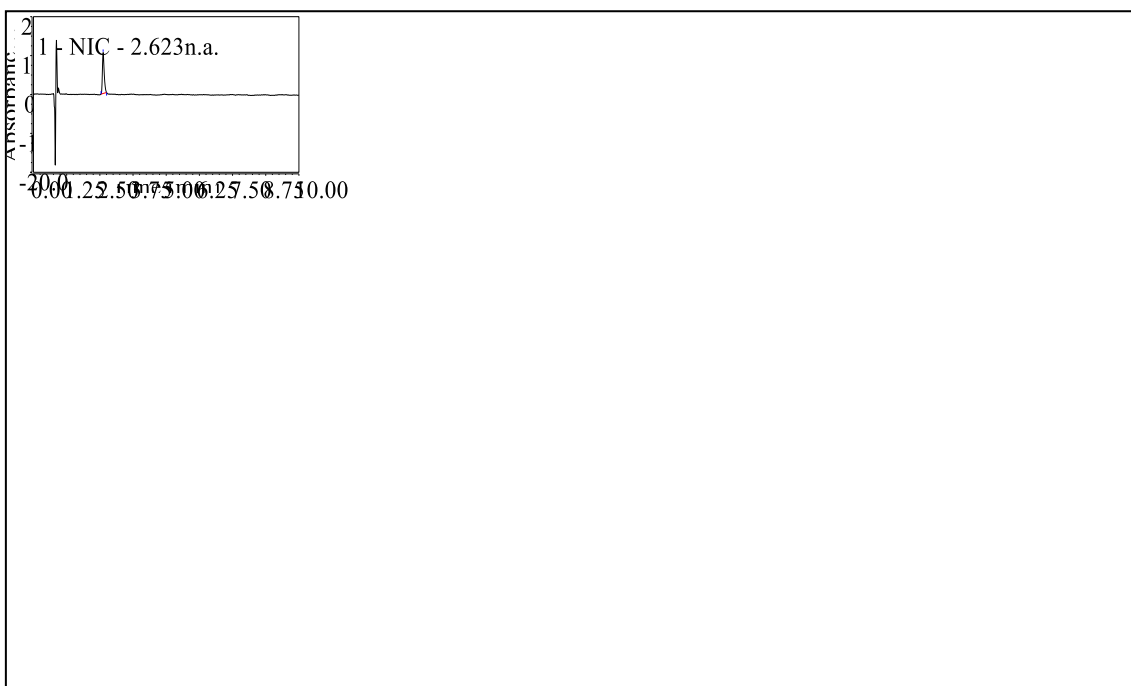
Analit	Detektor	Jednačina prave	R ²
CNA	DAD	$Y=0,9259X+0,0051$	0,9949
	MS-MS	$Y=6,5807X-0,2158$	0,9912

Tabela 16. Jednačina prave za CSA

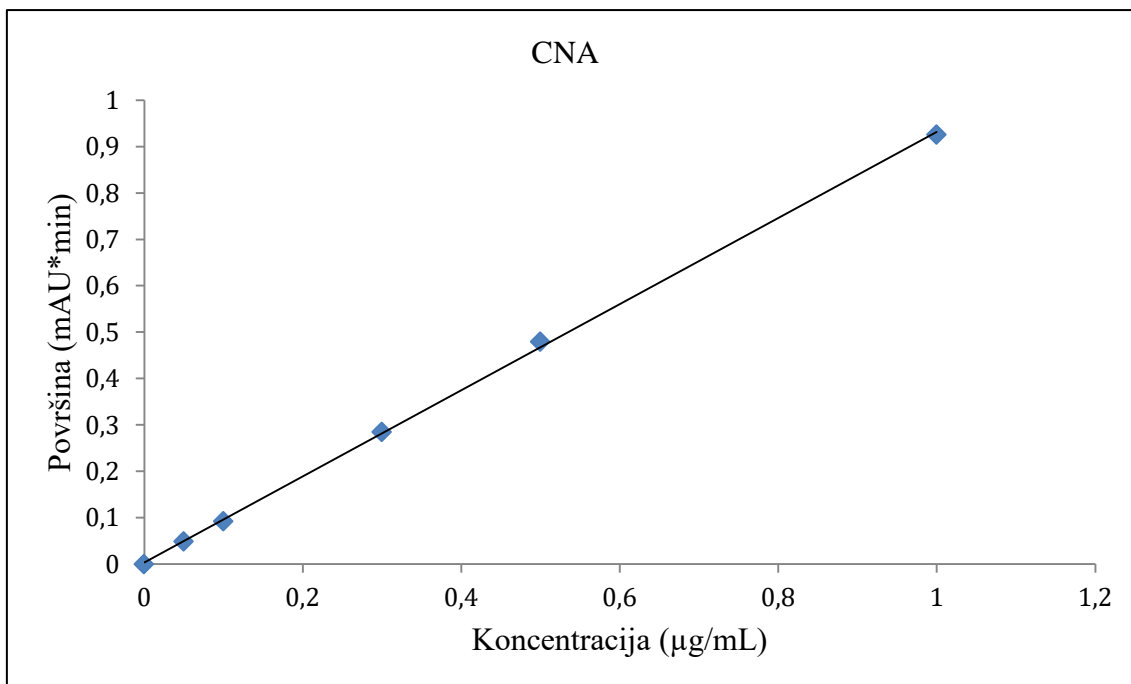
Analit	Detektor	Jednačina prave	R ²
CSA	FLD	$Y=348665X+512,14$	0,9999
	MS-MS	$Y=0,1168X+0,0838$	0,9958



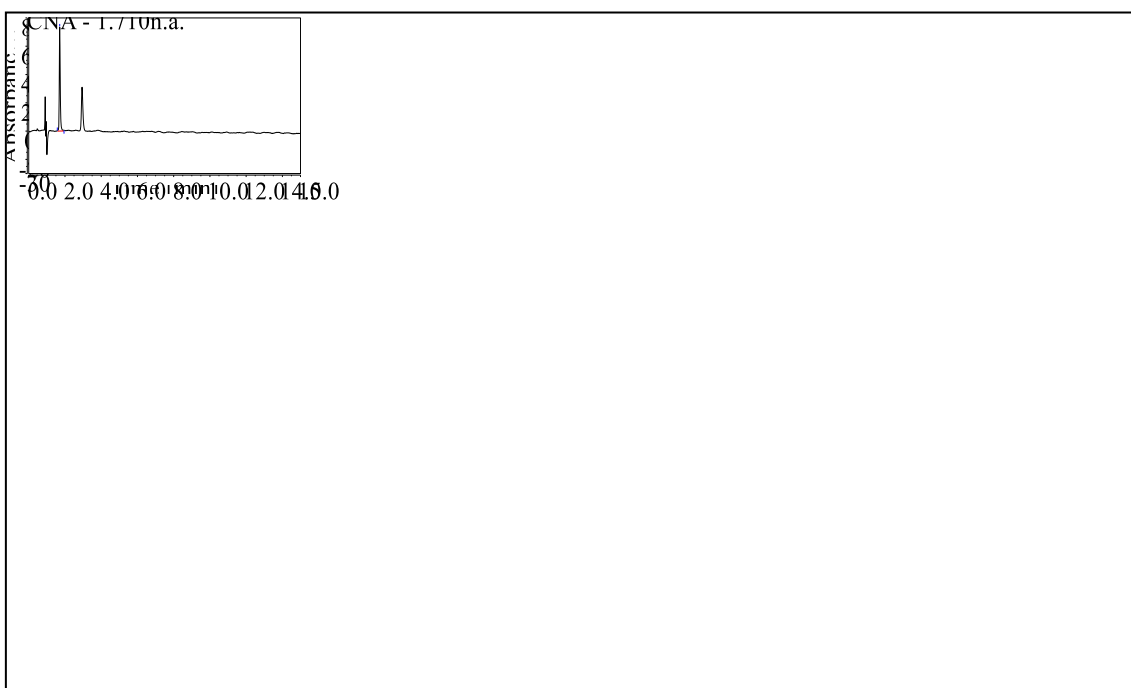
Slika 6. Kalibraciona kriva NIC-a snimljena na HPLC-DAD.



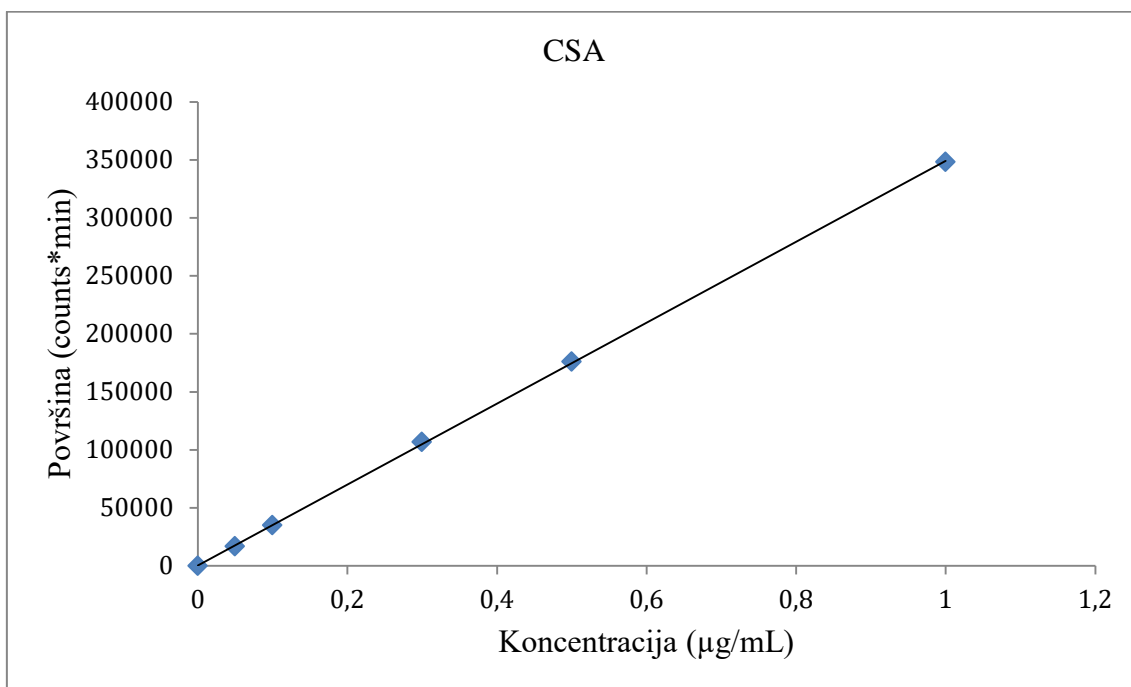
Slika 7. Hromatogram NIC-a snimljena na HPLC-DAD (UV 335nm)



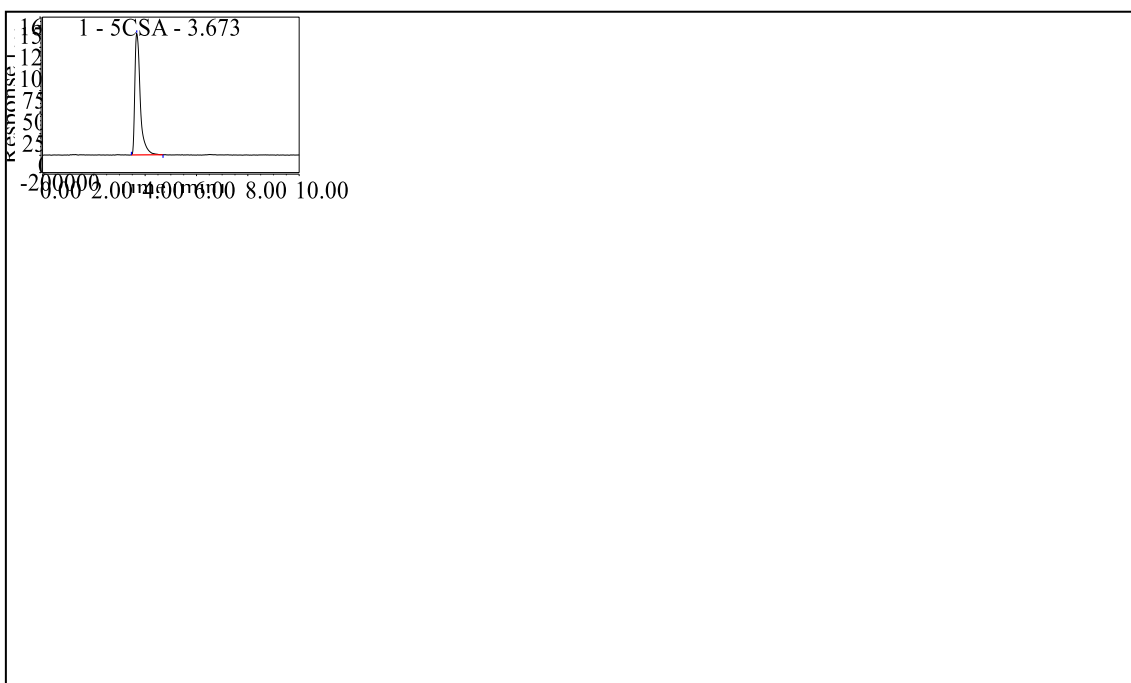
Slika 8. Kalibraciona kriva CNA snimljena na HPLC-DAD



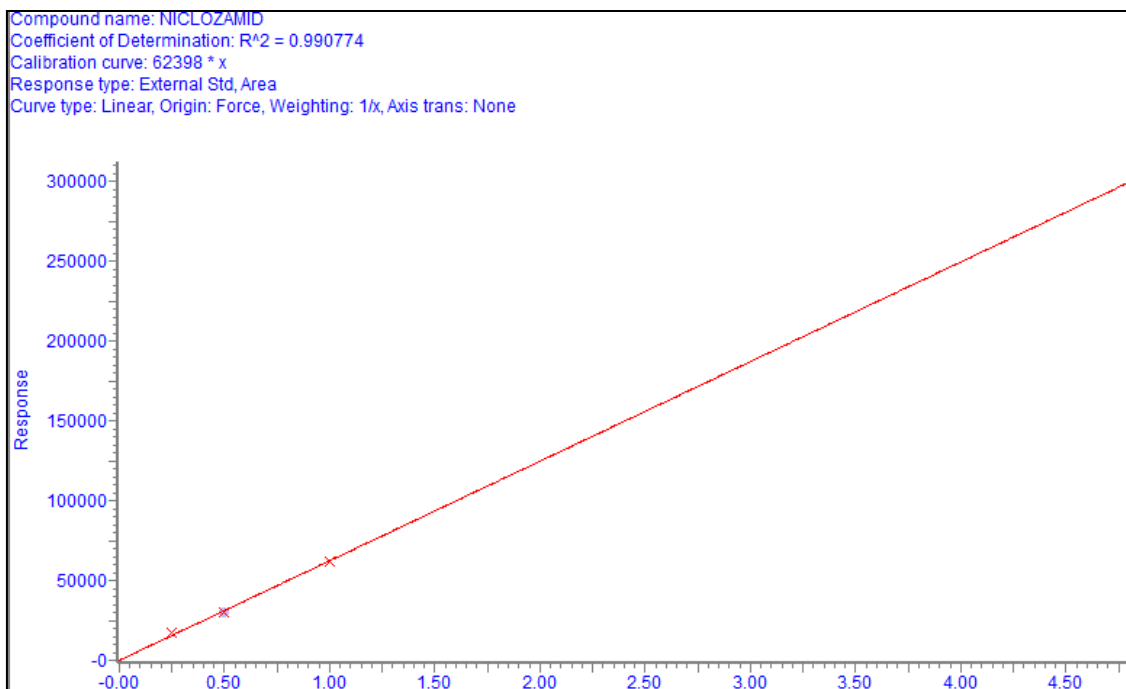
Slika 9. Hromatogram CNA snimljen na HPLC-DAD (UV 211 nm)



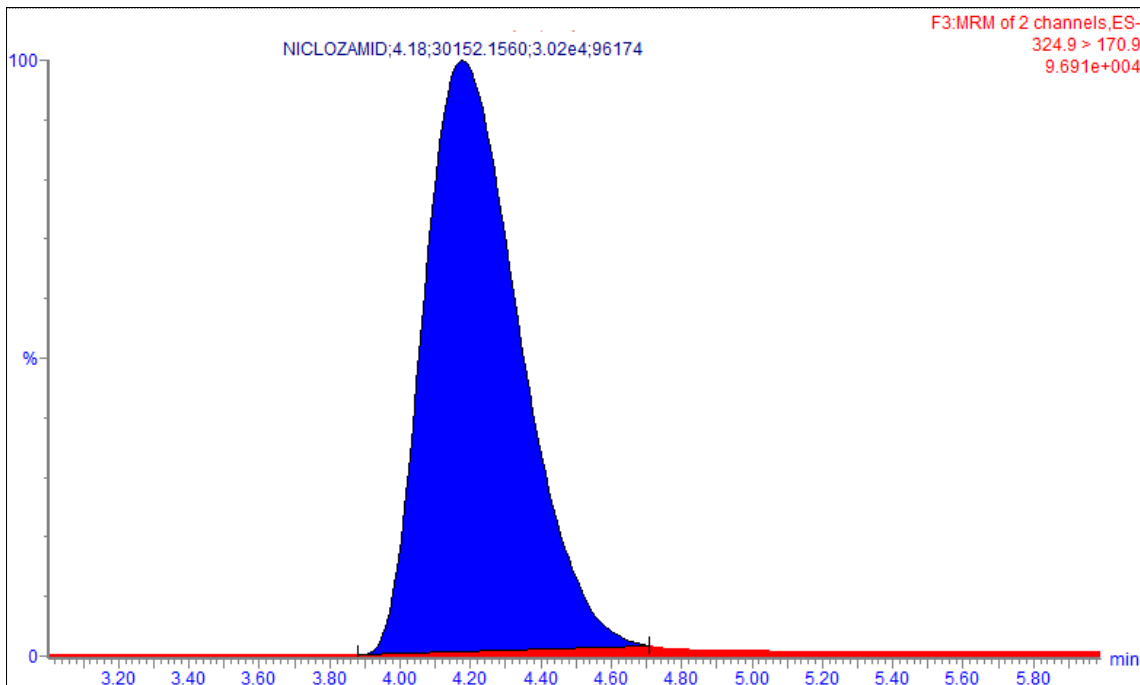
Slika 10. Kalibraciona kriva CSA snimljena na HPLC-FLD



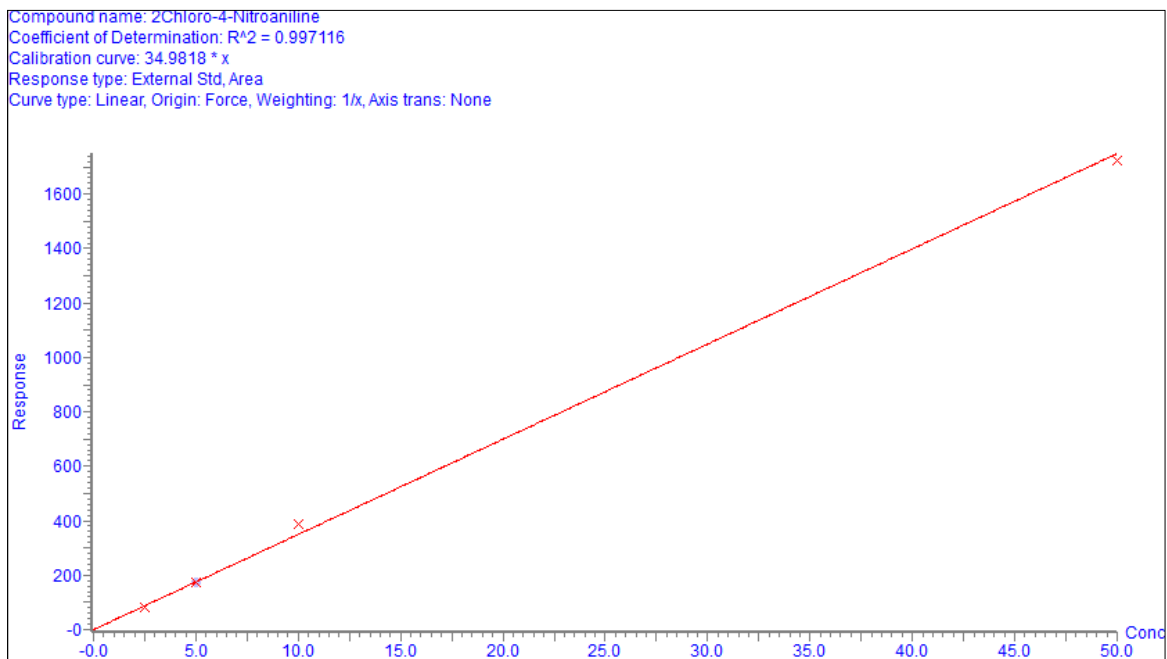
Slika 11. Hromatogram CSA snimljen na HPLC-FLD (Ex-315 / Em-470 nm)



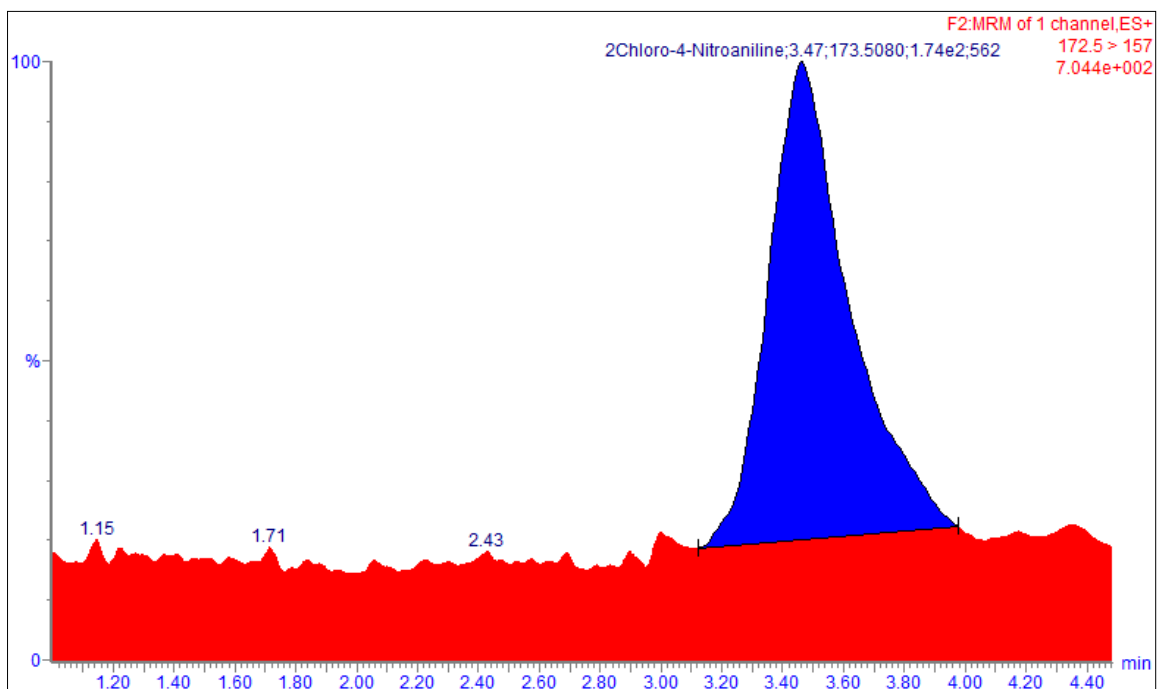
Slika 12. Kalibraciona kriva NIC snimljena na HPLC-MS-MS



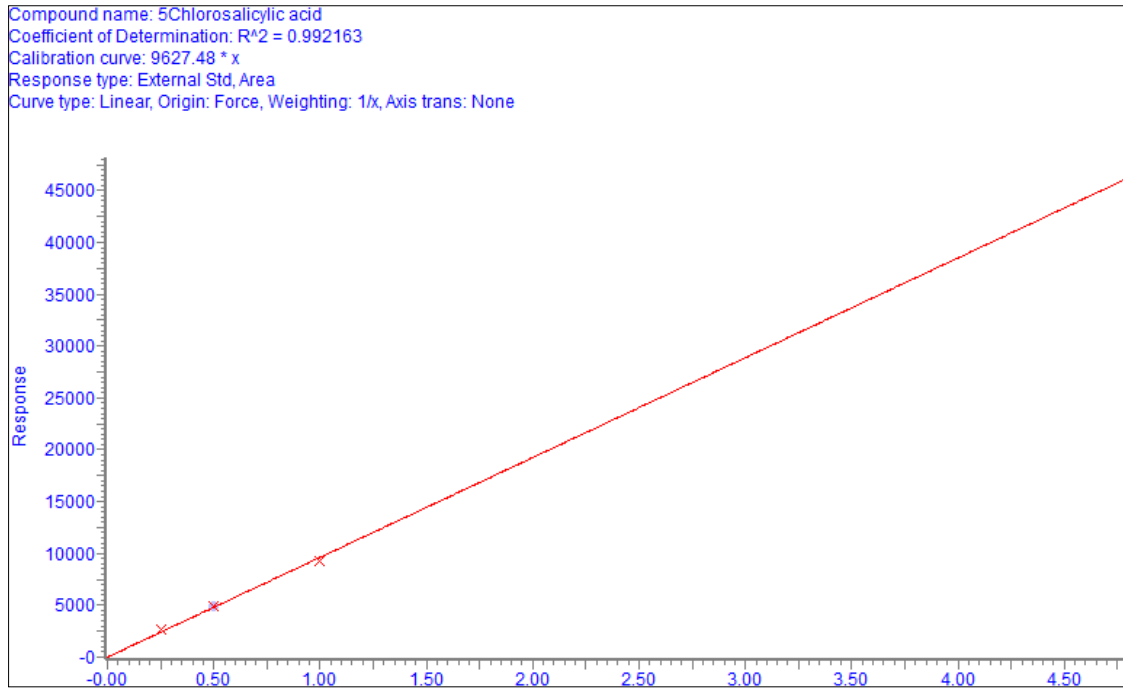
Slika 13. Hromatogram NIC snimljen na HPLC-MS-MS



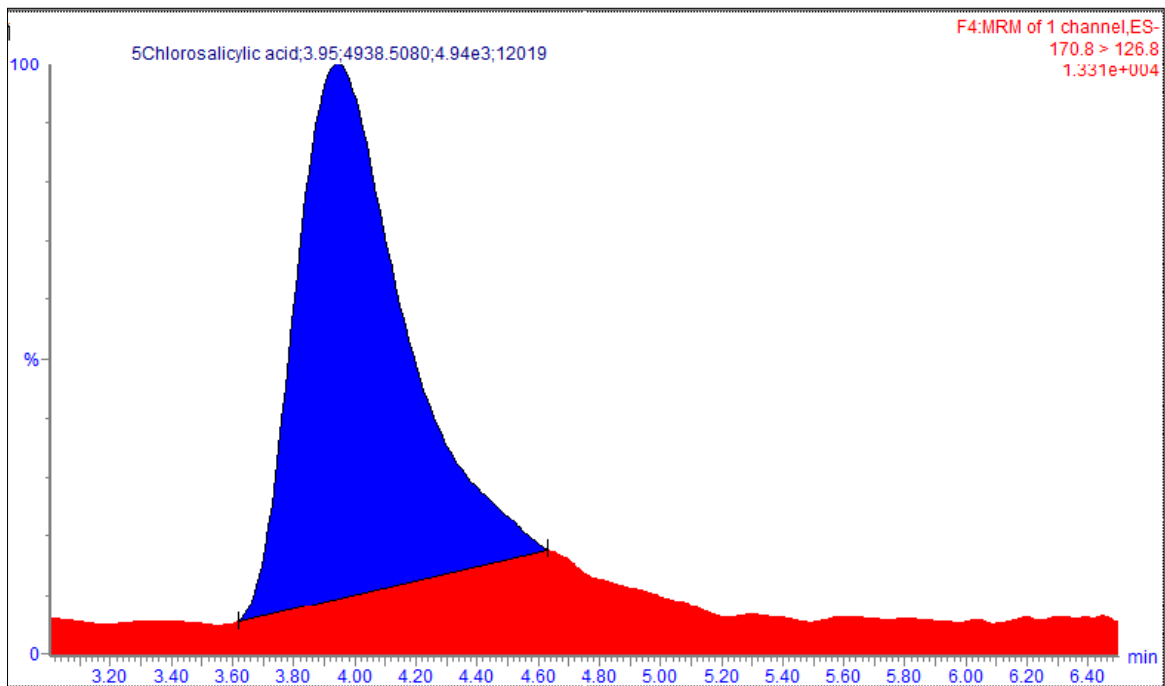
Slika 14. Kalibraciona kriva CNA snimljena na HPLC-MS-MS



Slika 15. Hromatogram CNA snimljen na HPLC-MS-MS



Slika 16. Kalibraciona kriva CSA snimljena na HPLC-MS-MS



Slika 17. Hromatogram CSA snimljen na HPLC-MS-MS

5.2.2. Ponovljivost

U Tabelama 17-19 prikazani su rezultati za ponovljivost određeni u uzorcima jetre, mesa, bubrega i kože, obogaćenih sa 0,0496 $\mu\text{g/g}$ NIC-a; 0,0490 $\mu\text{g/g}$ CSA i 0,0493 $\mu\text{g/g}$ CNA.

Tabela 17. Ponovljivost određivanja koncentracije niklozamida u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćen sa NIC

Redni broj ponavljanja	Mišićno tkivo ($\mu\text{g/g}$)	Jetra ($\mu\text{g/g}$)	Bubreg ($\mu\text{g/g}$)	Koža ($\mu\text{g/g}$)
1.	0,048	0,046	0,047	0,050
2.	0,049	0,046	0,048	0,051
3.	0,048	0,049	0,049	0,051
4.	0,047	0,048	0,048	0,050
5.	0,047	0,046	0,048	0,051
Xsr	0,0478	0,0470	0,0480	0,0506
SD	0,0008	0,0014	0,0007	0,0005
RSD, %	1,750	3,009	1,473	1,082

Xsr-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; RSD-relativna standardna devijacija

Tabela 18. Ponovljivost određivanja koncentracije CSA ($\mu\text{g/g}$) u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćenim sa CSA

Redni broj ponavljanja	Mišićno tkivo ($\mu\text{g/g}$)	Jetra ($\mu\text{g/g}$)	Bubreg ($\mu\text{g/g}$)	Koža ($\mu\text{g/g}$)
1.	0,051	0,048	0,049	0,048
2.	0,047	0,047	0,048	0,048
3.	0,048	0,047	0,049	0,049
4.	0,050	0,048	0,049	0,049

Redni broj ponavljanja	Mišićno tkivo (µg/g)	Jetra (µg/g)	Bubreg (µg/g)	Koža (µg/g)
5.	0,052	0,047	0,047	0,048
Xsr	0,0496	0,0474	0,0484	0,0484
SD	0,0021	0,0005	0,0009	0,0005
RSD, %	4,1807	1,1555	1,8480	1,1316

Tabela 19. Ponovljivost određivanja koncentracije CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži šaranskih mladunaca obogaćenim sa CNA

Redni broj ponavljanja	Mišićno tkivo (µg/g)	Jetra (µg/g)	Bubreg (µg/g)	Koža (µg/g)
1.	0,052	0,049	0,048	0,049
2.	0,052	0,049	0,049	0,048
3.	0,048	0,050	0,047	0,050
4.	0,049	0,051	0,048	0,050
5.	0,051	0,050	0,048	0,050
Xsr	0,0504	0,0498	0,0480	0,0491
SD	0,0018	0,0008	0,0007	0,0007
RSD, %	3,6043	1,6800	1,4731	1,4721

5.2.3. Reproductivnost

U Tabelama 20-22 predstavljeni su rezultati ispitivanja reproductivnosti izvršeni na dva aparata HPLC-DAD-FLD-u i LC-MS-MS-u, na uzorcima obogaćenim sa 0,0496 µg/g NIC-a, 0,0490 µg/g CSA i 0,0493 µg/g CNA.

Tabela 20. Rezultati određivanja reproduktivnosti za NIC dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-DAD i LC-MS-MS-u toku dva dana.

Matriks	Mišićno tkivo (µg/g)		Jetra (µg/g)		Bubreg (µg/g)		Koža (µg/g)	
	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS
1.	0,052	0,049	0,049	0,049	0,050	0,049	0,048	0,049
2.	0,052	0,049	0,049	0,048	0,051	0,049	0,048	0,049
3.	0,049	0,051	0,050	0,050	0,048	0,050	0,050	0,049
4.	0,049	0,051	0,051	0,051	0,049	0,049	0,049	0,048
5.	0,050	0,050	0,050	0,050	0,051	0,050	0,050	0,048
Xsr	0,0502		0,0497		0,0496		0,0488	
SD	0,0012		0,0009		0,0010		0,0007	
RSD, %	2,4488		1,9088		1,9478		1,6164	

Tabela 21. Rezultati određivanja reproduktivnosti za CSA dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-FLD i LC-MS-MS-u toku dva dana.

Matriks	Mišićno tkivo (µg/g)		Jetra (µg/g)		Bubreg (µg/g)		Koža (µg/g)	
	HPLC-FLD	LC-MS-MS	HPLC-FLD	LC-MS-MS	HPLC-FLD	LC-MS-MS	HPLC-FLD	LC-MS-MS
1.	0,051	0,049	0,047	0,049	0,050	0,048	0,050	0,051
2.	0,052	0,049	0,048	0,049	0,050	0,049	0,049	0,050
3.	0,049	0,048	0,050	0,050	0,048	0,047	0,049	0,051
4.	0,047	0,048	0,048	0,050	0,051	0,047	0,050	0,049
5.	0,05	0,05	0,048	0,050	0,051	0,047	0,049	0,049
Xsr	0,0493		0,0489		0,0488		0,0497	
SD	0,0015		0,0011		0,0016		0,0008	
RSD, %	3,03		2,2505		3,32		1,66	

Tabela 22. Rezultati određivanja reproduktivnosti za CNA dobijeni analiziranjem obogaćenih uzoraka na HPLC-DAD i LC-MS-MS-u toku dva dana.

Matriks	Mišićno tkivo ($\mu\text{g/g}$)		Jetra ($\mu\text{g/g}$)		Bubreg ($\mu\text{g/g}$)		Koža ($\mu\text{g/g}$)	
	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS	HPLC-DAD	LC-MS-MS
1.	0,05	0,049	0,05	0,049	0,049	0,049	0,049	0,051
2.	0,051	0,048	0,049	0,049	0,048	0,049	0,050	0,050
3.	0,048	0,049	0,049	0,047	0,05	0,049	0,049	0,050
4.	0,049	0,049	0,048	0,048	0,048	0,050	0,051	0,050
5.	0,051	0,048	0,05	0,05	0,048	0,050	0,051	0,050
Xsr	0,0492		0,0489		0,0490		0,0501	
SD	0,0011		0,0010		0,0008		0,0007	
RSD, %	2,31		2,03		1,67		1,47	

5.2.4. Tačnost metode određivanja

U Tabeli 23 predstavljeni su rezultati ispitivanja tačnosti metode, predstavljeni prinosom metode.

Tabela 23. Tačnost metode određivanja NIC, CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži, izražena kao prinos metode (%), određena na aparatu HPLC DAD-FLD

Analit/detektor	Tačnost metode (%)			
	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
NIC/DAD	100,4	99,4	99,2	99,2
CNA/DAD	98,4	97,8	98,0	98,0
CSA/FLD	98,6	97,8	97,6	97,6

Tabela 24. Tačnost metode određivanja NIC, CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubregu i koži, izražena kao prinos metode (%), određena na aparatu LC-MS-MS-u.

Analit/detektor	Tačnost metode (%)			
	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
NIC/MS-MS	100,12	99,7	99,8	99,9
CNA/ MS-MS	99,8	100,8	99,8	99,9
CSA/ MS-MS	101,02	100,8	99,6	99,6

5.2.5. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ)

U Tabeli 25 i 26 predstavljeni su rezultati određivanja LOD i LOQ za NIC, CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca.

Tabela 25. Limit kvantifikacije (LOQ) za NIC određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOQ (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
NIC	DAD	1,6	1,5	1,6	1,5
	FLD	-	-	-	-
	MS-MS	0,4	0,4	0,4	0,4

Tabela 26. Limit kvantifikacije (LOQ) za CNA određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOQ (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
CNA	DAD	3,4	3,3	3,6	3,6
	FLD	12,0	14,0	13,5	13,2
	MS-MS	0,5	0,6	0,6	0,5

Tabela 27. Limit kvantifikacije (LOQ) za CSA određen na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOQ (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
CSA	DAD	28,0	25,3	27,3	23,0
	FLD	3,3	3,7	3,7	3,6
	MS-MS	0,5	1,0	1,0	0,6

Tabela 28. Limit detekcije (LOD) za NIC određeni na HPLC- DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOD (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
NIC	DAD	0,5	0,5	0,5	0,5
	FLD	-	-	-	-
	MS-MS	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela 29. Limit detekcije (LOD) za CNA određeni na HPLC- DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOD (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
CNA	DAD	1	1	1	1
	FLD	3,5	4,2	4,1	3,9
	MS-MS	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela 30. Limit detekcije (LOD) za CSA određeni na HPLC DAD-FLD i LC-MS-MS-u

LOD (µg/kg)					
Analit	Detektor	Mišićno tkivo (n=10)	Jetra (n=10)	Bubreg (n=10)	Koža (n=10)
CSA	DAD	8,4	7,6	8,2	6,9
	FLD	1	1,1	1	1,1
	MS-MS	0,1	0,1	0,1	0,1

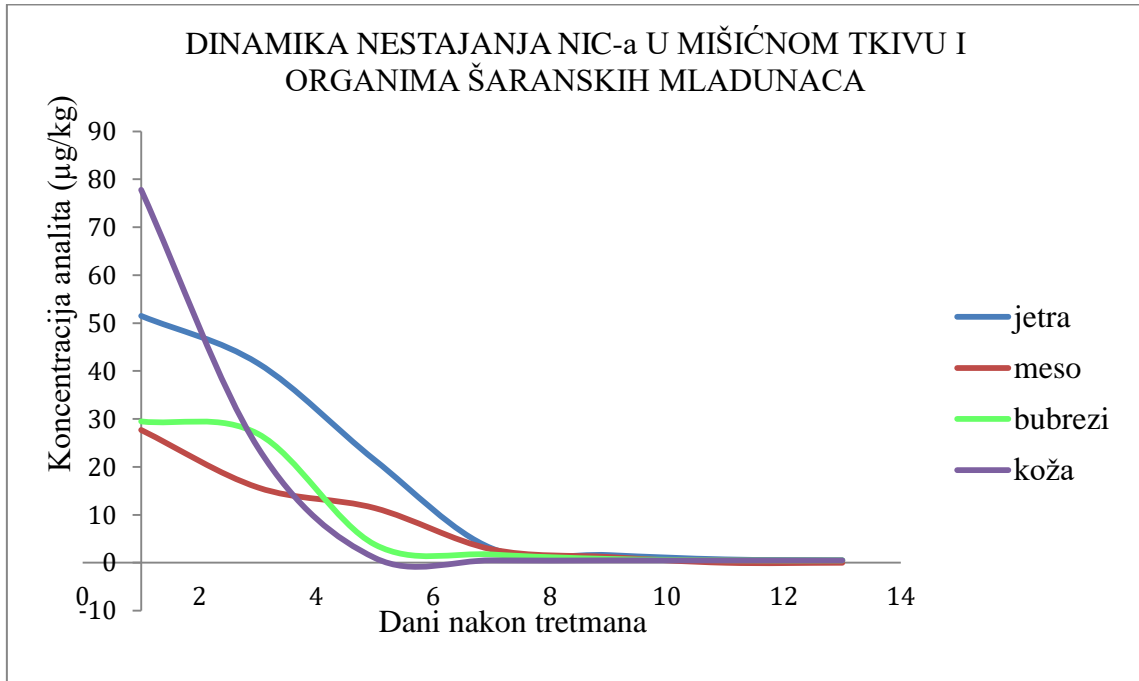
5.3. Distribucija i dinamika nestajanja NIC-a u tkivima i organima ribe

Distribucija i dinamika nestajanja niklozamida u mišićnom tkivu i organima ribe je prikazana u Tabeli 31, grafički prikaz je dat na Slici 18 i 19.

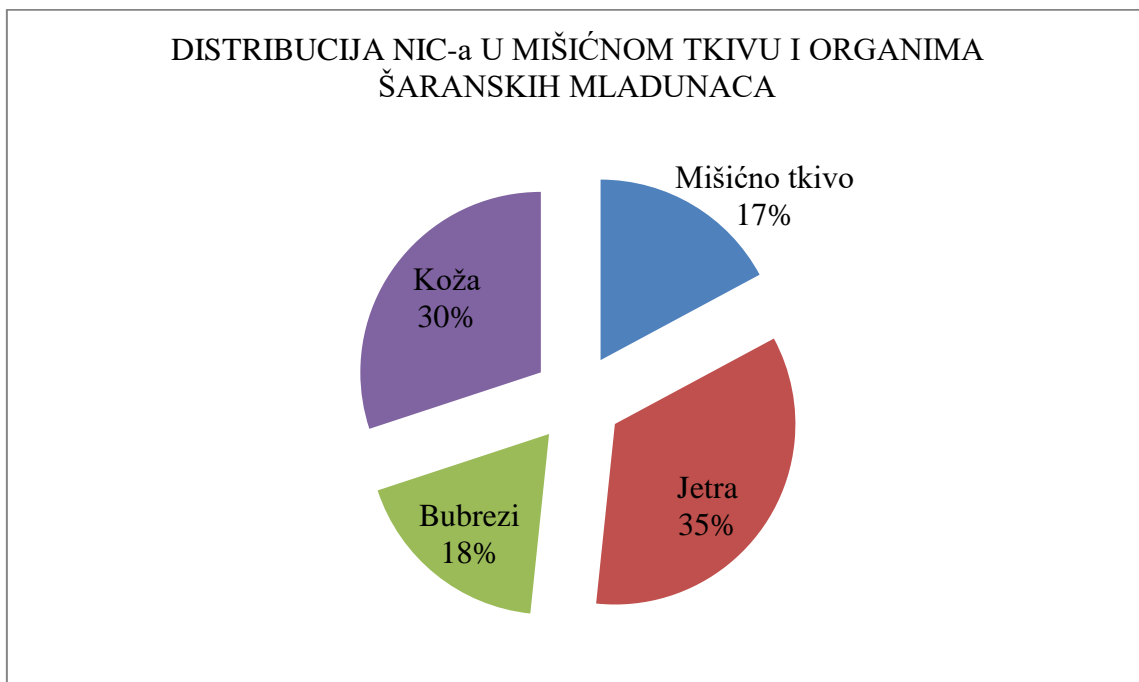
Tabela 31. Distribucija niklozamida u tkivima i organima ribe, praćena nakon petodnevnog tretmana sa peletiranom hranom koja je sadržala 2g/kg niklozamida.

	NIC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Mišićno tkivo	Jetra	Bubrezi	Koža
	$\bar{X} \pm \text{SD}$			
Kontrola	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Dani nakon tretmana				
1	27,7 \pm 4.6	51,5 \pm 9,5	29,49 \pm 4,46	77,8 \pm 5,97
3	15,7 \pm 2.5	41,6 \pm 8.2	26,89 \pm 5,89	24 \pm 4,12
5	11,4 \pm 4.7	21,4 \pm 3,4	3,79 \pm 1,42	1 \pm 7,26
7	2,8 \pm 1.2	3,0 \pm 0,6	1,73 \pm 1,15	<0,5
9	1,2 \pm 0,6	1,6 \pm 0,6	0,8 \pm 0,28	<0,5
11	<0,5	0,7 \pm 0,9	0,53 \pm 0,06	<0,5
13	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Grafički prikaz distribucije niklozamida u mesu i organima tokom trinaest dana praćenja, prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Grafički prikaz dinamike nestajanja niklozamida u mišićnom tkivu i organima ribe



Slika 19. Grafički prikaz distribucije niklozamida u mišićnom tkivu i organima ribe

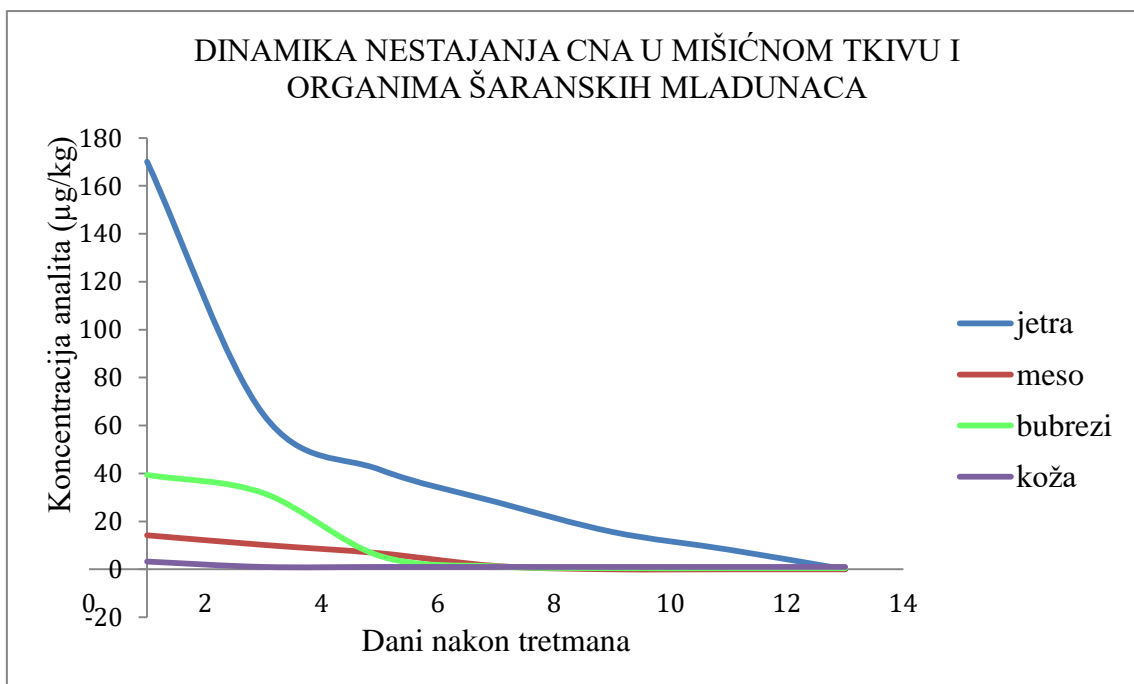
5.4. Distribucija i dinamika nestajanja metabolita NIC-a u tkivima i organima ribe

U Tabeli 32 i 33 su prikazane koncentracije CSA i CNA u mišićnom tkivu i organima ribe nakon petodnevnog hranjenja. Grafički prikaz distribucije metabolita je dat je na Slici 20 i 21.

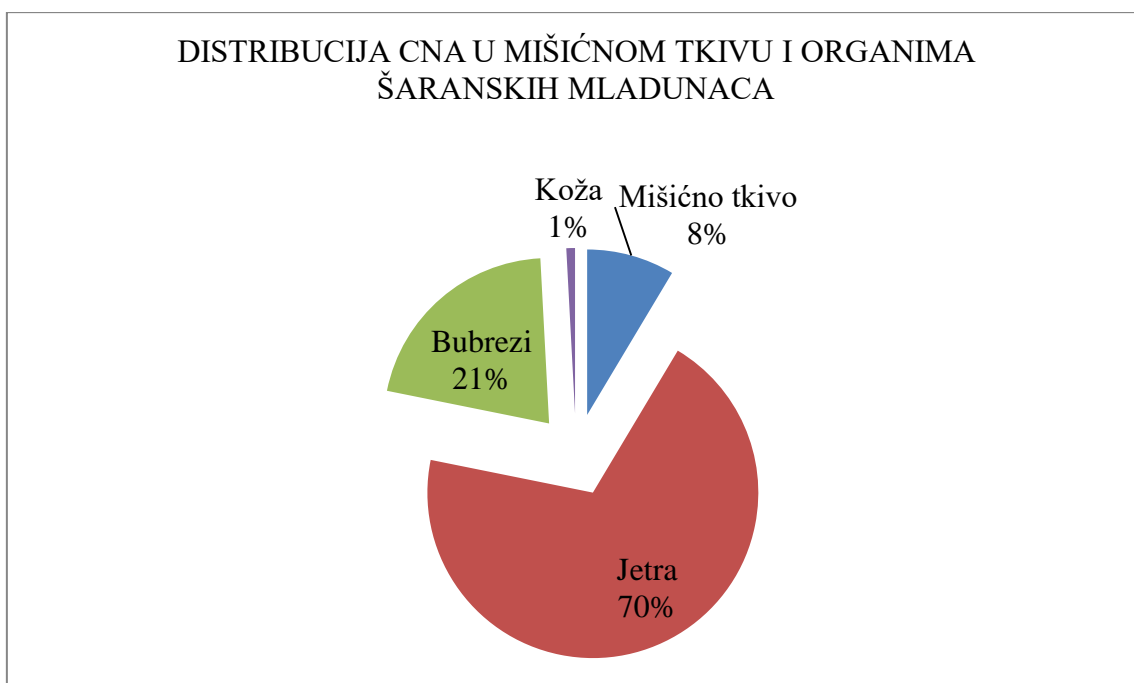
Tabela 32. Srednje koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca koji su bili izloženi dozi od 2 g/kg niklozamida.

	CNA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Mišićno tkivo	Jetra	Bubrezi	Koža
	X \pm SD			
Kontrola	<1	<1	<1	<1
Dani				
1	14,2 \pm 1,9	170,1 \pm 7,6	39,4 \pm 1,7	3,24 \pm 3,4
3	10,2 \pm 1,7	64,6 \pm 20,1	31,8 \pm 0,9	<1
5	6,7 \pm 1,1	41,6 \pm 0,6	5,6 \pm 1,9	<1
7	1,4 \pm 0,5	28,1 \pm 5,9	1,2 \pm 0,4	<1
9	<1	15,6 \pm 3,3	<0,5	<1
11	<1	8,2 \pm 0,7	<0,5	<1
13	<1	<1	<0,5	<1

Grafički prikaz distribucije CNA u mesu i organima je prikazan na Slici 20. Distribucija CNA je praćena u mesu, jetri, bubrezima i koži.



Slika 20. Grafički prikaz dinamike nestajanja CNA u mišićnom tkivu i organima ribe

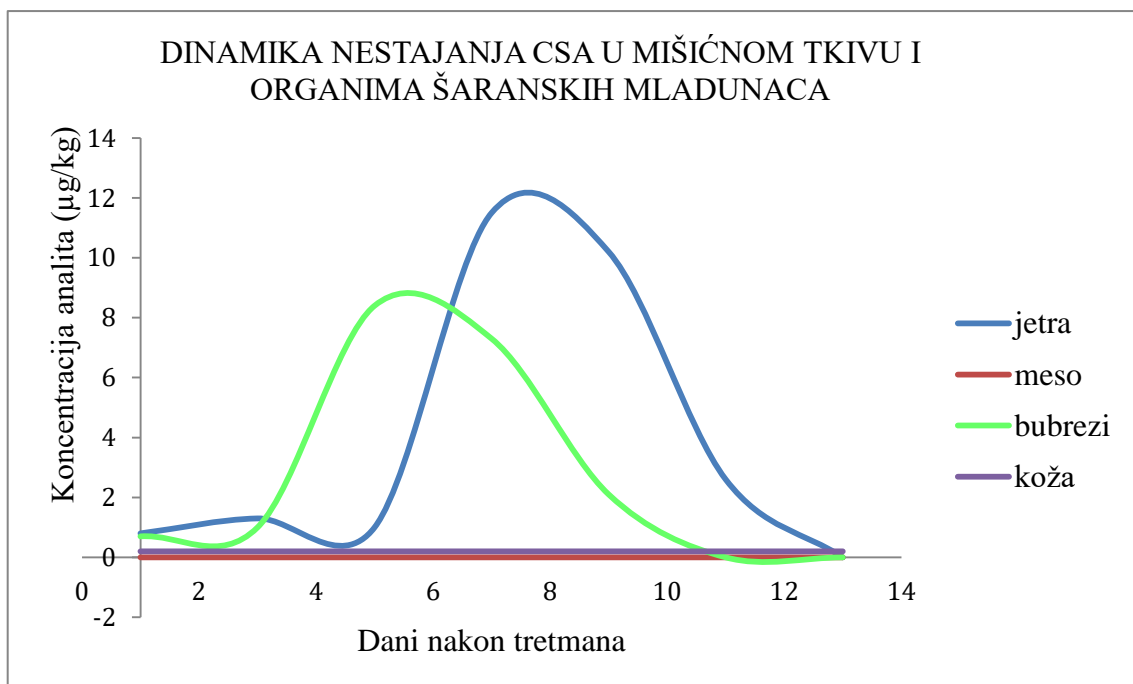


Slika 21. Grafički prikaz distribucije CNA u mišićnom tkivu i organima ribe

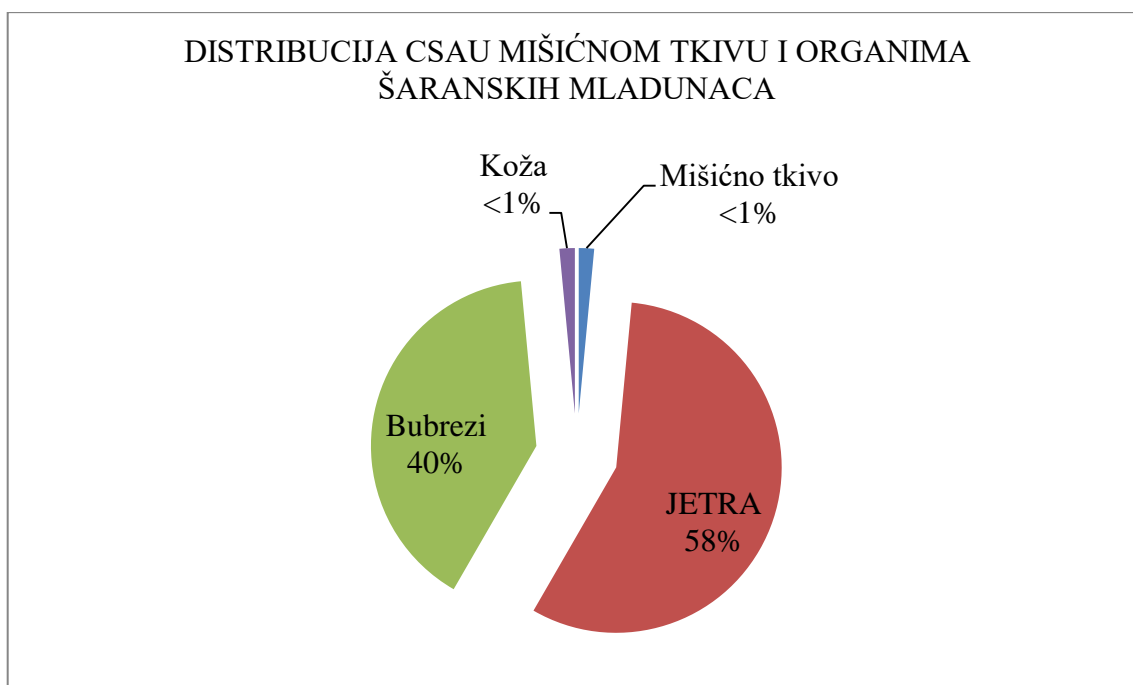
Tabela 33. Srednja koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$) CSA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca koji su bili izloženi dozi od 2 g/kg niklozamida.

	CSA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Mišićno tkivo	Jetra	Bubrezi	Koža
	X \pm SD			
Kontrola	<1	<1	<1	<1
Dani				
1	<1	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	<1
3	<1	1,3 \pm 0,4	1,0 \pm 0,1	<1
5	<1	<1	8,4 \pm 2,4	<1
7	<1	11,5 \pm 1,0	7,3 \pm 1,7	<1
9	<1	10,2 \pm 0,3	2,1 \pm 0,8	<1
11	<1	2,6 \pm 1,4	<1	<1
13	<1	<1	<1	<1

Grafički prikaz dinamike nestajanja metabolita CSA je prikazan na Slici 22, dok je distribucija CSA kroz meso, jetru, bubrege i kožu šaranskih mladunaca prikazana na Slici 23.

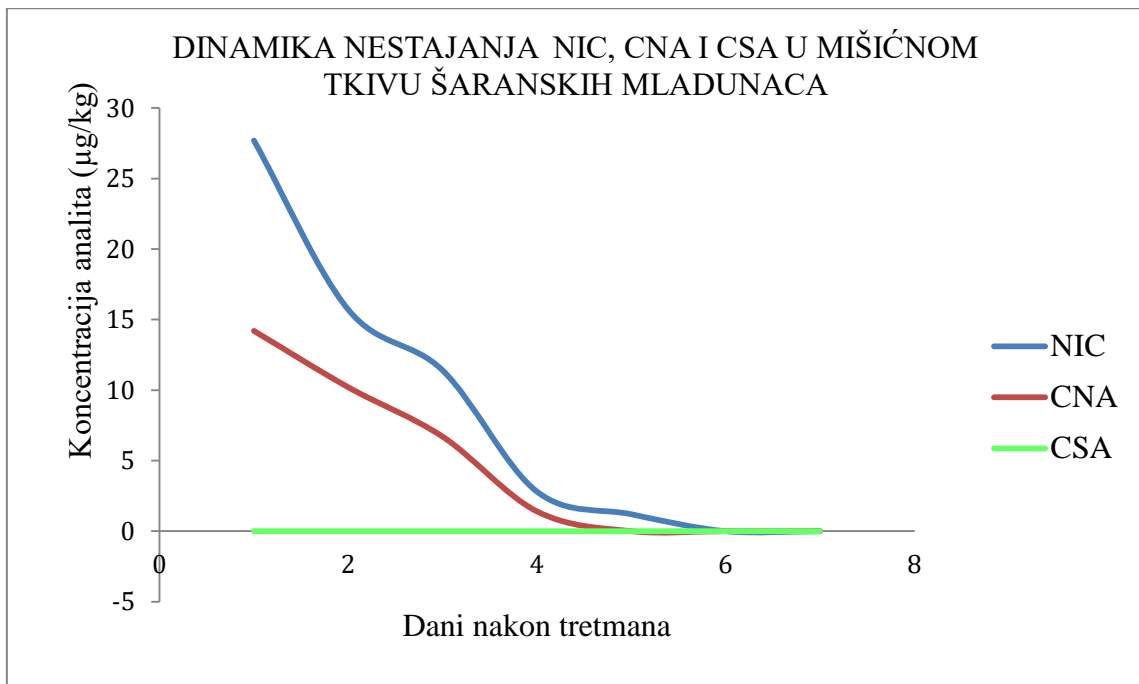


Slika 22. Grafički prikaz dinamike nestajanja CSA u mišićnom tkivu i organima ribe

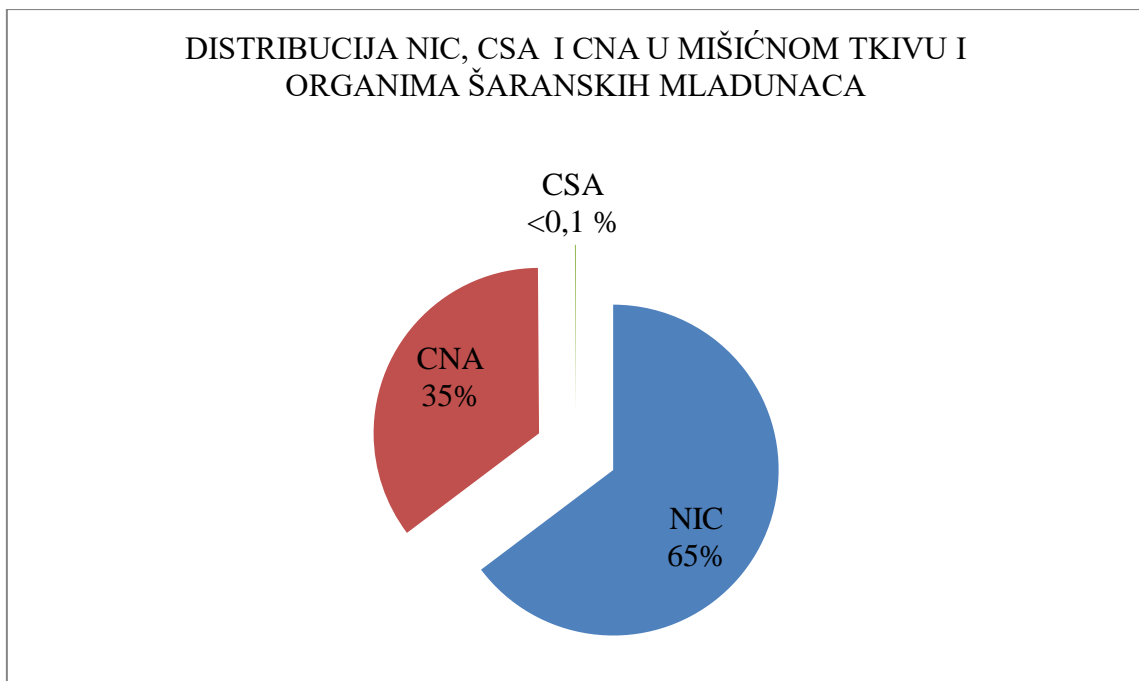


Slika 23. Grafički prikaz distribucije CSA u mišićnom tkivu i organima ribe

Dinamika nestajanja NIC-a i metabolita CNA i CSA u mišićnom tkivu je prikazana na Slici 24.

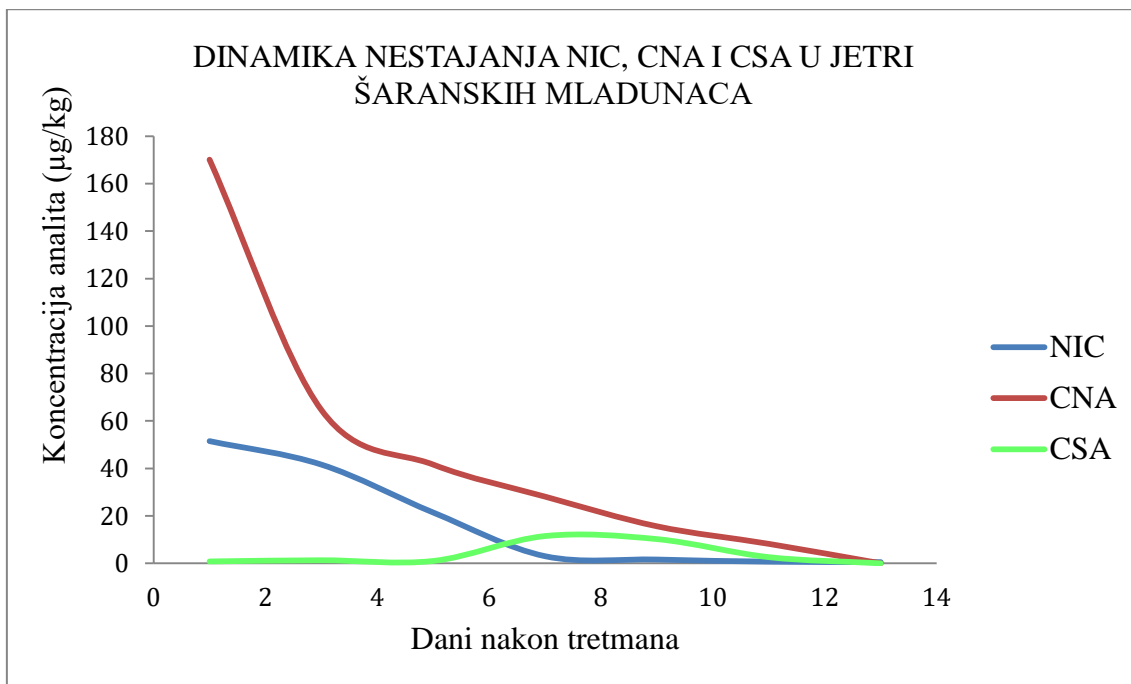


Slika 24. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca

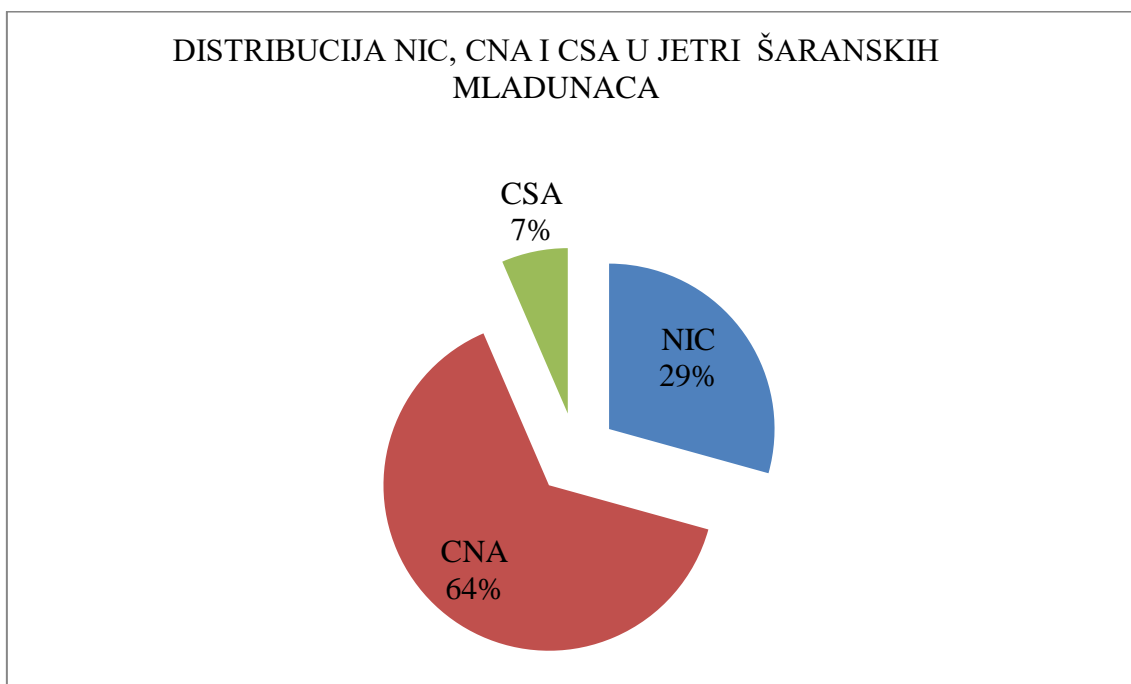


Slika 25. Distribucija NIC, CNA i CSA u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca tokom trinaest dana

Dinamika nestajanja NIC-a i metabolita CNA i CSA u jetri je prikazana na Slici 26.

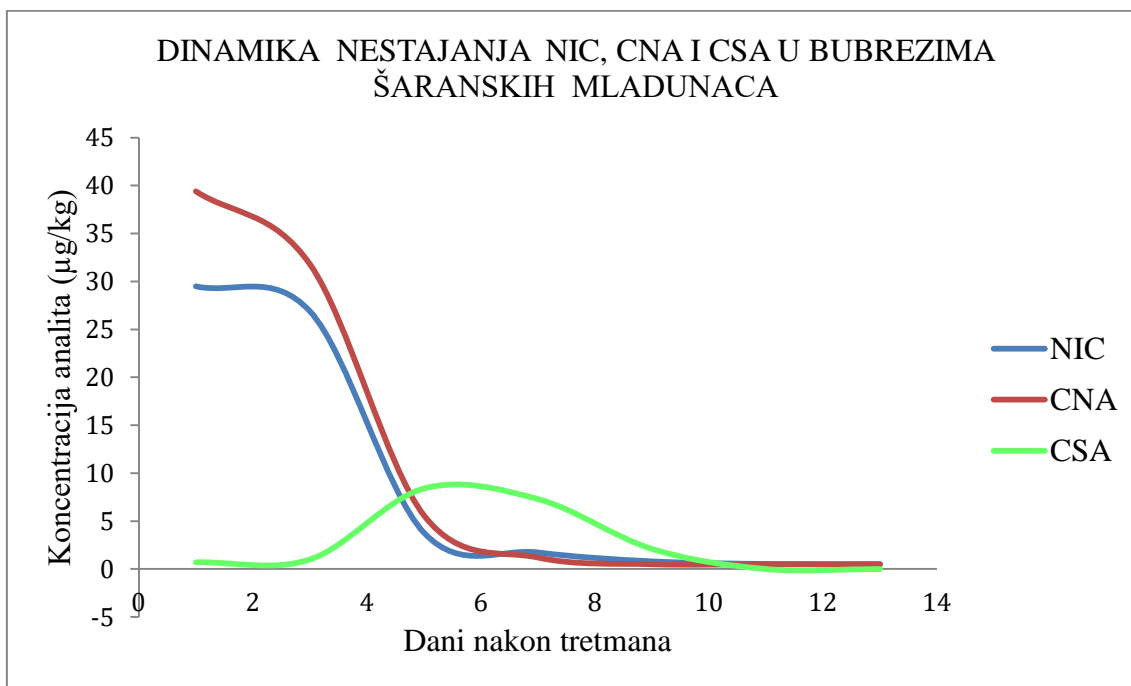


Slika 26. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u jetri šaranskih mladunaca tokom trinaest dana

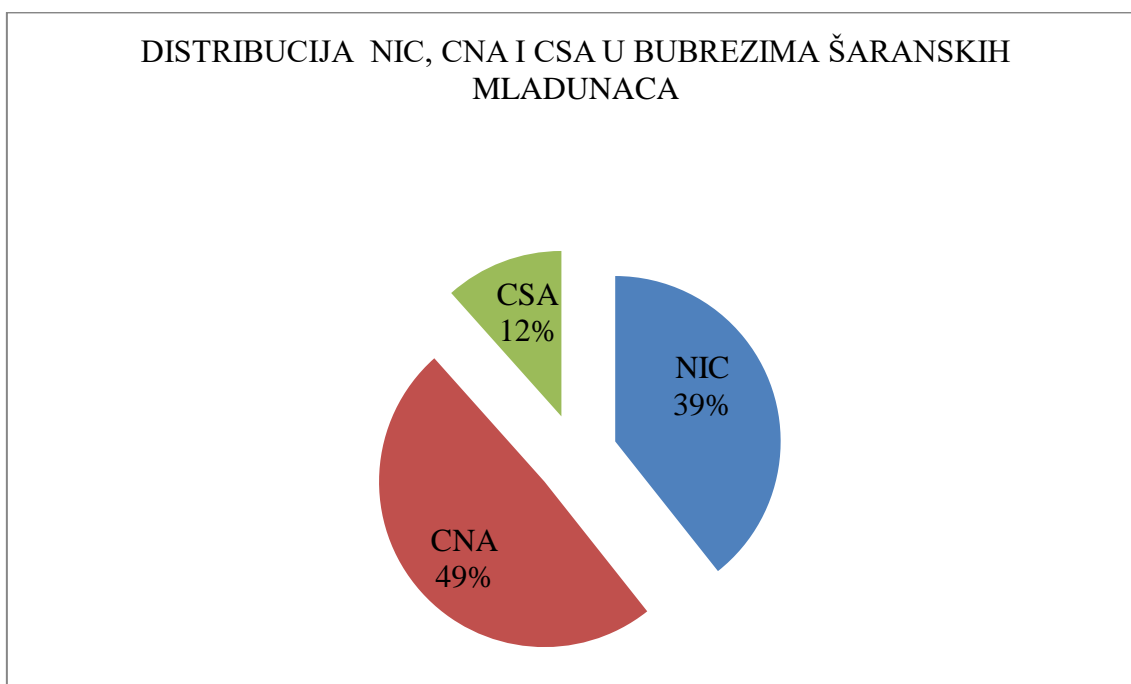


Slika 27. Distribucija NIC, CNA i CSA u jetri šaranskih mladunaca tokom trinaest dana

Dinamika nestajanja NIC-a i metabolita CNA i CSA u bubrezima je prikazana na Slici 28.

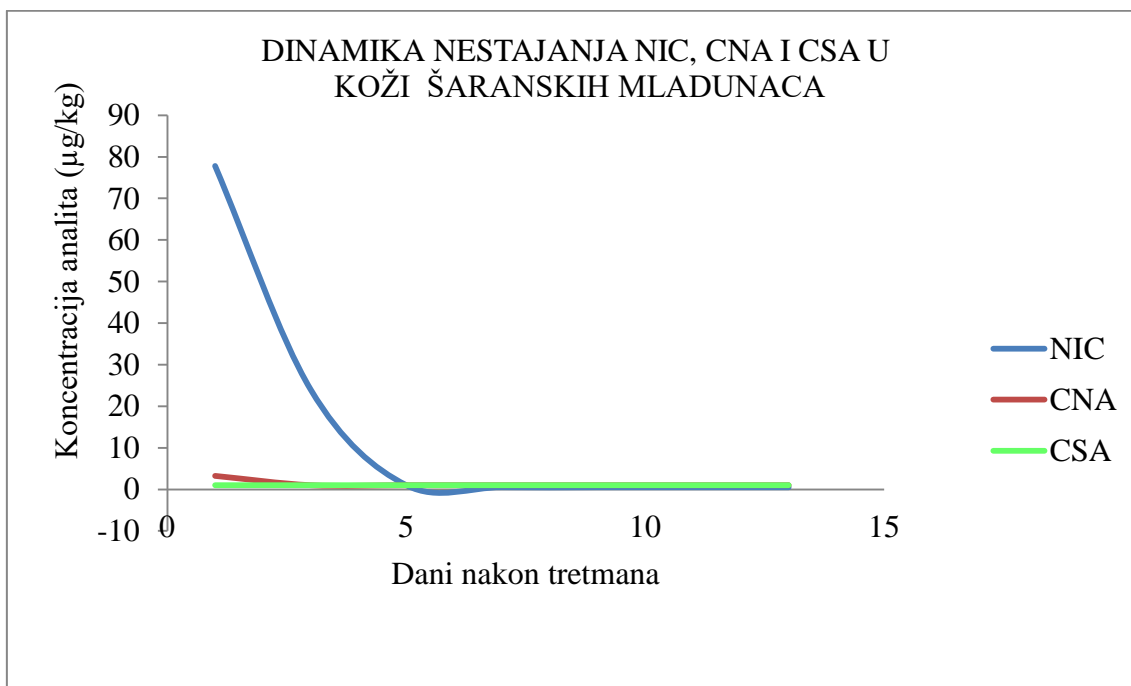


Slika 28. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u bubrezima šaranskih mladunaca tokom trinaest dana

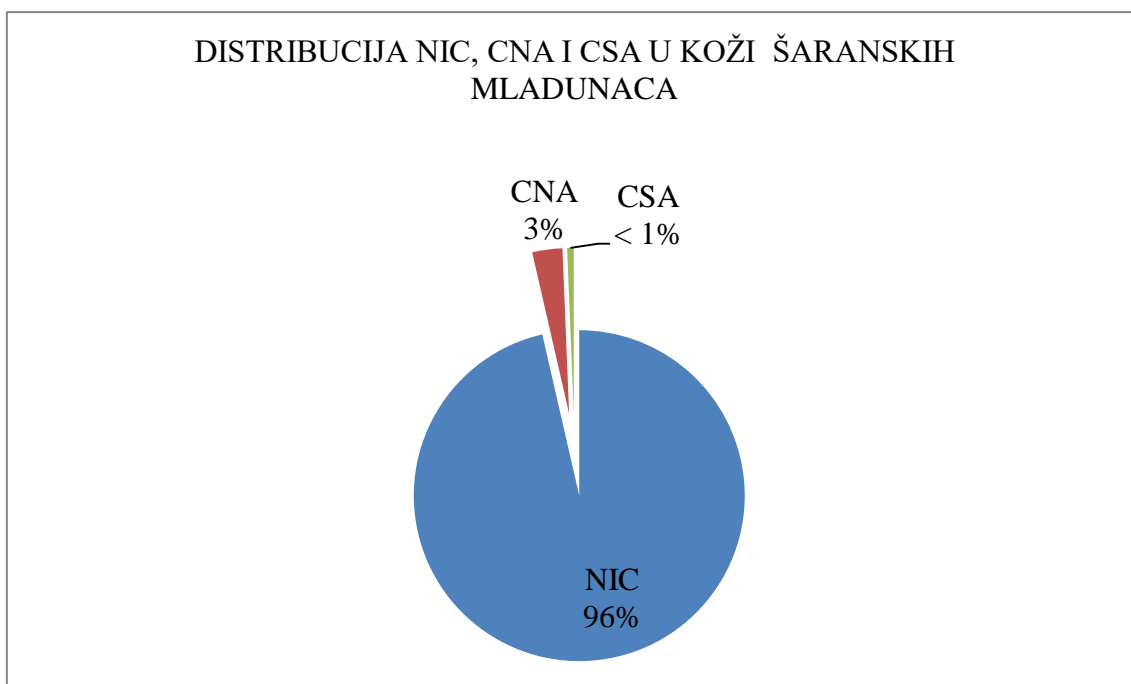


Slika 29. Distribucija NIC, CNA i CSA u bubrezima šaranskih mladunaca

Dinamika nestajanja NIC-a i metabolita CNA i CSA u koži je prikazana na Slici 30.



Slika 30. Dinamika nestajanja NIC, CNA i CSA u koži šaranskih mladunaca tokom trinaest dana



Slika 31. Distribucija NIC, CNA i CSA u koži šaranskih mladunaca tokom trinaest dana

6. DISKUSIJA

Za utvrđivanje prisustva ostataka niklozamida tokom godina koristile su se različite instrumentalne tehnike. U našem ispitivanju je korišćena tečna hromatografija sa DAD, FLD i MS-MS detekcijom. U ranijim literalnim podacima su dominirale spektrofotometrijske metode određivanja. One su uglavnom korišćene za određivanje NIC-a i njegovih soli iz farmaceutskih preparata. Međutim, pored spektrofotometrijskih metoda, znatan broj naučnika se bavio i razvojem HPLC metoda za određivanje NIC-a i njegovih metabolita. S obzirom da je razvoj farmaceutske industrije je zahtevao razvoj sofisticiranih metoda, kojima će se obezbediti pouzdanost u rezultat i koje će biti selektivnije i osetljivije, već od 1996.godine došlo je do razvoja HPLC metoda za praćenja sadržaja NIC-a (Van Tonder i sar., 1996). Metode su godinama optimizovane i prilagođavanje različitim matriksima (Schreier i sar., 2000; Muir i Grift 1980; Paghadar i Vadia, 2015; Doran i Stevens, 2014). Za mobilne faze su korišćeni čisti rastvarači i puferski sistemu i u zavisnosti od toga su se menjali i maksimumi apsorpcije. Jedino što je bilo isto za sva HPLC ispitivanja su kolone razdvajanja. Za sva razdvajanja su korišćenje C18 kolone.

Kada se posmatraju rezultati razvoja metode za određivanje niklozamida i metabolita, primećujemo da je prinos razvijenih metoda ujednačen kao i korelacioni faktori. Kod spektrofotometrijskih određivanja NIC-a iz farmaceutskih preparata, prinosi su se kretali između 99,8-100,7 % (Khier i sar., 2008; Dawson i sar., 1978; Daabees, 2000; Othman i Sultan, 2014), dok je kod metoda tečne hromatografije korelacioni factor bio veći od 0.99 a prinosi su se kretali u opsegu od 88 do 100,67 % (Schreier i sar, 2000; Paghadar i Vadia, 2015). Metodu za određivanje sadržaja niklozamida u tkivu riba, pastrmke i soma na HPLC-DAD-u su razvili Schreier i sar., (2010). U njihovom ispitivanju, kao i našem, korelacioni factori za HPLC-DAD i LC-MS-MS metodu su bili veći od 0,99 za NIK i njegove metabolite. U ovom ispitivanju, kao i u dosadašnjim ispitivanjima, linearnost je bila zadovoljavajuća a korelacioni factor je bio veći od 0,99 i kod HPLC-DAD-FLD i HPLC-MS-MS određivanja, dok se srednja vrednost prinosa za deset merenja na HPLC-DAD-FLD-u kretala od: 99,2-100,4 % za NIC; od 97,6 do 98,6 % za CSA i za CNA od 97,8-98,4 %. Ostvareni prinos na HPLC-

MS-MS-u u ovom ispitivanju je bio u opsegu od 97,6 % do 101,02 %. Najveći prinos je ostvaren u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca i kod HPLC-DAD-FLD i HPLC-MS-MS metode, što je i bilo očekivano zbog manjeg sadržaja masnoće nego u organima i izostanka ili manjoj zastupljenosti interferenci (krv, masnoća i dr.), što je i u skladu sa literaturnim navodima.

Na osnovu sprovedenih istraživanja Paghadar i Vadia su 2015.godine potvrdili linearnu zavisnost detektora, HPLC metode za ispitivanje NIC-a u farmaceutskim preparatima, pri maksimumu apsorpcije od 332 nm, u opsegu od 0,01-100 µg/mL, pri čemu je dobijen korelacioni factor od 0,998. Doran i Stevens (2014) su poredili linearnost metode određivanja NIC-a i njegovih primarnih metabolita primenom UV VIS spektrofotometra i LC-MS-MS-a pri primeni različitih organskih mobilnih faza, acetonitrila i metanola. Naime, pokazano je da je LC-MS-MS metoda mnogo osjetljivija, selektivnija od UV-VIS spektrofotometrijske metode, iako je linearnost bila zadovoljavajuća za obe testirane metode a korelacioni faktor veći od 0,99 i za NIC i za njegove metabolite. Naša ispitivanja su potvrdila njihove rezultate, linearnosti i korelacionog factora kod HPLC-DAD-FLD i HPLC-MS-MS-a određivanja. U ovom ispitivanju analize sadržaja NIC-a i njegovih metabolite u tkivu i organima šaranskih mladunaca, su urađene na HPLC-DAD-FLD-u, pri čemu je kao mobilna faza korišćen acetonitril i voda u odnosu 60:40 za određivanje NIC-a, odnosno metanol i voda u istom odnosu za određivanje CSA i CNA. Za razdvajanje analita korišćena je C18 kolona; NIC je određen na talasnoj dužini od 335 nm, pri unosu uzorka u sistem u količini od 10 µL. Schreier i sar. (2000) su za analizu prisustva NIC-a u pastrmci i somu kao mobilnu fazu koristio 58 mM natrijum-acetatni pufer i acetonitril u odnosu 70:30, pri maksimumu apsorpcije od 335 nm. Na osnovu poređenja koja su uradili Doran i Stevens (2014) pri određivanju sadržaja niklozamida i njegovih metabolita primenom HPLC i LC-MS-MS metode, utvrđeno je da LC-MS-MS tehnika daje LOD vrednosti od 10-250 puta manje nego HPLC metoda, dok su naši rezultati pokazali da HPLC-MS-MS metoda daje od 5 -10 puta manje LOD vrednosti od HPLC-DAD-FLD metode. Ovi rezultati su i očekivani zbog upotrebe dvostruke jonizacije a samim tim i veće selektivnosti i osjetljivosti metode. Prednosti metode koju smo mi koristili pri određivanju su brza ultrazvučna ekstrakcija uzoraka koja je rezultirala i zadovoljavajućim prinosom kao i kratko vreme analize. Analiziranje uzoraka na

prisustvo niklozamida je trajalo 10 minuta kao i analiziranje na prisustvo njegovih metabolite, dok je su Schreier i sar., (2010) retenciono vreme niklozamida 27 minuta.

Do danas nema puno literarnih podataka o kvantitativnim rezultatima distribucije niklozamida i njegovih metabolita u tkivu i organima riba. Što se tiče kvaliteta mesa, literarni podaci potvrđuju da se sadržaj proteina kod šarana kreće oko 20 % dok količina masti varira u zavisnosti od sezone i kvaliteta hrane a kreće se najčešće u rasponu od 6- 12 % (Ćirković i sar., 2012; Ljubojević i sar., 2013). Ispitivanja su pokazala da postoje velike razlike u sadržaju masti u mišićnom tkivu između različitih vrsta riba, kao i razlike u masnokiselinskom sastavu masti (Fontagné-Dicharry i Medale, 2010). Kvalitet mesa šaranskih riba je veoma varijabilan i promene su pod uticajem starosti, sistema gajenja i ishrane.

Prvi literaturni podatak koji spominje ispitivanje koncentracije niklozamida u tkivima ribe datira iz 1979.godine, kada je Luhning sa saradnicima razvio metodu za određivanje NIC-a primenom gasne hromatografije.

Kod ovog ogleada, dinamika nestajanja niklozamida u mišićnom tkivu, bubrezima i jetri je ujednačena, dok u koži pokazuje izvesna odstupanja. Najveća koncentracija je zabeležena prvog dana nakon prestanka primene hrane sa dodatkom niklozamida i to u koži u količini od 77,8 µg/kg. U mišićnom tkivu do nestajanja niklozamida je došlo jedanaestog a u bubrezima i jetri trinaestog dana dok koncentracija NIC-a u koži nije registrovana petog dana od prestanka primene leka. Kod ispitivanja koja su Schreier i sar., 2000 izveli, vidi se se da nakon jednodnevnog tretmana ribe (pastrmke) sa niklozamidom i prebacivanja ribe u čistu vodu već nakon 24 časa nije zabeleženo prisustvo niklozamida. U našem eksperimentu vreme eliminacije je duže, što je i očekivano s obzirom na dužinu primene leka. Distribucija NIC-a je u skladu da ranijim ispitivanjima (Ćirković i sar, 2015). Naime najveći sadržaj niklozamida je zabeležen u jetri 35 %, koži 30 %, bubrezima 18 % i najmanji u mišićnom tkivu 17 %.

Dinamika nestajanja CNA u tkivima i organima šaranskih mladunaca pokazuje da je najveća koncentracija CNA zabeležena u jetri u količini od 170 µg/kg u kojoj je i najveća distribucija (70 %). Dinamika nestajanja CNA u bubrezima i mišićnom tkivu je ista, ne beleži se prisustvo metabolita devetog dana nakon primene leka. S tim da je koncentracija u bubrezima bila 39,4 µg/kg a u mišićnom tkivu 14,2 µg/kg. Zabeležena

koncentracija u koži je bila 3,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a do potpune eliminacije u koži je došlo trećeg dana od prestanka primene leka.

Dinamika nestajanja CSA u tkivu i organima se razlikuje u odnosu na NIC i CSA. Najveće koncentracije su zabeležene petog dana nakon tretmana u bubrezima u količini od 8,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i sedmog dana nakon tretmana u jetri u količini od 11,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U mišićnom tkivu i koži nije detektovano prisustvo ovoga metabolita. Do potpune eliminacije CSA iz jetre i bubrega je došlo trinaestog odnosno jedanaestog dana nakon primene leka.

Duže vreme eliminacije, u odnosu na prijavljena ispitivanja (Hubertt i sar., 2005; Schreier i sar., 2000; Smit i sar., 2012), mogu se objasniti većom koncentracijom upotrebljenog niklozamida koji je bio umešan u hranu i svakako dužim vremenom izlaganja. U dosadašnjim ispitivanjima (Hubertt i sar., 2005; Schreier i sar., 2000; Smit i sar., 2012) rezultati su pokazali da 24 časa nakon izlaganja pastrmke koncentraciji od 0,055 $\mu\text{g}/\text{mL}$ niklozamida, u samo 9 % tela pastrmke (fileti) se detektuje niklozamid (Hubertt i sar., 2005). Smit i sar. (1999) su slično kao i Hubertt i sar. (2005) potvrdili da se 24 časa po izlaganju pastrmke beleži značajan pad koncentracije niklozamida u tkivu. U oba slučaja ekspozicija je izvedena u otvorenim vodenim tokovima, pritokama Velikih jezera a dobijeni rezultati su pokazali da se 12 odnosno 24 časa po izlaganja smanjuje koncentracija niklozamida u tkivu pastrmke.

S obzirom da se niklozamid u eksperimentu, ribama dozirao oralno, preko peletirane hrane, aplikovanjem u vodu, rezultati su pokazali najveći sadržaj niklozamida u koži prvog dana nakon završetka aplikacije leka. To nam ukazuje da je deo hrane ostao u vodi i rastvorio se pri čemu je došlo do apsorpcije niklozamida na koži. Međutim, samo 48 časa nakon boravka ribe u čistoj vodi, na koži više nije detektovano prisustvo NIC-a. Ovo objašnjava i činjenicu da ni CSA i CNA nisu detektovani u koži.

Prijavljeni eksperimenti o distribuciji niklozamida i njegovih metabolita do sada su izvođeni na otvorenim vodenim tokovima, dok je za potrebe ove doktorske disertacije ekperiment izveden u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Tokom trajanja eksperimenta šaranski mladunci su izloženi dejstvu dejstvu niklozamida preko peletirane hrane u količini od 2 g niklozamida po kilogramu hrane. Tretman je trajao 5 dana nakon čega je praćena distribucija niklozamida i njegovih metabolita.

Distribucija NIC-a u mišićnom tkivu je 65 %, dok je distribucija CNA 35 % a CSA ispod LOD vrednosti. Kod jetre je distribucija NIC-a manja i iznosi 29 % dok je distribucija CNA 64 % a prisutan je i drugi metabolit CSA (7 %). U bubrezima je slična distribucija kao u jetri stim da je zastupljenost NIC-a 39 %, a CNA 49 %, dok je CSA zastupljen gotovo duplo više nego kod jetre, 12 %. Koža, zbog aplikovanja preko cele površine, pokazuje najveću distribuciju NIC-a 96 %, dok je zastupljenost CNA 3 % a CSA u koži nije ni detektovan. Ispitivanjem distribucije niklozamida su se bavili Schultz i Herman (1978), koji su kao i Statham i Lech (1975) utvrdili da se nakon izlaganja ribe niklozamidu najveće koncentracije beleže u jetri a najniže u mišićima. Ćirković i saradnici su 2015. godine izveli sličan eksperiment. Oni su šaranske mladunce izložili dejstvu niklozamida iz peletirane hrane u koncentraciji od 3,4 g/kg. Nakon petodnevnog tretmana najveći sadržaj niklozamida je zabeležen u jetri 70,42 %, dok je u mesu zabeleženo svega 3 %.

Rezultate distribucije NIC-a u mišićnom tkivu i organima, dobijene u ovom eksperimentu, ukazuju da je koncentracija NIC-a kao i vreme zadržavanja, najveća u jetri a potom u bubrezima. Ovi rezultati nisu neočekivani s obzirom da je poznato da je jetra glavni organi za sakupljanje, čuvanje i eliminaciju hemijskih ostataka. Naime, kada posmatramo distribuciju NIC-a i CNA tokom vremena, u tkivu i organima, vidimo da je dosta ujednačena, dok se vrednost koncentracije CSA pokazala skok sedmog dana u jetri, odnosno petog dana u bubrezima, iako riba tokom ovog perioda više nije konzumirala hranu sa niklozamidom, nakon čega se vrednost smanjila do kraja eliminacije. Ovo možemo objasniti činjenicom da smanjenje koncentracija ostataka tokom vremena zavisi od više faktora kao što su dužina hranjenja, količine hrane, koncentracija leka sa kojim se riba tretira, biotransformacija, izlučivanja i raspada upotrebljenog leka.

Do danas, primena niklozamida za lečenje u ribama je upitna, prvenstveno zbog mogućih toksičnih efekata na neke vodene organizme.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu istraživanja i konsultovane literature mogu se izvesti sledeći zaključci:

Sprovedena ispitivanja su potvrdila hipotezu i pokazala da se ostaci niklozamida i njegovih metabolita CSA i CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži šaranskih mladunaca, mogu uspešno odrediti pomoću HPLC DAD-FLD i HPLC-MS-MS-a.

Kao najpogodniji detector u pogledu brzine, performansi i lakoće rukovanja identifikovan je DAD i FLD, dok su pouzdanost rezultata, limiti detekcije i kvantifikacije bolji kod LC-MS-MS-a. Primenom validovane HPLC metode sa DAD i FLD detektorom potvrđena je linearnost detektora u koncentracionom opsegu od 0,05 do 1 µg/mL za NIC, CSA i CNA. Dobijeni korelacioni faktori su zadovoljili kriterijum prihvatljivosti definisan u validacionoj studiji i iznosio je 0,9996 za NIC; 0,9999 za CSA i 0,9995 za CNA.

Ponovljivost HPLC-DAD-FLD metode određivanja za NIC, CSA i CNA, određena analiziranjem obogaćenih uzoraka mesa, jetre, bubrega i kože, pri istim eksperimentalnim uslovima, bila je znatno manja od postavljenog kriterijuma prihvatljivosti od 5%. Dobijena ponovljivost je u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži retrospektivno je iznosila 1,75; 3,00; 1,47 i 1,082 % za NIC. Kod CSA vrednosti ponovljivosti u mišićnom tkivu su iznosile 4,18 %, jetri 1,15 %, bubrezima 1,84 % i 1,13 % u koži. Vrednosti ponovljivosti za CNA u mišićnom tkivu, jetri, bubrezima i koži su retrospektivno iznosile 3,60 %; 1,68 %; 1,47 % i 1,47 %.

S ciljem dobijanja pouzdanijih podataka, reproduktivnost metode je određena na obogaćenim uzorcima koji su analizirani tokom dva dana, na različitim aparatima. Vrednost reproduktivnosti metode, posmatrana kroz obogaćene uzorke mišićnog tkiva, jetre, bubrega i kože je zadovoljila kriterijum prihvatljivosti metode i bila manja od zadatih 5%. Dobijena vrednost reproduktivnosti se u mišićnom tkivu je za NIC, CSA i CNA se kretala od 2,30 do 3,03 %; u jetri od 1,91 do 2,50 %; bubrezima od 1,67 do 3,32 % i u koži od 1,40 do 1,66 %.

Tačnost HPLC-DAD-FLD metode određivanja, izračunata kao prinos metode se kretala u opsegu od 97,6 do 100,4 %. Tačnost metode izračunate za MS-MS detector se kretala u opsegu od 99,6-101,02 %.

Limit kvantifikacije za niklozamid i metabolite određene na HPLC-DAD-FLD-u se nalazila u opsegu od 1,5-1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za NIC; 3,3-3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za CSA i 3,3-3,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za CNA.

Limit kvantifikacije LOQ za niklozamid i metabolite određene na LC-MS-MS-u su iznosile 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za NIC, za CSA su se kretale u opsegu od 0,6-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a za CNA u opsegu od 0,5-0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Limit detekcije za NIC, CSA i CNA određene na HPLC-DAD-FLD-u iznosila je 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Limit detekcije za NIC, CSA i CNA određene na LC-MS-MS-u su iznosile 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Potvrđena je hipoteza o distribuciji NIC-a i metabolita u tkivu i organima.

Praćenjem distribucije niklozamida u mišićnom tkivu šaranskih mladunaca, utvrđeno je da do eliminacije niklozamida dolazi jedanaest dana nakon primene leka.

Eliminacija niklosamida iz organa šaranskih mladunaca je bila ujednačena kada posmatramo jetru i bubrege i završena je trinaestog dana nakon primene leka.

Eliminacija niklosamida iz kože šaranskih mladunaca završena je sedmog dana nakon primene leka.

Eliminacija CNA iz mišićnog tkiva je završena je devet dana nakon primene leka.

Eliminacija CNA iz jetre i bubrega je završena trinaest, odnosno devet dana nakon prestanka primene leka.

Eliminacija CNA iz kože šaranskih mladunaca završena je trećeg od dana prestanka primene leka.

Metabolit CSA je detektovani u jetri i bubrezima. Eliminacija CSA iz jetre, odnosno bubrega šaranskih mladunaca završena je trinaestog, odnosno jedanaestog dana nakon primene leka.

U mišićnom tkivu i koži šaranskih mladunaca nije detektovano prisustvo CSA.

Pema predstavljenom istraživanju zaključujemo da je distribucija NIC-a najveća u koži (96 %) a potom mišićnom tkivu (65 %), bubrezima (39 %) i jetri (29 %).

Distribucija metabolita CNA je najveća u jetri (64 %), potom u bubrezima (49 %) i mišićnom tkivu (35 %), dok u koži nije ni detektovan.

Distribucija metabolita CSA je zabeležena u bubrezima (12 %) i jetri (7 %), dok u mišićnom tkivu i koži ovaj metabolit nije ni detektovan.

Potrebno je nastaviti raditi na studijama koje se bave distribucijom, eliminacijom i toksičnošću niklozamida i njegovih metabolita da bi se opravdala njegova upotreba u terapiji botriocefaloze i kako bi se obnovila registracija.

Pravci daljih istraživanja

Na osnovu sprovedenih istraživanja u ovoj tezi nameću se neki mogući pravci daljih istraživanja:

Primena validovane metode za ispitivanje prisustva NIC-a i njegovih metabolita u vodi ribnjaka.

Razvoj metode za određivanje niklozamid glukuronida s ciljem određivanja njegove distribucije i vremena zadržavanja u tkivu i organima riba.

8. LITERATURA

1. Abreu, F. C., Goulart, M. O. F., Oliveira B. A. M. (2002) "Detection of the damage caused to DNA by using an electrochemical DNA-biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, broj 17(11-12), str. 913-919.
2. Afaf, A. K., Magda, M., Elhenawee, Manal, S. (2008) "Spectrophotometric Method for The Determination of Some Drugs Using Fast Red B Salt", *E-Journal of Chemistry*, broj 5(S2), str. 1087-1097.
3. Alemu, H., Khoabane, N. M., Tseki, P. T. (2003) "Electrochemical oxidation of niclosamide at a glassy carbon electrode and its determination by voltammetry", *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, broj 17(1), str. 95-106.
4. Alemu, H., Wagana, P., Tseki, P. (2002) "Voltametric determination of niclosamide at a glassy carbon electrode", *Analyst*, broj 127(1), str. 129-34.
5. Algarra, M., Campos, B., Rodriguez, B., Jose, E., Sanchez, F. (2012) "Niclosamide quantification in methyl- β -cyclodextrin after derivatization to aminoniclosamide", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.*, broj 72 (1), str. 89-94.
6. Andrews, P., Thyssen, J., Lorke, D. (1982) "The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide", *Pharmacology & Therapeutics*, broj 19 (2), str. 245-295.
7. Antić, A. V., Antić, P. M. (2014) "Hromatografija u analizi hrane", I izdanje. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
8. Arend, R. C, Londoño-Joshi, A. I., Samant, R. S, Li, Y., Conner, M., Hidalgo, B., Alvarez, R. D., Landen, C. N., Straughn, J. M., Buchsbaum, D. J. (2014) "Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by niclosamide: a therapeutic target for ovarian cancer", *Gynecol Oncology*, broj 134(1), str.112-20.
9. Ashburn, T. T., Thor, K. B. (2004) "Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs", *Nature Reviews Drug Discovery*, broj 3, str. 673–683.
10. Bartsevich, W. V., Juliano, R. L. (2000) "Regulation of the MDR1 gene by transcriptional repressors selected using peptide combinatorial libraries", *Molecular Pharmacology*, broj 58, str. 1–10.
11. Bellamy, W. T. (1996) "P-glycoproteins and multidrug resistance", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Broj 36, str: 161–183.
12. Borcherdig, J., Wolf, J. (2001) "The influence of suspended particles on the acute toxicity of 2-chloro-4-nitroaniline, cadmium, and pentachlorophenol on the

valve movement response of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, broj 40, str. 497–504.

13. Benet, L. Z. (1984) “Pharmacokinetics: Basic Principles and Its Use as a Tool in Drug Metabolism”, *Journal of Drug metabolism and drug toxicity*. New York: Raven Press.

14. Broome, A. W., Jones, W. G. M. (1966) “A new drug for the treatment of fascioliasis in sheep and cattle”, *Nature (London)*, broj 210, str. 744–745.

15. Brown, G. R., Chesterson, G. J., Coles, G. C. (1985) “Potentiation of fasciolicidal agents by benzoyl side chains. Synthesis of Benzoylsalicylanilides”, *Journal of Medical Chemistry*, broj 28, str. 143–146.

16. Caldow, M., Sharman, M., Kelly, M., Day, J., Hird, S., Tarbin, J. (2009) “Multi-residue determination of phenolic and salicylanilide anthelmintics and related compounds in bovine kidney by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, broj 1216 (46), str. 8200–8205.

17. Canton, J. H., Slooff, W., Koll, H. J., Struys, J., Gouw, T. J. M., Wegman, R. C. C., Piet, G. J. (1985) “Toxicity, Biodegradability and Accumulation of a Number of Cl/N-Containing Compounds for Classification and Establishing Water Quality Criteria”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, broj 5, str. 123–131.

18. Chen, W., Mook, R. A. Jr., Premont, R. T., Wang, J. (2017) “Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug”, *Cell Signal*, broj 41, str. 89–96.

19. Churchill, F. C., Ku, D. N. (1980) “Extractive alkylation of 5,2'-Dichloro-4'-nitrosalicylanilide (niclosamide) for gas–liquid chromatographic analysis”, *Journal of Chromatography*, broj 189 (3), str. 375–388.

20. Ćirković, M., Kartalović, B., Novakov, N., Pelić, M., Đorđević, V., Radosavljević, V., Aleksić, N. (2015) “Distribution of niclosamide residues in meat and internal organs of common carp”, In *Procedia Food Science, Proceedings of the 58th International Meat Industry Conference Meat Safety and Quality: Where it goes?* (Belgrade, Serbia), str. 54–56.

21. Coles, G. C. (1974) “Fluke biochemistry *Fasciola* and *Schistosoma*”, *Helminthological Abstracts (Series A)*, broj 44, str. 147–162.

22. Cottalasso, D., Pronzato, M. A., Domenicotti, C., Barisione, G., Fontana, L., Nann, G. (1991) “Toxicity of 4-chloro-2-nitroaniline and 2-chloro-4-nitroaniline to isolated rat hepatocytes”, *La Medicina Del Lavoro*, broj 82(3), str. 253–60.

23. Council of Europe European (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM); 2007.

24. Daabees, H. G. (2000) “Selective differential spectrophotometric methods for determination of niclosamide and drotaverine hydrochloride”, *Analytical Letters*, broj 33(4), str. 639–656.

25. Dai, J. R., Wang, W., Liang, Y. S., L. H. J., Guan, X. H., Zhu, Y. C. (2008) "A novel molluscicidal formulation of niclosamide", *Parasitology Research*, broj 103, str. 405–412.
26. Dawson, K. V. (1982) "Accumulation and loss of 2',5-dichloro-4'-nitrosalicylanilide (Bayer 73) by Fish: Laboratory studies (Report: Investigations in Fish Control 90)", *La Crosse, USA, US Fish and Wildlife Service*, strana 1-5.
27. Dawson, K. V. (2003) "Environmental Fate and Effects of the Lampricide Bayluscide: a Review", *Journal of Great Lakes Reserch*, broj 29(1), str: 475-492.
28. Dawson, K. V., Harman, P. D., Schultz, D. P., Allen, J. L. (1978) "Rapid method for determining concentrations of bayer 73 in water during lampricide treatments", *Journal of Fisheris Reserch. Board Canada*, broj 35, str. 1262–1265.
29. Dawson, K. V., Schreier, T. M., Boogaard, M. A., Gingerich, W. H. (1999) "Uptake, metabolism, and elimination of niclosamide by fish, In *Xenobiotics in Fish*", La Crosse, USA, Springer US, str.167-176.
30. Ditzel, J., Schwartz, M. (1967) "Worm cure without tears. The effect of niclosamide on *Taeniasis saginata* in man", *Acta Medica Scandinavica*, broj 182, str. 663-664.
31. Doran, G., Stevens, M. M. (2014) "Simultaneous determination of niclosamide and it's degradates in water by LC-MS/MS", *Analitical Methods*, broj 6, str. 6871.
32. El-Dib, M. A., Aly, O. A. (1976) "Persistence of some phenylamide pesticides in aquatic environment-I. Hydrolysis", *Water Reserch*, broj 10, str: 1047-1050.
33. Espinosa-Aguirre, J. J., Reyes, R. E., Cortinas de Nava, C. (1991) "Mutagenic activity of 2- chloro-4-nitroaniline and 5-chlorosalicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide", *Mutation Reserch Letters*, broj 264 (3), str. 139–145.
34. Fonseca, B. D., Diering, G. H., Bidinosti, M. A., Dalal, K., Alain, T., Balgi, A. D., Forestieri, R., Nodwell, M., Rajadurai, C. V., Gunaratnam, C., Tee, A. R., Duong, F., Andersen, R. J., Orłowski, J., Numata, M., Sonenberg, N., Roberge, M. (2012) "Structure-Activity Analysis of Niclosamide Reveals Potential Role for Cytoplasmic pH in Control of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling", *The Journal of biological chemistry*, broj 287 (21), str. 17530 –17545.
35. Fontagné-Dicharry, S., Médale, F. (2010) "The lipid content of Aqua cultured fishes and their factors of differences", *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, broj 17(4), str. 209-213.
36. Ghalkani, M., Shahrokhianab, S. (2010) "Application of carbon nanoparticle/chitosan modified electrode for the square-wave adsorptive anodic stripping

voltammetric determination of Niclosamide”, *Electrochemistry Communications*, broj 12(1), str. 66-69.

37. Gillet, J., Bruaux, P. (1961) “Essais en laboratoire des nouveaux molluscides Bayer 73 et ICI 24223”, *Bullten World Health Organization*, broj 25, str: 509-517.

38. Graebing, P. W., Chib, J. S., Hubert, T. D., Gingerich, W. H. (2004) “Aqueous photolysis of niclosamide”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, broj 25 (52), str. 870–878.

39. Graebing, P. W., Chib, J. S., Hubert, T. D., Gingerich, W. H. (2004A) “Metabolism of niclosamide in sediment and water systems”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, broj 22; 52(19), str. 5924-32.

40. Griffiths, L. A., Facchini, V. (1979) “The Major Metabolites of Niclosamide: Identification by Mass Spectrometry”. In: Frigerio A. (eds) *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Springer, Boston, MA.

41. Hamdoun, S., Jung, P., Efferth, T. (2017) “Drug Repurposing of the Anthelmintic to Treat Multidrug-Resistant Leukemia”, *Frontiers in Pharmacology*, broj 8, str. 110.

42. Hampercht, R., Westerkamp, A. (2000) “Disperse Dyes. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry (7thEdition)*” NY, NY: John Wiley and Sons.

43. Hecht, G., Gloxhuber, C. (1960) “Experimentelle Untersuchungen mit N-(2’-Chlor-4’-Nitrophenyl) – 5-Chlorsalicylamid, enem neuen bandwurmmittel: toxicologische Untersuchungen“, *Arzneimittel-Forsch*, broj 10, str. 884–885.

44. Hoelder, S., Clarke, P. A., Workman, P. (2012)” Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities”, *Molecular Oncology*, broj 6, str. 155–176.

45. Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. (2014) “Drug resistance in cancer: an overview”, *Cancers*, broj 6, str. 1769–1792.

46. Hubert, T. D., Bernardy, J. A., Vue, C., Dawson V. K., Boogaard, M. A., Schreier, T. M., Gingerich, W. H. (2005) “Residues of the lampricides 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol and niclosamide in muscle tissue of rainbow trout“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, broj 53(13), str. 5342-5346.

47. Huq, F. (2006) “Molecular Modelling Analysis of the Metabolism of Niclosamide”, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, broj 1(4), str. 376-382.

48. Imperi, F., Massai, F., Pillai, C. R., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L. (2013) “New Life for an Old Drug: the Anthelmintic Drug Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing”, *Antimicrob Agents Chemother*, broj 57(2), str. 996–1005.

49. Jin, Y., Lu, Z., Ding, K., Li, J., Du, X., Chen, C., Sun, X., Wu, Y., Zhou, J., Pan, J. (2010) "Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species", *Cancer Reserch*, broj 70(6), str. 2516-27.
50. John, S. J., Geoffrey, B. P. (1980) "Estimation of residues of the molluscicide, niclosamide, in bananas by gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyryl derivative of the substituted aniline moiety", *Pesticides Science*, broj 10 (6), str. 531-539.
51. Jurgeit, A., McDowell, R., Moese, S., Meldrum, E., Schwendener, R., Greber, F. U. (2012) "Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects", *PLOS Path*, broj 8 (10), str. 1-14.
52. Khan, F., Pal, D., Vikram, S., Singh, C. S. (2013) "Metabolism of 2-Chloro-4-Nitroaniline via Novel Aerobic Degradation Pathway by *Rhodococcus* sp. Strain MB-P1, *PLoS One*, broj 8(4), e62178.
53. Khier, A. A. Elhenawee, M., Elmasry, M. (2008) "Spectrophotometric method for the determination of some drugs sing fast red B salt", *European Journal of Chemistry*, broj 5, str: 1087-1097.
54. Kraljević, S., Stambrook, P. J., Pavelić, K. (2004) "Accelerating drug discovery", *EMBO Report*, broj 5, str. 837-842.
55. Kraushaar, A. (1954) "Chemotherapeutic activity of halogenated – salicylanilides depending on the constitution", *Arzneimittel Forsch*, broj 4, str. 548-551.
56. Lardans, V., Dissous, C. (1998) "Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission", *Parasitol Today*, broj 14, str. 413-417.
57. Lee, S. L., Son, A. R., Ahn, J., Song, J. Y. (2014) "Niclosamide enhances ROS-mediated cell death through c-Jun activation", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, broj 68, str. 619-624.
58. Lewis, R. J., Sr. Hawley's Condensed Chemical Dictionary (14th Edition) (2002). John Wiley and Sons, Inc. New York, NY P. 255.
59. Li, Y. Z. (2010) "Advances in determination of niclosamide", *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, broj 22 (6), str. 630-633.
60. Li, Y., Li, P. K., Roberts, M. J., Arend, R. C., Samant, R. S, Buchsbaum, D. J. (2014) "Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug", *Cancer Letter*, broj 349(1), str. 8-14.
61. Li, Z., Li, Q., Wang, G., Huang, Y., Mao, X., Zhang, Y., Wang, X. (2017) "Inhibition of Wnt/ β -catenin by anthelmintic drug effectively targets growth, survival, and angiogenesis of retinoblastoma", *American Journal of Translational Research*, broj 15; 9(8), str. 3776-3786.
62. Liou, G. Y., Storz, P. (2010) "Reactive oxygen species in cancer", *Free Radical Research*, broj 44, str. 479-496.

63. Liu, C., Armstrong, C., Zhu, Y., Lou, W., Gao, A. C. (2016) "Niclosamide enhances abiraterone treatment via inhibition of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer", *Oncotarget*, broj 7(22), str. 32210-32220.
64. Ljubojević, D., Ćirković, M., Đođević, V., Puvača, N., Trbović, D., Vukadinov, J. Plavša, N. (2013) "Fat Quality of Marketable Fresh Water Fish Species in the Republic of Serbia", *Czech Journal of Food Science*, broj 31(5), str. 445-450.
65. Luhning, C. W.; Harmann, P. D.; Sills, J. B.; Dawson, V. K., Allen, J. (1979) "Gas-liquid chromatographic determination of Bayer 73 in fish, aquatic invertebrates, mud, and water", *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, broj 62, str. 1141-1145
66. Lyman, W. J., Reehl, W. J., Roseblatt, D. H. (1990) "Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental behaviour of organic compounds", Washington, DC: *American Chemical Society*, str. 7-4, 7-5, 8-12.
67. Martin, R. J. (1997) "Modes of action of anthelmintic drugs", *Veterinary journal*, broj 154(1), str. 11-34.
68. Muir, D. C. G., Grift, N. P. (1980) "Determination of Niclosamide (Bayer 2353) in Water and Sediment Samples", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, broj 8(1), str.1-14.
69. Novakov, N., Radosavljević, V., Ćirković, M. (2015) "Bolesti slatkovodnih riba", Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Univerzitet Novi Sad, str: 24-70.
70. Onur, F.; Tekin, N. (1994) "Spectrophotometric determination of niclosamide and thiabendazole in tablets. *Analytical Letters*, broj 27 (12), str. 2291-2301.
71. Othman, N. S., Sultan, S. H (2014) "Spectrophotometric Determination of Niclosamide by Prior Reduction and Subsequent Diazotization-Coupling with 2,6-Dihydroxybenzoic acid – Application to Tablets", *Journal of Science and Environmental Analytical Chemistry*, broj 8, str. 1-14.
72. Paghadar, C., N., Vadia, H. (2015) "Development and validation of stability indicating RP-HPLC and HPTLC for determination of Niclosamide in bulk and in synthetic mixture", *Arabian Journal of Chemistry*, in press.
73. Park, S. J., Shin, J. H., Kang, H. Hwang, J. J. Cho, D. H. (2011) "Niclosamide induces mitochondria fragmentation and promotes both apoptotic and autophagic cell death", *BMB Report*, broj 44, str. 517-522.
74. Ping, H., Weisi, W., Benjamin, S., Xin, Z., Xi, S., Zhiyue, L., Dongjuan, Y., Liping, D., Zhongdao, W. (2017) "Molluscicidal activity and mechanism of toxicity of a novel salicylanilide ester derivative against *Biomphalaria* species", *Parasites & Vectors*, broj 10, str. 383.

75. Rajamuthiah, R., Fuchs, B. B., Conery, A. L., Kim, W., Jayamani, E., Kwon, B., Ausubel, F. M., Mylonakis, E. (2015) “Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*”, *PLoS One*, broj 10(4), e0124595.
76. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006.
77. “Službeni glasnik RS” br. 41/2009. od 01.01.2009. Zakon o bezbednosti hrane. Ministarstvo poljoprivrede Republike Srbije.
78. Schmahl, G., Taraschewski, H. (1987) “Treatment of fish parasites: effects of praziquantel, niclosamide, levamisole-HCl, and metrifonate on monogenea (*Gyrodactylus aculeati*, *Diplozoon paradoxum*)”, *Parasitology Research*, broj 73(4), str. 341–351.
79. Schnorbach, H. J., Matthaei, H. D., Muller, F. (2008) “Molluscicides. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (7th Edition)”, NY, John Wiley and Sons.
80. Schreier, T. M., Dawson, V. K., Choi, Y., Spanjers, N. J., Boogaard, M. A. (2000) “Determination of niclosamide residues in rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet tissue by high-performance liquid chromatography”, *Journal of Agricultural and Food Chemistr*, broj 48(6), str. 2212–2215.
81. Schultz, D. P., Herman, P. D. (1978) “Uptake, Distribution, and Elimination of the Lampricide 2', 5-Dichloro-4'-nitro [14C] salicylanilide (Bayer 2353) and Its 2-Aminoethanol Salt (Bayer 73) by Largemouth Bass”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, broj 26(5).
82. Smith, D. J., Gingerich, W. H., Beconi-Barker, M. G. “Xenobiotics in Fish”, Springer Science & Business Media, 6. pro 2012, str: 174-180.
83. Statham, C. N., Lech, J. J. (1975) “Metabolism of 2',5-Dichloro-4'-Nitrosalicylanilide (Bayer 73) in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)”, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, broj 32, str. 515-522.
84. Storz, P. (2005) “Reactive oxygen species in tumor progression”, *Frontiers in Bioscience*, broj 10, str. 1881–1896.
85. Struijs, J., Stoltenkamp, J. (1986) “Ultimate biodegradation of 2-, 3- and 4-nitrotoluene”, *Science of the Total Environment*, broj 57, str. 161–218.
86. SANCO/12571/2013 of 19 November 2013, [EC] European Commission. 2013. No. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Supersedes SANCO/12495/2011. Implemented by 01/01/2014. Brussels (Belgium): European Commission.

87. Tada, Y., Brena, R. M., Hackanson, B., Morrison, C., Otterson, G. A., Plass, C. (2006) "Epigenetic modulation of tumor suppressor CCAAT/enhancer binding protein alpha activity in lung cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, broj 98, str. 396–406.
88. Takougang, I., Meli, J., Wabo, P.J., Angwafo, F. (2007) "Community acceptability of the use of low-dose (Bayluscide), as a molluscicide in the control of human schistosomiasis in Sahelian Cameroon", *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, broj 101 (6), str. 479-86.
89. Terada, H. (1990) "Uncouplers of oxidative phosphorylation", *Environmental Health Perspectives*, broj 87, str. 213–218.
90. The British Pharmacopoeia, BP, British Pharmacopoeial Commission, London, 2009.
91. Tripathi, K. D. (2008) "*Essentials of Medical Pharmacology*. 6st edn", New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., str. 917.
92. Van Tonder, E. C., Maleka, T. S., Liebenberg, W., Song, M., Wurster, D. E., de Villiers, M. M. (2004) "Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates", *International Journal of Pharmaceutics*, broj 269(2), str. 417-32.
93. Van Tonder, E., De Villiers, M. M., Handford, S. J., Malan, E. P. C., Preez L. J. (1996) "Simple, robust and accurate high-performance liquid chromatography method for the analysis of several anthelmintics in veterinary formulations", *Journal of Chromatography A*, broj 729 (1–2), str. 267-272.
94. Wang, G. J., Richardson, S. R., Thayer, S. A. (1995) "Intracellular acidification is not a prerequisite for glutamate-triggered death of cultured hippocampal neurons", *Neuroscience Letter*, broj 186, str. 139–144.
95. Wartenberg, M., Hoffmann, E., Schwindt, H., Grunheck, F., Petros, J., Arnold, J. R. (2005) "Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids", *FEBS Letters*, broj 579, str. 4541–4549.
96. WHO (2002) "Specifications and evaluations for public health Pesticides Niclosamide, 2', 5-dichloro-4'-nitrosalicylanilide".
97. Xu, M., Lee, E. M., Wen, Z., Cheng, Y., Huang, W. K., Qian, X., Tcw, J., Kouznetsova, J., Ogden, S. C., Hammack, C., Jacob, F., Nguyen, H. N., Itkin, M., Hanna, C., Shinn, P., Allen, C., Michael, S. G., Simeonov, A., Huang, W., Christian, K. M., Goate, A., Brennand, K. J., Huang, R., Xia, M., Ming, G. L., Zheng, W., Song, H. Tang, H. (2016) "Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen", *Nature Medicine*, broj 22(10), str. 1101–1107.

98. Zazaa H., Abdelrahman M., Ali, N., Magdy, M. A., Abdelkawy, M. (2014) "Kinetic study and mechanism of Niclosamide degradation", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, broj 132(11), str. 655-662.