

TOKSIČNOST I KVANTIFIKACIJA ODREĐENIH SINTETIČKIH I PRIRODNIH ANTIHELMINTIKA U TKIVU INFEKTIVNE LIČINKE *Anisakis pegreffii* (Campana- Rouget & Biocca, 1955) PRI ANTIPARAZITSKOM TRETMANU

Roje Busatto, Romana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:551886>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Romana Roje Busatto

**TOKSIČNOST I KVANTIFIKACIJA ODREĐENIH
SINTETIČKIH I PRIRODNIH ANTIHELMINTIKA U
TKIVU INFEKTIVNE LIČINKE *Anisakis pegreffii*
(Campana-Rouget & Biocca, 1955) PRI
ANTIPARAZITSKOM TRETMANU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Romana Roje Busatto

**TOKSIČNOST I KVANTIFIKACIJA ODREĐENIH
SINTETIČKIH I PRIRODNIH ANTIHELMINTIKA U
TKIVU INFEKTIVNE LIČINKE *Anisakis pegreffii*
(Campana-Rouget & Biocca, 1955) PRI
ANTIPARAZITSKOM TRETMANU**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević, znanstveni savjetnik u trajnom
izboru

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Science

Romana Roje Busatto

**TOXICITY AND QUANTIFICATION OF CERTAIN
SYNTHETIC AND NATURAL ANTHELMINTICS IN
THE TISSUE OF INFECTIOUS *Anisakis pegreffii*
(Campana-Rouget & Biocca, 1955) LARVAE
DURING THE ANTIPARASITIC TREATMENT**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Ivana Ujević, PhD, Senior Scientist

Zagreb, 2023

Ova doktorska disertacija je izrađena u Laboratoriju plankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost, AnGEI (*Anisakis spp.: genomic epidemiology*, broj ugovora 5576).

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

Veliko hvala mentorici dr. sc. Ivani Ujević na pomoći, razumijevanju i strpljenju pri izradi ove disertacije.

Hvala članovima povjerenstva dr. sc. Romani Gračan, dr. sc. Tvrtku Smitalu, dr. sc. Damiru Kapetanoviću i dr. sc. Petru Kružiću na izdvojenom vremenu, pažljivom čitanju, uloženom trudu, te vrijednim savjetima koji su doprinijeli konačnoj verziji ovog rada.

Zahvaljujem voditeljici HRZZ projekta AnGEL (*Anisakis spp. Genomic Epidemiology*), dr. sc. Ivoni Mladineo i suradnicima na projektu: dr. sc. Jerku Hrabaru, dr. sc. Ivani Bušelić, dr. sc. Željki Trumbić i dr. sc. Ivani Babić na suradnji i pomoći tijekom eksperimentalnog dijela i finalizacije rada.

Jako sam zahvalna voditeljici doktorskog studija dr. sc. Kristini Pikelj koja uvijek nađe vremena za savjet i pomoć 'izgubljenim' doktorandima.

Hvala svim kolegama iz Laboratorija za plankton i toksičnost školjkaša, a posebno ekipi za analizu biotoksina, Nikši Nazliću, Romanu Garberu i Antoniji Bulić na razumijevanju i podršci u 'nevremenima' monitoringa i analiza.

Hvala dragoj kolegici dr. sc. Danijeli Bogner koja je uvijek tu za mene.

Zahvalna sam svojim najboljim prijateljicama Ivani, Ivani, Luci, Tini, Adriani i Marini na podršci i 'antistres' terapijama.

Zahvaljujem svojoj obitelji, majci, suprugu i kćerki na podršci i razumijevanju.

Hvala!

Sadržaj

SAŽETAK	IV
ABSTRACT	V
SUMMARY	VI
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Infestacija ličinkama iz porodice Anisakidae	5
2.1.1. <i>Klasifikacija roda Anisakis</i>	5
2.1.2. <i>Pojavnost infestacije ličinkama roda Anisakis u svijetu</i>	7
2.1.3. <i>Pojavnost infestacije ličinkama roda Anisakis u Hrvatskoj</i>	7
2.1.4. <i>Infestacija ličinkama roda Anisakis u komercijalnim vrstama ribe</i>	9
2.1.5. <i>Dijagnosticiranje infestacije Anisakis ličinkom</i>	9
2.1.6. <i>Prevenција infestacije Anisakis ličinkom</i>	12
2.2. Biologija roda Anisakis	13
2.2.1. <i>Morfologija roda Anisakis</i>	13
2.2.2. <i>Životni ciklus roda Anisakis</i>	13
2.3. Kontrola infestacija oblicima primjenom antihelmintika	15
2.3.1. <i>Podjela sintetičkih antihelmintika i osnovni mehanizmi djelovanja</i>	16
2.3.2. <i>Rezistencija oblića na antihelmintike</i>	20
2.3.2.1. <i>Mehanizmi rezistencije</i>	22
2.3.3. <i>Prirodni terapeutici</i>	24
2.4. Primijenjene metode pri određivanju toksičnog djelovanja terapeutika na Anisakis ličinke	26
2.4.1. <i>Određivanje ispitivanih spojeva metodom tekućinske kromatografije</i>	26
2.4.2. <i>Određivanje oksidativnog stresa mjerenjem razine reaktivnih kisikovih čestica (ROS)</i>	27
2.4.3. <i>Acetometoksi kalcein (C-AM) test</i>	28
2.4.4. <i>Imunohistokemijske metode analize</i>	28
3. CILJEVI I HIPOTEZE	30
3.1. Ciljevi istraživanja	30
3.2. Hipoteze	31
4. MATERIJALI I METODE	33
4.1. Reagensi i kemikalije	33
4.1.1. <i>Priprema mobilnih faza za tekućinsku kromatografiju</i>	33

4.1.2. Priprema standardnih otopina ispitivanih spojeva	33
4.2. Prikupljanje L3 ličinki vrste <i>Anisakis pegreffii</i>	34
4.3. <i>In vitro</i> tretmani L3 ličinki vrste <i>Anisakis pegreffii</i>.....	35
4.3.1. Testiranje toksičnosti i određivanje LC_{50} ispitivanih spojeva	35
4.3.1.1. Postavljanje eksperimenta za određivanje LC_{50} ispitivanih spojeva.....	36
4.3.1.2. Postupak očitavanja rezultata eksperimenta za određivanje LC_{50} ispitivanih spojeva.....	39
4.3.1.3. Ekstrakcija ispitivanih spojeva iz tretiranih <i>Anisakis</i> L3 ličinki nakon LC_{50} eksperimenta	40
4.3.2. Određivanje LC_d ispitivanih spojeva na <i>Anisakis</i> ličinke i priprema za daljnje analize	41
4.3.2.1. Određivanje učinaka LC_d ispitivanih spojeva na <i>Anisakis</i> ličinke.....	41
4.3.2.2. Uzorkovanje i priprema tretiranih <i>Anisakis</i> L3 ličinki za daljnje analize	43
4.3.2.2.1. Priprema tretiranih <i>Anisakis</i> L3 ličinki za određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u stanicama metodom kolorimetrije.....	43
4.3.2.2.2. Priprema tretiranih <i>Anisakis</i> L3 ličinki za imunohistokemijsku (IHC) analizu.....	43
4.3.2.2.3. Ekstrakcija ispitivanih spojeva iz tkiva tretiranih <i>Anisakis</i> L3 ličinki za analizu tekućinskom kromatografijom.....	44
4.3.2.2.4. Priprema <i>Anisakis</i> L3 ličinki za acetometoksi kalcein (C-AM) test	44
4.4. Određivanje akumulacije ispitivanih spojeva u tkivu <i>Anisakis</i> L3 ličinke metodom tekućinske kromatografije.....	44
4.4.1. Uvjeti kromatografske analize.....	45
4.4.1.1. Kromatografska metoda za analizu farnesola.....	46
4.4.1.2. Kromatografska metoda za analizu nerolidola	47
4.4.1.3. Kromatografska metoda za analizu abamektina	47
4.4.1.4. Kromatografska metoda za analizu levamisola.....	48
4.4.2. Kalibracijski pravci ispitivanih spojeva.....	49
4.4.2.1. Kalibracijski pravac farnesola.....	49
4.4.2.2. Kalibracijski pravac nerolidola	54
4.4.2.3. Kalibracijski pravac abamektina	59
4.4.2.4. Kalibracijski pravac levamisola.....	64
4.5. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u stanicama <i>Anisakis</i> ličinki.....	69
4.6. Kalcein (C-AM) test	70
4.7. Imunohistokemijska (IHC) analiza strukturnih proteina tretiranih <i>Anisakis</i> ličinki.....	70
4.8. Statistička analiza	71
5. REZULTATI.....	73
5.1. Određivanje toksičnosti ispitivanih spojeva nakon <i>in vitro</i> tretmana ličinki <i>Anisakis pegreffii</i>.....	73
5.1.1. Rezultati testova toksičnosti i LC_{50} ispitivanih spojeva.....	73
5.1.1.1. Toksičnost farnesola na <i>Anisakis</i> L3 ličinke	75

5.1.1.2. Toksičnost nerolidola na <i>Anisakis</i> L3 ličinke.....	76
5.1.1.3. Toksičnost abamektina na <i>Anisakis</i> L3 ličinke.....	77
5.1.1.4. Toksičnost levamisola na <i>Anisakis</i> L3 ličinke.....	78
5.1.2. Ovisnost djelovanja ABC inhibitora (MK571 i valspodara) o vremenu izloženosti ispitivanim spojevima	80
5.1.2.1. Ovisnost toksičnosti farnesola o vremenu izloženosti na <i>Anisakis</i> L3 ličinke.....	83
5.1.2.2. Ovisnost toksičnosti nerolidola o vremenu izloženosti na <i>Anisakis</i> L3 ličinke	86
5.1.2.3. Ovisnost toksičnosti abamektina o vremenu izloženosti na <i>Anisakis</i> L3 ličinke	89
5.1.2.4. Ovisnost toksičnosti levamisola o vremenu izloženosti na <i>Anisakis</i> L3 ličinke	92
5.2. Procjena unutarstanične proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u <i>Anisakis</i> ličinkama.....	95
5.3. Rezultati kalcein (C-AM) testa	97
5.4. Rezultati imunohistokemijske analize citoskeleta tretiranih <i>Anisakis</i> ličinki.....	98
6. RASPRAVA	104
6. ZAKLJUČCI.....	112
7. LITERATURNI IZVORI.....	115
8. ŽIVOTOPIS	137



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Geološki odsjek, Oceanologija

Doktorska disertacija

SAŽETAK

TOKSIČNOST I KVANTIFIKACIJA SINTETIČKIH I PRIRODNIH ANTIHELMINTIKA U TKIVU INFEKTIVNE LIČINKE *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) PRI ANTIPARAZITSKOM TRETMANU *IN VITRO*

mr. sc. Romana Roje Busatto

Institut za oceanografiju i ribarstvo. Šetalište I. Meštrovića 63, 21000 Split

Uslijed sve češće pojave nametničkih infestacija i razvoja otpornosti nametnika na tretmane postojećim antihelminticima potrebno je ispitati učinkovitost i mehanizme istih, ali i okrenuti se alternativnim, prirodnim izvorima zaštite. Ovo istraživanje predstavlja nove informacije o učinkovitosti mehanizama samozaštite L3 ličinki nametničke vrste oblića *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) u interakciji sa sintetičkim antihelminticima, abamektinom i levamisolom, te prirodnim seskviterpenskim spojevima, farnesolom i nerolidolom. Provođenjem *in vitro* eksperimenata s nizom koncentracija ispitivanih spojeva uz prisustvo/odsustvo inhibitora ABC transportera, valspodara ili MK571, su metodom tekućinske kromatografije određene njihove letalne koncentracije i razlike u razini akumulacije u tkivima *Anisakis* ličinki što daje uvid u mehanizme samozaštite ličinki koji se očituju u staničnoj aktivaciji ABC transmembranskih transportnih proteina (P-gp i MRP). Toksičnost ispitivanih spojeva na stanice ličinki je dodatno potvrđena testom proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica (engl. *reactive oxygen species*, ROS), dok je imunohistokemijski određen njihov štetni utjecaj na citoskelet ličinki. Navedena ispitivanja doprinose razumijevanju mehanizma procesa višestruke rezistencije na ksenobiotike (engl. *multixenobiotic resistance*, MXR) čime su se dobile smjernice za daljnja ispitivanja s ciljem odgode pojave rezistencije na korištene terapijke.

Ključne riječi: ABC transmembranski transporteri / *Anisakis* / antiparazitska sredstva / multixenobiotička otpornost / nametnici / tekućinska kromatografija

Rad sadrži: 143 stranice, 54 slike, 11 tablica i 180 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Mentori: izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

dr. sc. Tvrtko Smital, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

dr. sc. Damir Kapetanović, viši znanstveni suradnik



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Geology, Oceanology

Doctoral Thesis

ABSTRACT

TOXICITY AND QUANTIFICATION OF SYNTHETIC AND NATURAL ANTHELMINTICS IN THE TISSUE OF INFECTIOUS *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) LARVAE DURING THE ANTIPARASITIC *IN VITRO* TREATMENT

MSc Romana Roje Busatto

Institute of Oceanography and Fisheries. Šetalište I. Meštrovića 63, 21000 Split

Due to the widespread prevalence of parasitic infestations and numerous reports on parasites developing resistance to anthelmintic treatments, it is necessary to investigate the efficacy and mechanisms of action of the currently used therapeutics, but also to turn to alternative, natural sources. This research provides new information on the efficacy of the self-protective mechanism of the parasitic species *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) when interacting with frequently used anthelmintics, abamectin and levamisole, and natural sesquiterpene compounds, farnesol and nerolidol. After performing *in vitro* experiments with a range of concentrations of the tested compounds in the presence/absence of the ABC transporter inhibitors valspodar or MK571, the liquid chromatography technique was used to determine lethal concentrations and differences in toxicity and accumulation of the target compounds in *Anisakis* L3 larvae. Production of Reactive Oxygen Species (ROS) indicated the level of stress and immunohistochemistry was used to evaluate deleterious effects of the tested compounds on the cytoskeleton of *Anisakis* larvae. Insight into the defence mechanism of treated larvae manifested by cellular activation of ABC transporters (P-gp and MRP transmembrane proteins) contributes to the understanding of the Multixenobiotic Resistance (MXR) mechanisms and provides guidelines for further research to delay the onset of this type of anthelmintic resistance.

Keywords: ABC Transmembrane Transporters / *Anisakis* / Antiparasitic agents / Multixenobiotic Resistance / Parasite / Liquid Chromatography

Thesis contains: 143 pages, 54 figures, 11 tables and 180 references

Original in: Croatian

Supervisor: Ivana Ujević, PhD, Senior Scientist

Reviewers: Romana Gračan, PhD, Associate Professor

Tvrtko Smital, PhD, Senior Scientist

Damir Kapetanović, PhD, Senior Research Associate

SUMMARY

The increasing trend to consume raw or thermally insufficiently processed fish increases the incidence of zoonoses transmitted in this way. The harmful effects on human health of species belonging to the genus *Anisakis*, as well as the negative impact on the commercial value of marine fish, require the interest of health institutions, the fishing industry and research institutions in studying this type of endoparasitic disease. Edible tissues from raw fish may contain parasitic larvae of the third developmental stage (L3) of the genus *Anisakis*, which cause an infestation known as anisakiasis in humans. It is suspected that the low number of reported cases of anisakiasis in Croatia, as in other Mediterranean countries, is actually underestimated. This claim is supported by the possibility that the symptoms of anisakiasis may be misdiagnosed as other, much more common gastrointestinal diseases. Live *Anisakis* larvae are removed from the human organism (gastro)endoscopically and surgically (excision), but certain drugs for other diseases are also used in these cases as adjunctive therapy to relieve patients' symptoms. Anthelmintics are drugs used to treat this infestation. However, they must be selectively toxic, i.e. they must have a toxic effect on the parasite without having a significant harmful effect on the host organism itself. While there appears to be a substantial number of therapeutics on the market that affect the parasitic nematodes, if those to which resistance has developed are taken out, the number of remaining anthelmintics to treat the infestation is significantly reduced. And if those that are toxic and not approved for human use are excluded from this number, only a very small number of available therapeutics remain, provided the nematodes do not develop resistance to them.

The indiscriminate and mass use of drugs in veterinary medicine has resulted in parasite populations that are selectively resistant to various pharmacological groups (Shalaby, 2013). Since anthelmintics with similar chemical structures are often used in treatment, resistance to one agent usually means resistance to other agents in the same group. The use of large quantities of veterinary medicines in aquaculture can contribute to the development of environmental stress, and the increasingly common development of parasite resistance to anthelmintics is becoming a global problem affecting animals, people and the economy. Shalaby (2013) warns that it is extremely important to find clever and more sustainable ways to use existing anthelmintics, with the aim of maintaining their efficacy in as many parasitic species as possible

for as long as possible; while Schulz et al. (2018) point to the need to improve existing drugs, but also to find their alternative sources. Given the global emergence of resistance to synthetic anthelmintics and the current societal demand for natural therapeutics, there is a growing need for therapeutics with alternative mechanisms of action that would prevent the development of resistance.

The mechanism of multixenobiotic resistance (MXR) is a cellular defence system in the form of a cellular detoxification mechanism responsible for the organism's simultaneous resistance to different xenobiotics. ABC (ATP binding cassette, ABC) transport proteins of the cell membrane, through binding and hydrolysis of ATP molecules, use the energy obtained to carry out certain cellular processes and also for active transport across the membranes or organelles of the cells, such as the uptake and concentration of substances essential for the life of the organism, but also for the efflux of potentially toxic substances from the cells of the organism (Jones and George, 2004). In this dissertation, ABC transporters, so-called protein exporters, were used for the active efflux of xenobiotics from the larval cell. In addition, there are compounds called MXR inhibitors that can block the activity of these transport proteins in the cell membrane, leading to increased accumulation of xenobiotics in the cell by blocking their efflux and allowing their potentially toxic effect on the organism. Inhibitors of ABC transporters administered concomitantly with the therapeutic drug increase the sensitivity of cells to the therapy by preventing active excretion of the drug (Ozben, 2006). In this work, the following ABC transporter inhibitors were used: Valspodar, a P-gp inhibitor, and MK571, an MRP inhibitor.

This dissertation provides new information on the efficacy of self-protective mechanisms of the invasive species *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) in interaction with synthetic anthelmintics, Abamectin and Levamisole, and natural sesquiterpene compounds, Farnesol and Nerolidol. Through combined *in vitro* experiments with a range of concentrations of the tested compounds in the presence or absence of ABC transporter inhibitors, Valspodar or MK571, their lethal concentrations and differences in the level of accumulation in the tissues of *Anisakis* larvae were determined by the liquid chromatography method, providing information on their toxicity and insights into larval self-protection mechanisms manifested in the cellular activation of the ABC transmembrane transporter proteins (transporters; P-gp and MRP) when exposed to toxic compounds. The role of the ABC transporter inhibitors used was to abolish the resistance of the parasite to the applied therapeutic, since, when administered simultaneously with the therapeutic agent, they prevent

its active efflux through ABC transporters across the membranes of the parasite cells, thus increasing the sensitivity of these cells to the therapy. The toxicity of the investigated compounds on the cells of *Anisakis* larvae was additionally confirmed by measuring the production of reactive oxygen species (ROS), while their deleterious effect on the larval cytoskeleton was determined by immunohistochemistry. The above tests additionally contribute to the understanding of multiple resistance to xenobiotics (multixenobiotic resistance, MXR), which provides guidelines for further tests aimed at delaying the emergence of resistance to the therapeutics used.

Liquid chromatography with ultraviolet detection method (UHPLC-UV-DAD) was used to determine the toxicity of the tested compounds, e.g. the lethal LC₅₀ concentrations and the amount of accumulated tested compounds in the tissues of L3 *Anisakis* larvae after 24 h *in vitro* treatment with Abamectin, Levamisole, Farnesol and Nerolidol, at six working concentrations each, in the absence of ABC transporter inhibitors and in the presence of Valspodar or MK571. The results showed that these tested compounds have toxic effect on L3 *Anisakis* larvae after the above treatments, that the addition of the inhibitor (Valspodar or MK571) affects the toxicity of the tested compounds and that increase in concentration of the tested compound affects the toxicity to these larvae. Nerolidol showed the lowest toxicity, although it was very similar to that of Farnesol, while Levamisole showed pronounced toxicity. Higher LC₅₀ values for the lethal concentration (where mortality was 50% of the total number of treated individuals) were observed for natural compounds (> 100 µmol/L) compared to synthetic anthelmintics (< 1 µmol/L). A significant decrease in the value of the lethal concentration of the tested compound in the presence of the inhibitor indicates that the substance is effluxed by the transporter which is affected by the specific inhibitor. The transporter MK571 significantly affected the toxicity of Farnesol and Valspodar affected the toxicity of Nerolidol, while the activity of both transporters was reflected in the reduced toxicity of Levamisole. Of the compounds tested, Abamectin showed the highest toxicity to *Anisakis* larvae, even in the absence of ABC transporter inhibitors. The results of this dissertation show for the first time that P-gp and MRP transporters in *Anisakis* larvae are involved in the efflux of all tested compounds at a certain level after a certain exposure period, as MRP transporters dominated in the efflux of Farnesol, P-gp transporters were responsible for the efflux of Nerolidol, while the obtained results show that both P-gp and MRP transporters are involved in the efflux of Levamisole from larval cells. An exception was Abamectin, where no difference in toxicity of this tested compound was observed, neither alone nor in combination with any of

the ABC transporter inhibitors used, suggesting that other pathways or transport proteins may be relevant for elimination from the cell or that, as a macrocyclic lactone, it itself has the role of a P-gp inhibitor.

The LC_d concentrations characteristic of each of the compounds tested, determined after 24 h *in vitro* treatment of *Anisakis* L3 larvae with these compounds, represented the concentration at which the greatest difference in larvicidal effect was observed with the predominant ABC inhibitor (MK571 or Valspodar) compared to the effect of the tested compound itself when acting alone. This suggests that the particular tested compound is eliminated from the cell by the activity of the transporter affected by that particular inhibitor. Using these specific concentrations, the activity of the P-gp and MRP transporters in *Anisakis* larval cells was determined by measuring the accumulation of the tested compounds in larval tissues using the liquid chromatography method, performing a calcein AM assay, determining the effects of the tested compounds on cytoskeletal proteins (actin and β -tubulin) and determining the production of reactive oxygen species (ROS). The results showed that Farnesol and Nerolidol had similar and significantly higher (100-fold) LC_d concentrations than Abamectin and Levamisole. After treatment of *Anisakis* larvae with Farnesol and Nerolidol at their LC_d concentrations, the highest accumulation levels of the above compounds in the cells was observed 18 hours after treatment in combination with their dominant ABC transporter inhibitor, MK571 for Farnesol and Valspodar for Nerolidol, suggesting the inhibited activities of MRP and P-gp (respectively). Treatment of larvae with Levamisole showed that in the first hours the dominant transporter was P-gp, and after 24 hours of treatment it was efficiently eliminated from the cell by both transporters. In the case of Abamectin, no difference was found between the activity of these two transporters, but based on the data obtained for accumulation in larval tissues and calcein AM assay analysis, it was shown that MRP increased the efflux of this tested compound after 12 hours of treatment, after which the efflux continued via a different pathway. This result may suggest that enzymatic mechanisms in *Anisakis* larvae play a role in the metabolism of Abamectin, which, converted to another form, is no longer a substrate for these two transporters. Nevertheless, the highest toxicity demonstrated for *Anisakis* larvae compared to the other three tested compounds justifies its use as an anthelmintic even without the addition of a specific ABC transporter inhibitor, especially since the use of inhibitors may increase the toxicity of the therapeutic to the parasite and the host itself, leading to potentially harmful side effects.

The calcein AM assay showed an increase in fluorescence in the treatment with Abamectin in combination with Valspodar compared to abamectin alone, suggesting that the applied Abamectin concentration left certain binding sites on the P-gp transporter active. In agreement with the previously mentioned data, higher fluorescence was recorded in *Anisakis* tissue after treatment with Farnesol in combination with MK571, Nerolidol with Valspodar, while it was of similar intensity in larvae treated with Levamisole in the presence absence of the inhibitors, although the accumulation results indicate that this tested compound has a greater affinity for P-gp than for MRP transporters. The accumulation results of the tested compounds in the presence and absence of one of the inhibitors measured by the liquid chromatography method are consistent with the calcein AM transporter activity assay, providing additional evidence that the activation and function of transporter efflux changes during exposure to a particular toxicant.

Analysis of intracellular production of reactive oxygen species (ROS) in *Anisakis* L3 larvae after treatment with the tested compounds showed the highest values in larvae sampled two hours after exposure to Abamectin alone, while 2.5 times lower levels were found in larvae after treatment with Farnesol in combination with Valspodar, and 3.7 times lower levels were measured in larvae after treatment with Levamisole alone, while samples treated with Nerolidol had the lowest readings of reactive oxygen particles. This observed absence of defence mechanisms in *Anisakis* larvae against oxidative stress induced by Abamectin and Farnesol confirms their sensitivity to these therapeutic agents and the usefulness of their application in the therapy of this type of infestation.

Using the immunohistochemical method, it was confirmed that the tested compounds affect the integrity of β -tubulin in the cuticle of *Anisakis* larvae. In this dissertation, positive signal of tubulin in the cuticle of *Anisakis* larvae was detected for the first time. After *in vitro* treatment of larvae with the tested compounds, the most pronounced histological changes were visible in Abamectin-treated samples. Abamectin affected β -tubulin, causing granulation, depolymerisation and complete separation of the cuticle from the larval body, but it also affected the arrangement and appearance of actin fibres. A similar effect on tubulin, but less intense and with a lesser effect on actin fibres, was observed in larvae treated with Levamisole, Farnesol, and Nerolidol. It can be concluded that tubulin, as a key element in the cuticle of *Anisakis* larvae, is an important site of action for the tested compounds, but further studies are needed to confirm its potential sensitivity to therapeutics.

Many parasite species have genetic traits that favour the development of anthelmintic resistance. A certain degree of resistance among different species of gastrointestinal nematodes has already been established for all major groups of therapeutic agents. Any exposure of the host to an anthelmintic exerts some selection pressure for the development of resistance. This dissertation also presents the results of toxicity evaluation and the mechanisms of active elimination of potential alternative (natural) therapeutic compounds from parasitic nematodes of *Anisakis* species, which is an important step in the fight against this type of infestation.

§ 1. UVOD

Uz tradicionalne načine pripremanja ribe, posljednjih se godina u svijetu uočava i sve veći trend konzumiranja zdrave i sirove hrane, pa time i ribe, što posljedično uzrokuje i sve veću učestalost bolesti poput zoonoza koje se tim putem prenose. Među njima sve veću pozornost javnosti, ali i nadležnih institucija privlače endoparazitske bolesti poput anisakidoze, odnosno anisakijaze. Zbog štetnog utjecaja oblića koji pripadaju rodu *Anisakis* na ljudsko zdravlje, ali i negativnog utjecaja na komercijalnu vrijednost morske ribe, sve je veći interes zdravstvenih ustanova i ribarske industrije za njihovo proučavanje.

U jestivim tkivima sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe mogu se nalaziti infektivne ličinke trećeg razvojnog stadija (L3) nametničkog oblića iz roda *Anisakis*, koji uzrokuje ljudsku infestaciju poznatu kao anisakijaza. U svijetu raste broj evidentiranih slučajeva ove zoonoze koji je povezan sa sve većom potrošnjom ribe, pribjegavanju tradicionalnim i zdravim načinima pripreme, povećanjem uvoza hrane, pojačanom migracijom ljudi, ali i razvojem alata za dijagnostiku i povećanjem znanja o anisakijazi.

Oblići (nematodi; lat. *Nematoda*) su brojna i rasprostranjena životinjska skupina koja živi u slatkoj i slanoj vodi, te tlu, a parazitiraju biljke, beskralješnjake i kralješnjake. Nametničke (parazitne) infestacije koje se prenose konzumiranjem sirove ili nedovoljno kuhane hrane, poput mesa, puževa, slatkovodne ribe, vodenih beskralješnjaka, te morskih organizama se nazivaju nematodijaze (Newell i sur., 2010). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je 2008. procijenila da je više od milijardu ljudi širom svijeta infestirano jednom ili više vrsta oblića kao crijevnih nametnika, a da je do 2012. godine zabilježeno 56 milijuna slučajeva nametničkih infestacija (među kojima je i anisakidoza) povezanih s konzumiranjem ribljih proizvoda (WHO, 2012).

U pogledu terapije anisakidoze još uvijek je primarno (gastro)endoskopsko, odnosno kirurško uklanjanje (ekscizija) žive *Anisakis* ličinke iz ljudskog organizma. Ponekad se pribjegava i korištenju određenih lijekova za druge bolesti s ciljem ublažavanja simptoma u pacijenata (antibiotici, antikolinergici i kortikosteroidi; Pravettoni i sur., 2012) kao dopunska terapija kod ovakvih stanja (iako s jako ograničenom učinkovitosti), ili u slučajevima kada su ličinke prodrle u stijenke želuca ili crijeva (Guardone i sur., 2018). Uz globalno sve češću pojavu rezistencije na sintetičke antihelmintike i trenutni društveni zahtjev za prirodnim

terapeutskim proizvodima, sve je veća potreba za pronalaženjem terapeutika s alternativnim mehanizmima djelovanja koji bi spriječio pojavu rezistencije.

Antiparazitici su lijekovi koji djeluju protiv nametnika (parazita). Crijevni nametnici, odnosno endoparaziti su: *Protozoa* (praživotinje – jednostanični organizmi), *Cestoda* (trakavice – trakasti crvi), *Trematoda* (metilji) i *Nematoda* (oblići – valjkasti crvi, gliste). Antiendoparazitici su lijekovi kojima se pokušavaju suzbiti nametničkih infestacije u crijevima i tkivima parazitiranih ljudi i životinja. Oboljenje uzrokovano crvolikim nametnicima kao što su trakavice, metilji i oblići (prema izvornom latinskom nazivlju ove skupine životinja zajednički se nazivaju *Vermes* ili *Helminthes*), izazivaju zoonoze skupnog naziva helmintijaze, a protiv njih djeluju antinematodni lijekovi koji se nazivaju i antihelmintici.

U svijetu nema službenog lijeka odobrenog za liječenje anisakijaze (kirurško uklanjanje je primarno; Shimamura i sur., 2016), već u tu svrhu WHO (2017) navodi terapeutike za druge tipove crijevnih nametnika koji uključuju: pirantel (tetrahidropirimidini), levamisol (imidazotiazoli), ivermektin (makrociklički laktoni), niklozamid (salicilanilidi), prazikvantel (pirazinoizokinoloni), zatim albendazol i mebendazol (benzimidazoli). Ivermektin, kao i abamektin, pripada skupini makrocikličkih laktona, i ima dokazano učinkovito djelovanje na mnoge nametničke oblice. On otvara glutamatom regulirane kloridne kanale što rezultira paralizom oblića. Dziekońska-Rynko i sur. (2002) su u svojoj studiji ispitali djelovanje ivermektina u koncentracijama 1 mg/mL pri pH 7,0 i 50 mg/mL pri pH 2,0 na ličinku *A. simplex* koja je pokazala smrtnost od 80 do 100 % nakon 48 sati izloženosti lijeku u navedenim koncentracijama, s izraženijom učinkovitošću u neutralnom mediju.

Obuhvaćajući znanstvenu literaturu od 2010. i patente od 2000. do 2018., Garcia-Bustos i suradnici su 2019. objavili podatak da su u tom razdoblju uvedena u upotrebu samo četiri nova antinematodna terapeutika: monepantel, sintetički antihelmintik iz skupine aminonitrila, te tri lijeka dobivena metabolizmom bakterija koji pripadaju skupinama makrocikličkih laktona, ciklooktadepsipeptida i paraherkvamida. Usprkos značajnim naporima malog broja institucija u identifikaciji i razvoju nove klase antihelmintičkih lijekova, malo je vjerojatno da će se proizvod s novim načinom djelovanja proizvesti u skoroj budućnosti, a nedvojbeno će i on vrlo brzo biti pogođen problemom rezistencije. Stoga je od iznimne važnosti pronaći održive načine upotrebe postojećih (ali i novih) antihelmintičkih spojeva, kako bi im se što dulje očuvala učinkovitost u što više nametničkih vrsta. Jedna, još nedovoljno istražena, strategija u tretiranju nametničkih oblića s ciljem odgode rezistencije bi bila istovremena primjena dvaju ili više terapeutika s različitim načinima djelovanja (Leathwick, 2012). Druga strategija bi obuhvaćala

poznavanje uloge membranskih transportnih proteina koji aktivno izbacuju primijenjeni terapeutik van stanica nametnika, te istovremena primjena terapeutika i inhibitora koji djeluje na taj transporter na način da zaustavlja njegovu aktivnost i na taj način omogućuje nakupljanje terapeutika u stanici nametnika osiguravajući njegovo djelovanje u smanjenoj terapijskoj dozi.

Posljednjih se godina u literaturi sve češće pojavljuju informacije o antibakterijskom, insekticidnom, antioksidativnom, antifungicidnom i sličnom djelovanju prirodnih spojeva, pa tako i esencijalnih ulja, ali i o njihovom djelovanju protiv ljudskih i životinjskih ekto- i endoparazita koji već imaju razvijenu rezistenciju na konvencionalne lijekove (Sharifi-Rad i sur., 2017). Esencijalna ulja su kompleksni spojevi lako hlapivih biljnih komponenti kao što su monoterpeni i seskviterpeni, i mogu predstavljati novu strategiju u borbi protiv nametničkih oblića, uključujući i L3 *Anisakis* ličinke (Giarratana i sur., 2014). Zbog svoje lipofilnosti ova ulja prolaze kroz citoplazmatsku membranu stanice i narušavaju strukturu polisaharidnog sloja, masnih kiselina i fosfolipida, koji time postaju propusni. Tako histološke analize pokazuju oštećenja kutikule i probavnog trakta oblića iz riba izloženih esencijalnom ulju timijana *Thymus vulgaris* (Giarratana i sur., 2014), te geraniolu, citronelolu, citralu, karvakrolu i kuminaldehidu (Hierro i sur., 2004), dok su Pérez i sur. (2016) pokazali *in vivo* učinkovitost esencijalnog ulja mažurana *Origanum vulgare* protiv ličinke roda *Anisakis*. López i sur. (2018) su metodom plinske kromatografije pokazali da su karvakrol (50,3 %) i timol (14,8 %) glavni sastojci ulja origana *Origanum compactum*, te su ga primijenili za tretiranje ličinke *Anisakis simplex* izolirane iz ugotice *Micromesistius poutassou*. Smrtnost ličinke nakon 24- i 48-satne izloženosti koncentraciji od 1 µL/mL je iznosila 100 %, s niskom vrijednošću srednje smrtonosne koncentracije LC₅₀ (engl. *lethal concentration*; koncentracija koja uzrokuje smrtnost 50 % tretiranih jedinki). Navedeni sastojci ulja su inhibirali enzim acetilkolinesterazu (AChE), čime su ukazali na to da bi ovo mogao biti jedan od mehanizama njihovog antihelmintičkog djelovanja. Djelotvornost raznih esencijalnih ulja su u svom radu prikazali Valero i sur. (2015), gdje je u *in vitro* uvjetima ulje čajevca *Melaleuca alternifolia* pokazalo maksimalnu učinkovitost pri tretiranju *Anisakis* ličinke nakon 48 sati pri koncentracijama od 7 i 10 mg/mL. Esencijalno ulje paprene metvice *Mentha piperita* je pokazalo letalna svojstva pri koncentraciji od 250 mg/mL, esencijalno ulje crnog papra *Piper nigrum* je eliminiralo 83.3 % nametnika pri koncentraciji 125 mg/mL, dok ulje muškarnog oraščića *Myristica fragans*, za kojeg se smatralo da ima potencijala, nije pokazao nematocidnu aktivnost.

Imunohistokemijske metode su se počele primjenjivati 1930.-ih godina. Imunohistokemija predstavlja proces lokalizacije specifičnih antigena u tkivu ili stanici

(imunocitokemija) pomoću ciljno usmjerenih antitijela po osnovnom principu imunologije da određeno antitijelo prepozna i veže se na određeni antigen. Metodom imunohistokemijskog bojanja se može mjeriti količina citoskeletnih proteina, aktina i tubulina, dobivene analizom specifičnog kemiluminiscencijskog signala pojedinog proteina, odnosno može se izračunati količina pojedinog citoskeletnog proteina u ukupnoj količini proteina u uzorku. Citoskelet čini strukturnu okosnicu stanice, ali je i odgovoran za prijenos signala iz okoline i za stanično (i unutarstanično) kretanje. To je sustav proteinskih filamenata koji se proteže kroz čitavu citoplazmu. Citoskelet se sastoji od triju osnovnih filamenata koji održavaju oblik i mehaniku stanice: aktinskih filamenata (mikrofilamenata), mikrotubula i intermedijarnih filamenata (Pessoa-Pureur i sur, 2014). Uslijed štetnih djelovanja kemijskih spojeva na stanicu, može doći do promjena u strukturi citoskeletnih elemenata, kao što je poremećaj u organizaciji mikrotubula ili njegovih osnovnih građevnih jedinica heterodimernih proteina, α - i β -tubulina, ili narušavanje strukture monomernog proteina aktina u mikrofilamentima. Histološka ispitivanja djelovanja aktivnih spojeva, među kojima su i terpeni farnesol i nerolidol, su pokazala toksično djelovanje na *Anisakis* ličinke, te su zabilježene promjene na kutikuli i/ili puknuće stijenke crijeva nametnika (Navarro-Moll i sur., 2011).

Oksidativni stres je posljedica neravnoteže stvaranja reaktivnih (slobodnih) kisikovih čestica (radikala) i sposobnosti unutarstaničnog antioksidativnog sustava da ih neutralizira. Reaktivne kisikove čestice prvenstveno nastaju u mitohondrijima tijekom sinteze ATP-a, odnosno nastaju pri normalnim uvjetima aerobnog metabolizma svih stanica organizma, te imaju ključnu ulogu u signalnim putovima i imunološkom sustavu, dok je povećanje njihove proizvodnje povezano s bolestima i staničnim starenjem, pa se tako nakupljanje ovih čestica u stanicama eukariota smatra jednim od primarnih biokemijskih obilježja apoptoze (Zurgil i sur. 2004). Wang i sur. (2014) su zabilježili da je dvosatni tretman farnesolom uzrokovao apoptozu stanica patogene gljivice *Aspergillus flavus* kao posljedicu nakupljanja reaktivnih kisikovih čestica u stanicama. Pa se tako i razina stvaranja ovih čestica u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tretiranim farnesolom povećala pet do osam puta nakon 30 minuta inkubacije, dok stanice tretirane drugim terpenima, poput geraniola, geranilgeraniola i skvalena, nisu pokazale nikakav odgovor (Machida i sur., 1998). Svojim istraživanjem Lin i sur. (2013) su dokazali da prirodni spoj iz đumbira *Alpinia oxyphylla* jakukinon A ima nematocidni učinak na oblića *Anisakis simplex* pri čemu dolazi do povećanja razine reaktivnih kisikovih čestica u stanicama.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Infestacija ličinkama iz porodice Anisakidae

U literaturi se može naći termin *anisakidoza* koji definira ljudsku infestaciju ličinkama iz obitelji Anisakidae, nametničkim oblicima koji pripadaju koljenu Nematoda, razredu Chromadorea, redu Rhabditida, te podredu Ascaridomorpha (World Register of Marine Species, WoRMS, www.marinespecies.org). Oblicima iz obitelji Anisakidae pripada barem devet (prema WoRMS-u, stranici pristupljeno 18.7.2020. rodova, dok se prema Arcos i sur. (2014) taj broj penje na 24 roda. Od njih, *Anisakis*, *Pseudoterranova* i rjeđe *Contracaecum* su tri roda koji uzrokuju anisakidozu u čovjeka (Audicana i Kennedy, 2008) iako su to primarno endoparaziti morskih sisavaca. Među njima najčešće vrste su *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809, *Anisakis pegreffii* Campana-Rouget & Biocca, 1955 i *Pseudoterranova decipiens* Krabbe, 1878 koje su prepoznate kao odgovorne za teške infestacije probavnog trakta čovjeka (EFSA, 2010; Pravettoni i sur., 2012), te manje česte vrste *Contracaecum osculatum* Rudolphi 1802 i *Anisakis physeteris* Baylis, 1923 (Buchman i Mehrdana, 2016).

Na osnovu Van Thielovog naziva anisakijaza iz 1962. (Van Thiel, 1962), Kassai i suradnici su 1988. uveli različite neslužbene termine u svrhu razlikovanja bolesti prema uzročniku. Pa je tako bolest anisakidoza ona čiji uzročnik pripada obitelji Anisakidae, pseudoteranovoza je uzrokovana rodom *Pseudoterranova*, dok se izraz anisakijaza koristi samo za infestacije ličinkama iz roda *Anisakis*. Poput anisakidoze i anisakijaza je zoonotska bolest koja se na čovjeka prenosi hranom iz mora, ali je uzrokovana slučajnim gutanjem ličinki trećeg razvojnog stadija (L3) vrsta koje pripadaju isključivo rodu *Anisakis* Dujardin, 1845, koje se najčešće nalaze začahurene u jestivim tkivima zaražene sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe (Deardorff i sur., 1991).

2.1.1. Klasifikacija roda *Anisakis*

Dok Davey u svom radu iz 1971. govori o taksonomskim karakteristikama razlikovanja (do) 21 vrste unutar roda *Anisakis* Dujardin 1845, prema Mattiucci i sur. (2018) ovaj rod uključuje najmanje devet vrsta: *A. simplex* sensu stricto, *A. berlandi*, *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata*, *A. paggiae* i *A. nascettii* te na temelju njihovih L3 genotipova najmanje još dvije do sada neopisane vrste *Anisakis* sp. 1 i *Anisakis* sp. 2. Smatra

se da nametnički kompleks skupnog naziva *Anisakis simplex* sensu lato (s.l.) čine reproduktivno izolirane, molekularno različite srodne vrste, zvane „sestrinske vrste“ koje dijele zajedničke morfološke karakteristike. Njega sačinjavaju vrste *Anisakis simplex* sensu stricto (*A. simplex* s.s.), *A. pegreffii* (sinonim *A. simplex* A) i *A. berlandi* (sinonim *A. simplex* C) kao glavni uzročnici anisakijaze u svijetu (Mattiucci i sur., 2009, 2014. i 2019; Bello i sur., 2020). U ribljim vrstama iz Sredozemnog mora se rijetko može naći *A. simplex* sensu stricto (s. s.), jer je to najviše zastupljena vrsta ovog roda na području Sjevernog Atlantika, osim u iznimkama i to vjerojatno zbog migracije svojih domaćina (Mattiucci i sur., 2014). Dok je vrsta *A. pegreffii* (Slika 1.), član porodice Anisakidae (Tablica 1.), dominantna vrsta na području Mediteranskog mora, koja je također široko rasprostranjena u vodama Japanskog i Kineskog mora, te morskog područja oko Australije (Gomes i sur., 2021).

Tablica 1. Klasifikacija oblića vrste *Anisakis pegreffii* Campana-Rouget & Biocca, 1955 iz obitelji Anisakide (prema WoRMS; www.marinespecies.org).

Phylum (koljeno)	Nematoda
Class (razred)	Chromadorea
Order (red)	Rhabditida
Infraorder (podred)	Ascaridomorpha
Family (obitelj)	Anisakidae
Genus (rod)	<i>Anisakis</i>
Species (vrsta)	<i>Anisakis pegreffii</i>

Temeljeno na dostupnoj literaturi, Buchman i Mehrdana (2016) su sastavili zemljopisnu raspodjelu rodova *Anisakis*, *Pseudoterranova* i *Contracaecum* koji uzrokuju anisakidozu, te su naveli da je rod *Contracaecum* potvrđeni uzročnik anisakidoze u Australiji, Njemačkoj i Japanu; rod *Pseudoterranova* u Čileu, Islandu Japanu, Koreji i SAD-a; a rod *Anisakis* u Kanadi, Hrvatskoj, Danskoj, Francuskoj, Njemačkoj, Nizozemskoj, Italiji, Japanu, Koreji, Norveškoj, Španjolskoj, Južnoj Africi, Tajvanu i SAD-a. U Hrvatskoj, Blažeković i sur. su u svojoj studiji iz 2015. godine zabilježili da je rasprostranjenost *Anisakis* spp. nametnika u domaćem dupinu,

kao krajnjem domaćinu, niža od one u vrstama koje povremeno uđu u Jadransko more, te također u mladih u usporedbi sa odraslim jedinkama. Ovi autori su filogenetičkom analizom otkrili da su uz najzastupljeniji *Anisakis pegreffii* (96.73 %), u Jadranu prisutni i *Anisakis simplex* s. s. (1.96 %) i *Anisakis physeteris* (1.31 %).



Slika 1. Infektivne ličinke trećeg stadija (L3) oblića *Anisakis pegreffii* izolirane iz infestiranih unutrašnjih organa šaruna *Trachurus trachurus* i nanijete u jažice s autoklaviranom morskom vodom.

2.1.2. Pojavnost infestacije ličinkama roda *Anisakis* u svijetu

Iako je pojava infestacije ličinkama iz obitelji Anisakidae opisana još preko osamdeset godina ranije (Leuckart, 1876., iz Aibinu i sur., 2019) nego što su evidentirani i objavljeni slučajevi u Nizozemskoj 1950.-ih godina (Van Thiel i sur., 1960), tek je s tim objavama porasla svijest o ozbiljnosti ovog tipa infestacije što je rezultiralo i porastom učestalosti njenog prijavljivanja, a shvaćanjem opasnosti konzumiranja sirove ribe je počelo i njeno detaljnije proučavanje (Audicana i sur., 2002; Nieuwenhuizen i Lopata, 2013). Sve veći broj evidentiranih slučajeva anisakijaze (Hochberg i Hamer, 2010) je vjerojatno povezan sa sve većom potrošnjom morskih proizvoda porijeklom iz različitih dijelova svijeta, vraćanjem tradicionalnim, ali i egzotičnim načinima njihovog pripremanja, globaliziranim kuhinjom, bržim praksama kuhanja, trendom izbjegavanja prekuhane hrane radi očuvanja vitamina i općenito većim konzumiranjem ribe iz zdravstvenih razloga, razvojem alata za dijagnostiku, većom svijesti o ovoj vrsti bolesti pa time i povećanjem znanja o anisakijazi, ali, zanimljivo je napomenuti, i

povećanjem populacije morskih sisavaca krajnjih domaćina ovih nametnika zbog sve češće njihove zaštite (Gutiérrez-Galindo, 2010; Mehrdana i sur., 2014; Buchmann i Mehrdana, 2016; Horbowy i sur., 2016).

Anisakijaza je zabilježena u brojnim zemljama svih kontinenata (osim Antarktike), a podaci koje je predstavio Orphanet (2016) procjenjuju svjetsku incidenciju od 0.32/100 000. U Japanu se godišnje zabilježi i do tri tisuće slučajeva ove infestacije (Yorimitsu i sur., 2013) što je najviša svjetska prevalencija od preko 90 % (Baird i sur., 2014) i to najviše zbog konzumiranja nacionalnog jela sushija i sashimija (Audicana i Kennedy, 2008), zatim slijede Španjolska (Herrador i sur., 2018), pa Italija (Mattiucci i sur., 2018; Cipriani i sur., 2018). Nešto manje slučajeva bilježe Njemačka (Audicana i Kennedy, 2008) i skandinavske zemlje (Levsen, 2010), te ostale zemlje koje imaju kulinarsku tradiciju konzumiranja sirove, soljene, marinirane, dimljene ili sušene ribe (*boquerones en vinagre* – ukiseljeni inćuni, *ceviche* – marinirana riba, *carpaccio* od tune, *lomi-lomi* – salata od sirovog lososa, *maatjes* – usoljena haringa, dimljena haringa, *gravlax* – sušeni losos, itd. (Pravettoni i sur., 2010; Yorimitsu i sur., 2013; Bao i sur., 2017).

2.1.3. Pojavnost infestacije ličinkama roda *Anisakis* u Hrvatskoj

Iako duž obale hrvatskog Jadrana ljudi tradicionalno konzumiraju polusirovu, ukiseljenu, usoljenu i mariniranu srdelu *Sardina pilchardus* i inćune *Engraulis encrasicolus* (Cipriani i sur., 2018), Mladineo i sur. (2016) su zabilježili prvi slučaj anisakijaze u Hrvatskoj 2016. godine potvrđen iz arhivskih histoloških preparata iz 2003. Do tada još u Hrvatskoj nije bio zabilježen slučaj u kojem je nađena ličinka kao uzročnik zdravstvenih tegoba iako je postojala sumnja na ovu bolest na temelju studije seroprevalencije anti-anisakis IgE u kojoj su Mladineo i sur. (2014) pokazali da je senzibilizacija u sveukupno testiranoj populaciji 2 %, dok je u otočnim stanovništvu bila čak 3,5 %. Ovaj dokaz da je populacija u prošlosti bila u kontaktu s živom ličinkom i činjenica da je zabilježena prisutnost *Anisakis* ličinki u velikom broju ekonomski važnih vrsta riba (Mattiucci i sur., 2004; Mladineo i sur., 2012; Mladineo i Poljak, 2014) koje se na Sredozemnom području konzumiraju kao termički nedovoljno obrađene ukazuju na to da je u Hrvatskoj, kao i u zemljama Mediterana mali broj prijavljenih slučajeva anisakijaze, zapravo podcijenjen broj. Ovoj tvrdnji ide u prilog mogućnost pogrešnog dijagnosticiranja bolesti, jer simptomi anisakijaze se mogu pogrešno dijagnosticirati kao neke druge mnogo češće bolesti probavnog trakta.

2.1.4. Infestacije ličinkama roda *Anisakis* u komercijalnim vrstama ribe

Arcos i sur. (2014) smatraju da su ove ličinke prisutne u većini komercijalnih vrsta morskih riba. Primjerice, u Španjolskoj je njihova prevalencija od 25 do visokih 80 %. Najčešće vrste riba koje prenose *Anisakis* nametnike u Japanu su pacifički losos *Oncorhynchus keta* i aljaška kolja *Gadus chalcogrammus* koje su pokazale najviše stope prevalencije od 100 %, zatim australijska skuša *Scomber australasicus* 97,5 % i pacifički bakalar *Gadus macrocephalus* 80 % (Gomes i sur., 2021). U Sjedinjenim Američkim Državama je to pacifički losos *Oncorhynchus* spp., u većini europskih zemalja je atlantska haringa *Clupea harengus*, a u Španjolskoj su to incun *E. encrasicolus* (Rodríguez i sur., 2018) i srdela *S. pilchardus* (Alonso-Gomez i sur., 2004; Audicana i sur., 2002).

Ramilo i sur. (2023) navode europskog oslića *Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758 kao jednu od komercijalno najvažnijih vrsta u ribolovnom području sjeverozapadne Europe, koja se uvelike iskorištava u industrijskom ribarstvu za europsko tržište. Istodobno, europski oslić je na vrhu popisa najizloženijih vrsta riba nametnicima roda *Anisakis* (Diez i sur., 2022), što rezultira odbijanjem infestiranih ribljih proizvoda od strane službenih inspektora i dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka (Pascual i sur., 2018).

Komercijalne vrste iz Jadranskog mora (Mladineo i Poljak, 2014) su pokazale visoku prevalenciju nametnika *Anisakis pegreffii* (95,95 %; *A. simplex* s.s. 4,05 %): lokarda (100 %), incun (81,7 %), oslić (70,8 %), pišmolj (65,8 %), tunj (23,3 %) i srdela (3,3 %). Dok je studija populacijske dinamike nametnika *A. pegreffii* na 4.600 jadranskih incuna pokazala prevalenciju 76,1 %, uz prisutne sezonske oscilacije 20 – 100 % (Mladineo i sur., 2012).

2.1.5. Dijagnosticiranje infestacije *Anisakis* ličinkom

Jedna od najčešćih metoda postavljanja individualne dijagnoze je izravna vizualna potvrda na prisustvo jajašaca ili odraslih jedinki nametnika, na temelju čega se pristupa individualnom tretmanu do potpune eliminacije nametnika iz organizma. Takva praksa se provodi u većini razvijenih zemalja, dok se u trećim zemljama problemu crijevnih nametnika pristupa na osnovi iskustva o visokoj prevalenciji infestacije na tom području, a liječenje se često provodi primjenom antihelminatika širokog spektra koja ne zahtijeva dijagnozu temeljenu na identifikaciji same vrste uzročnika (Knopp i sur., 2012). Tako se provode masovni tretmani ljudi i životinja ovim lijekovima bez prethodno postavljene dijagnoze, temeljeni na pojavi samo nekih od simptoma (Molyneux i sur., 2004), često s jednokratnim tretiranjem svakih nekoliko

mjeseci nedovoljnom dozom lijeka i s mogućnošću nabave lijeka bez recepta, što kao posljedicu najčešće ima samo smanjeni broj nametnika u populaciji, a ne potpunu eliminaciju. Neselektivna i masovna upotreba lijekova je rezultirala populacijama nametnika koje su selektivno otporne na različite farmakološke skupine (Wolstenholme, 2004; Shalaby, 2013). Zbog pogrešne upotrebe antihelmintika za suzbijanje infestacija kod životinja i zbog genetskih predispozicija nametnika (Köhler, 2001) koje su dovele do sve učestalije pojave otpornosti u svijetu, na raspolaganju je sve manji broj kemoterapeutika.

Do 2010. je u svijetu evidentirano preko 20.000 slučajeva anisakijaze (EFSA, 2010). Mladineo i sur. (2016) smatraju da je anisakijaza u mnogim zemljama, a pogotovo zemljama Sredozemlja zbog tradicionalnih načina pripremanja ribe i količine konzumiranja, još uvijek neprepoznata. Često je ova bolest pogrešnog dijagnosticirana, jer su simptomi slični onima drugih bolesti probavnog trakta. Simptomi akutne želučane anisakijaze su jaki trbušni bolovi, mučnina i povraćanje, dok simptomi kronične želučane anisakijaze često nalikuju onima kod ulkusa želuca i dvanaesnika, kroničnom gastritisu ili čak karcinomu želuca, dok su simptomi crijevne anisakijaze s bolovima u donjem dijelu abdomena slični onima upale slijepog crijeva, potrbušnice, žučnog mjehura ili Crohnove bolesti (Villazanakretzer i sur., 2016; Mazzucco, 2018) što komplicira postavljanje dijagnoze. I autori Shamsi i Sheorey (2018) upozoravaju na mali broj prijavljenih slučajeva kao rezultat pogrešnog dijagnosticiranja, odnosno podcjenjivanja pojave anisakijaze u Australiji zbog nespecifičnih ili potpunog izostanka simptoma kod oboljelih ljudi.

U ljudi koji jedu sirovu ili nedovoljno termički obrađenu ribu postoji mogućnost infestacije ličinkom u njenom trećem stupnju razvojnog ciklusa (L3) oblića iz roda *Anisakis*, koja se nalazi začahurena u utrobi i ribljem mišiću mnogih riba koštunjača (haringe, oslića, skuše, bakalara, itd.). Nakon ugibanja ribe, ličinka migrira iz trbušne šupljine u mišić, gdje se teško može uočiti običnim vizualnim pregledom (Valls i sur., 2005; Audicana i Kennedy, 2008). Iako ovi nametnici ne mogu dovršiti svoj životni ciklus u njemu, čovjek može biti njihov slučajni domaćin, a smatra se da je više od 90 % slučajeva anisakijaze rezultat infestacije samo jednom L3 ličinkom (Daschner i sur., 2000; Guardone i sur., 2018).

Anisakijaza može imati gastrointestinalni i alergijski oblik bolesti. Dodatno, kod gastrointestinalnog oblika razlikujemo neinvazivnu i invazivnu infestaciju ovim nametnikom. Simptomi neinvazivne infestacije su trnci ili škakljanje u grlu povezano s migracijom oblića u ždrijelo nakon gutanja. S obzirom da je čovjek slučajni domaćin ovoj ličinki, ona tu ne može dugo preživjeti i u najvećem broju slučajeva ubrzo biva spontano izbačena kašljem ili

povraćanjem. Obično unutar nekoliko sati od ulaska nametnika u probavni trakt čovjeka, ličinka se pričvrsti na ili probija mukozni sloj stijenke želuca i crijeva uzrokujući oštećenje tkiva koje dovodi do invazivne akutne infestacije – anisakijaze (Broglia i Kapel, 2011). Audicana i Kennedy (2008) smatraju da unosom ovog nametnika u ljudski organizam on dospijeva na različite organe gdje lučenjem proteolitičkih enzima može uzrokovati infestaciju; pa tako razlikujemo želučanu, crijevnu i ektopičnu (infestaciju pluća, limfnih čvorova, jajnika, gušterače, slezene i potrbušnice) anisakijazu. Ova nametnička infestacija probavnog trakta u čovjeka može, ali i ne mora, biti povezana s imunološkim, odnosno alergijskim reakcijama (Valls i sur., 2005; Audicana i Kennedy, 2008) poput urtikarije, koja se obično javlja nekoliko sati nakon ulaska nametnika u organizam (Takabayashi i sur., 2014).

Klinički simptomi invazivne anisakijaze variraju od iritacije jednjaka i želuca, preko mučnine, povraćanja i proljeva do jakih trbušnih bolova i opstrukcije crijeva i pojavljuju se najčešće nakon nekoliko sati, odnosno unutar 24 h nakon konzumacije infestiranog ribljeg mesa. U slučaju da ličinka prodre dublje u tanko ili debelo crijevo, nakon 1 – 2 tjedna to može dovesti do stvaranja eozinofilnih granuloma i prijeći u kronične simptome (Audicana i Kennedy, 2008). Pogođena mjesta podliježu eroziji, ulceraciji, oticanju, upali i stvaranju granuloma oko nametničke ličinke (Pampiglione i sur., 2002; Moschella i sur., 2004).

Istovremeno s infestacijom ovaj nametnik može aktivirati i odgovor imunološkog sustava te izazvati alergiju kod osjetljivih osoba, pa se razvijanje simptoma s istovremenim kliničkim pojavama infestacije i alergije naziva 'gastroalergijska anisakijaza' (engl. *gastroallergic anisakiasis*, GAA; Daschner i sur., 2000; Mattiucci i sur., 2013). Općenito se smatra da je potrebna živa ličinka da potakne alergijsku reakciju u čovjeka (Pravettoni i sur., 2012), iako često senzibilizirani pojedinci na *Anisakis* spp. pokazuju simptome poput urtikarije (koprivnjače), eritema (crvenila), angioedema (otoka ispod kože), bronhospazma (suženja dišnih puteva), pa čak i anafilakse (teške reakcije cijelog tijela) i nakon konzumiranja adekvatno termički obrađenog ribljeg mesa (Audicana i sur., 2002; Moneo i sur., 2005; Daschner i sur., 2012). Naime, postoje studije kojima je dokazano da su određeni proteini ovih vrsta oblića otporni na enzim pepsin i visoke temperature, što znači da ostaju aktivni i nakon termičke obrade (Caballero i sur., 2004; Moneo i sur., 2005; Kobayashi i sur., 2007). Također, postoje primjeri alergije uzrokovane vrlo malim dozama *A. simplex* antigena bez prisustva živog nametnika, samo primjenjujući njegov ekstrakt pri testiranju na koži (Montalto i sur., 2005). Stoga i konzumiranje mrtvog nametnika ili njegovih ostataka u kontaminiranim ribarskim proizvodima može uzrokovati alergijske simptome (Barbuzza i sur., 2009). Nadalje, alergijska

reakcija može biti izazvana i konzumacijom proizvoda u kojima su preneseni proteini *A. simplex* kroz prehrambeni lanac (Armentia i sur., 2006), te profesionalnim izlaganjem aerosolu s alergenom kod radnika u ribarskoj industriji, ribara, kuhara i sl. (Nieuwenhuizen i sur., 2006; Nieuwenhuizen i Lopata, 2013).

2.1.6. Prevencija infestacije *Anisakis* ličinkom

Prehranom nedovoljno kuhanom ili nedovoljno smrznutom ribom dolazi do unosa živog nametnika u ljudski organizam. Ovi oblici su vrlo otporni na uvjete stvorene tradicionalnim pripremanjem hrane (soljenje, mariniranje, sušenje), te ovisno o koncentraciji octene kiseline, soli, vremenu izloženosti, i sl. su u stanju preživjeti i do nekoliko tjedana (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005; Anastasio i sur., 2016). Europska uprava za sigurnost hrane (EFSA, 2010) je zaključila da ličinke *A. simplex* imaju značajan alergijski potencijal, te naglašavaju potrebu za rutinskim testiranjem ribarskih proizvoda. Preporuča se odstranjivanje glave i utrobe, te zamrzavanje ribe i glavonožaca neposredno nakon ulova na ribarskim brodicama, a prevencija anisakijaze u domaćinstvu i ugostiteljstvu se može postići pažljivim pregledom ribljih fileta i uklanjanjem uočenih ličinki (Garcia i sur., 2012; Nieuwenhuizen i Lopata, 2014). EFSA (2010) naglašava važnost termičke obrade ribe i drugih morskih organizama s ciljem sprječavanja infestacije, te preporuča kuhanje tako da središnji dio proizvoda ribarstva bude na temperaturama višim od 60 °C najmanje 1 min, dok riba namijenjena za soljenje, dimljenje i mariniranje bi trebala biti zamrznuta na temperaturi od -15 °C najmanje 96 sati, od -20 °C najmanje 24 sata ili od -35 °C najmanje 15 sati. Ove preventivne mjere je usvojila riboprerađivačka industrija kroz zakonodavstvo Europske Unije (Odluka 93/140/EEZ i Direktiva Vijeća 91/493/EEZ) i uvođenje HACCP (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Points*) sustava analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (Codex alimentarius commission, 2004).

2.2. Biologija roda *Anisakis*

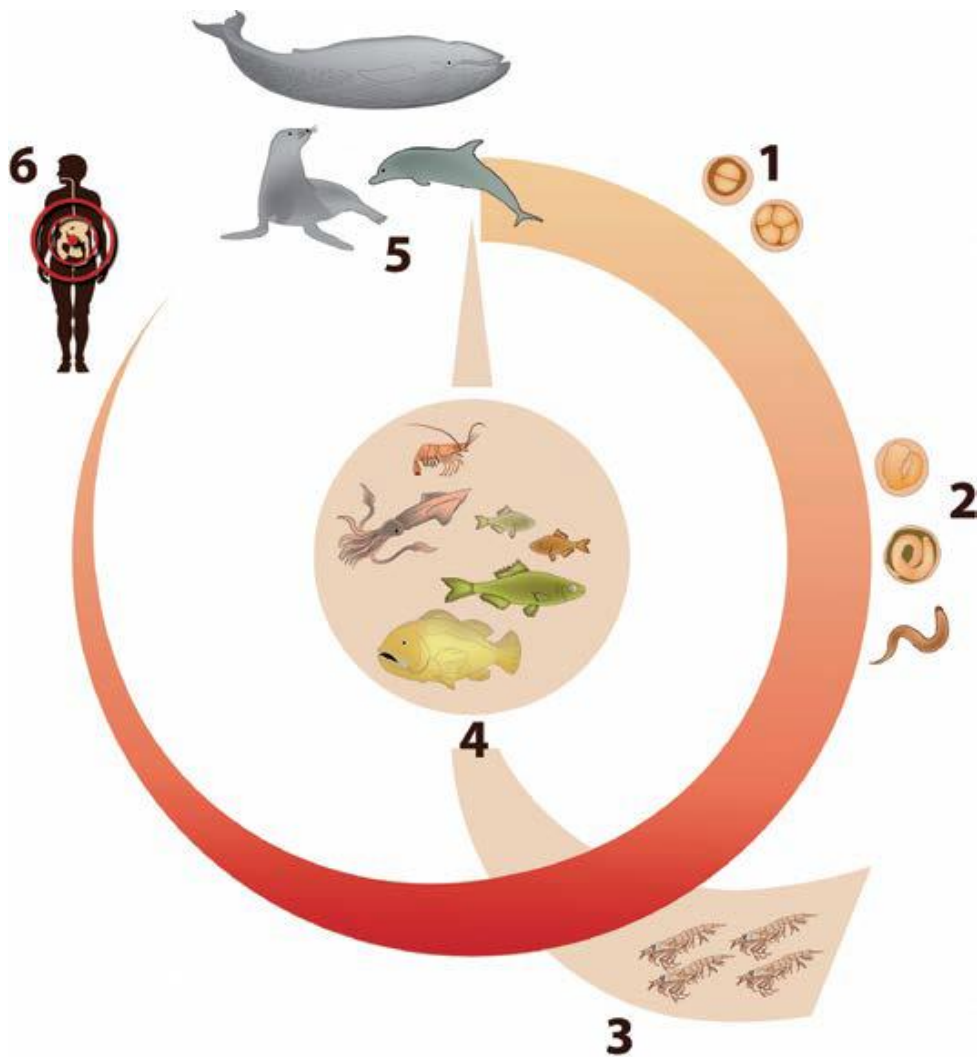
2.2.1. Morfologija roda *Anisakis*

Morfološki pregled ličinke može dati okvirne smjernice o nametničkoj vrsti. Unutar porodice, nametnike možemo generalno prepoznati po karakterističnoj boji tijela, *A. simplex* ličinke se bjelkasto-prozirne, *P. decipiens* su crvenkasto-smeđe i *C. osculatum* ličinke djeluju prozirno do sivkasto-smeđe boje. Vrste roda *Anisakis* su slobodnoživući, nesegmentirani, cilindrični crvi, čija jedinka može doseći 20 mm duljine. Tijelo je bilateralno simetrične građe s elementima radijalne simetrije, na poprečnom presjeku okruglo. Na prednjem dijelu tijela su usta, a ženke na trbušnoj strani imaju ekskrecijski, analni i spolni otvor, a mužjaci samo ekskrecijski otvor i kloaku u koju se otvara crijevo i spolni sustav koji završava kopulatornim organom. Određivanje vrste temelji se na kaudalnoj anatomiji i anatomiji prednjeg dijela probavnog trakta, položaju ekskretorne pore i prisutnosti ili odsutnosti mukrona, apikalnog zuba i usana (Martin-Carrillo i sur., 2022), odnosno na određivanju prisutnosti/odsutnosti mukrona, veličine i položaja probavnog trakta. Ali, pouzdano određivanje vrste mora se temeljiti na molekularnim tehnikama (Mattiucci i sur., 2014; Liu i sur., 2015).

2.2.2. Životni ciklus roda *Anisakis*

Jedinke anisakidnih vrsta imaju složen životni ciklus koji uključuje nekoliko domaćina. Dok se ličinke *Anisakis* vrsta razmnožavaju u želudcu i crijevima morskih sisavaca (dupina, kitova, tuljana) koji su njihovi glavni/konačni domaćini (engl. *final host*), *P. decipiens* i *C. osculatum* jedino u tuljanima mogu proći svoje krajnje razvojne faze i doseći spolnu zrelost (Lunneryd i sur., 2015). Nakon kopulacije, odrasle ženke *A. simplex* vrste proizvode oplodena jaja koja se zajedno s fecesom domaćina izbacuju u morski okoliš (Slika 2.). U morskoj vodi se u jajima formira embrij, odnosno ličinka prvog razvojnog stadija (L1). Kad ličinke izađu iz jaja, one su u svom drugom razvojnem ciklusu (L2; Baird i sur., 2014; Buchmann i Mehrdana, 2016), te ih kao takve najčešće progutaju planktonski (kopepodni, dekapodni, izopodni, amfipodni i eufauzidni (kril) račići i mekušci koji su im prvi prijelazni domaćini (engl. *first intermediate hosts*) u kojima one presvlačenjem sazrijevaju u ličinke trećeg razvojnog stadija (L3; Baird i sur., 2014) koje se duž hranidbene mreže prenose u druge prijelazne (engl. *second intermediate hosts*) ili paratenične domaćine (engl. *paratenic hosts*) kao što su morske ribe i glavonošci u kojima ne dolazi do daljnjeg sazrijevanja ličinke, odnosno u kojima se razvoj

ličinke zaustavlja (Mattiucci i sur., 2018). Kada račiće, ribe ili glavonošce infestirane L3 *Anisakis* spp. ličinkama nakon toga pojede morski sisavac kao krajnji domaćin, ličinke se u njegovoj utrobi dva puta presvlače i time razvijaju od L3 u odrasle L4, odnosno, u L5 spolno zrele jedinice. Time je zaokružen njihov životni ciklus, odnosno novi započinje izbacivanjem jaja (Aibinu i sur., 2019).



Slika 2. Životni ciklus vrsta iz rodova *Anisakis* i *Pseudoterranova* koje uzrokuju anisakidozu u čovjeka (preuzeto i prevedeno iz Pozio, 2013): 1. Jaja nametnika bivaju izbačena zajedno s fecesom iz organizma sisavaca koji su njihovi konačni domaćini; 2. U jaju se razvija embrij iz ličinačkog stadija L1 u L2, potom u L3, zatim se ličinka oslobađa iz jaja i postaje slobodnoplivajuća u vodenom stupcu; 3. Račići, najčešće eufauzidni i kopepodni (prijelazni domaćini), se hrane ličinkama sva tri stadija, koji se u njima ne mogu razviti dalje od L3 stadija;

4. Zatim račiće zajedno s L3 ličinkama progutaju ribe, rakovi i glavonošci, koji su njihovi paratenični domaćini jer je u njima razvoj ličinki u sljedeći stadij zaustavljen; 5. Kada morski sisavac pojede ribu, raka ili glavonošca, tada u njegovoj utrobi slijede dva presvlačenja ličinki nakon kojih se one iz L3 razvijaju u L4, a zatim iz tog u adultni stadij kojeg neki autori nazivaju L5; 6. Kada čovjek kao njihov slučajni domaćin pojede inficiranu ribu, raka ili glavonošca, javlja se rizik od razvijanja infestacije ili alergijske reakcije na ove ličinke.

Kada ribu, u čijoj se trbušnoj šupljini nalaze ličinke L3 prihvaćene za unutrašnje organe, pojedu grabežljive ribe ili glavonošci, tada se također događa migracija iz probavnih organa prethodnog u one novog domaćina, što može dovesti i do njihovog nakupljanja u novom domaćinu, posebno ako dolazi do ponavljanja ovog procesa (Zuo i sur., 2016). Također, čovjek može unijeti u organizam infektivnu L3 ličinku konzumirajući nedovoljno termički obrađenu inficiranu ribu ili glavonošce, pri čemu on predstavlja slučajnog domaćina (engl. *accidental host*) ovih nametnika (Mattiucci i sur., 2017). One unutar čovjeka ne mogu nastaviti svoj razvoj u sljedeći stadij, niti mogu završiti svoj ciklus, ali mogu prodrijeti u unutrašnje organe i izazvati anisakidozu (Audicana i Kennedy, 2008; Mattiucci i sur., 2017).

2.3. Kontrola infestacija oblicima primjenom antihelmintika

Zoonoze su masovna svjetska pojava; više od 1,5 milijarde ljudi (24 % svjetske populacije) imaju jednu (parazitizam) ili nekoliko vrsta (poliparazitizam) nametnika u svom tijelu (Hotez i sur., 2008; WHO, 2019). Iako pojavnost nametničkih zoonoza sve više raste, one još uvijek ostaju podcijenjene (Guardone i sur., 2018) jer njihovo izvještavanje nadležnoj instituciji nije obavezno, te službena izvješća ne pokazuju stvarnu učestalost ove bolesti (FAO/WHO, 2014). Pojačane sanitarne mjere i nadzor prijenosnika bi dugoročno mogli smanjiti pojavnost nematodnih zoonoza, ali trenutna praksa se temelji najviše na terapiji lijekovima (kemoterapiji; Knopp i sur., 2012; Molyneux, 2004). Kemoterapija ima tri cilja: prevenciju (profilaksu), smanjenje ili izlječenje, te sprječavanje daljnjeg širenja infestacije (Geary, 2016).

U dijagnostici i liječenju nametnika iz obitelji *Anisakidae* u ljudi najčešće se upotrebljava endoskopska metoda mehaničke ekstrakcije žive ličinke iz želudca ili crijeva

čovjeka oboljelog od akutne anisakijaze (Takabayashi, 2014; Pravettoni i sur., 2012), dok se rjeđe, kod kroničnih slučajeva ili kad su endoskopski nepristupačne, ličinke odstranjuju kirurškim putem (Repiso i sur., 2003; Hochberg i Hamer, 2010). Kod lakših oblika bolesti i manje ozbiljnih simptoma znaju se primjenjivati farmakološki tretmani antibioticima, antikolinergicima i kortikosteroidima (Moore i sur., 2002), ali njihova je učinkovitost ograničena i nije sasvim razjašnjena (Ramos i sur., 2005), dok antihelmintici, iako prvenstveno razvijeni za potrebe veterinarske medicine, sve veću upotrebu imaju za liječenje ljudskih parazitoza (Abongwa i sur., 2017). Antihelmintici moraju biti selektivno toksični, što podrazumijeva toksično djelovanje na nametnika bez značajnijeg štetnog djelovanja na organizam domaćina. Selektivna toksičnost antinematodnih lijekova se temelji na razlikama u fiziologiji domaćina i nametnika zbog njihove filogenetske udaljenosti, inhibiciji karakterističnih metaboličkih procesa nametnika ili farmakokinetičkim osobinama lijeka zbog kojih su nametnici izloženi višim koncentracijama nego njihovi domaćini. U ekonomijom vođenoj praksi je isplativost lijeka osnovni kriterij, što podrazumijeva i širok spektar djelovanja. Zatim slijedi pitanje razine toksičnosti za domaćina (uzgojenu životinju i čovjeka) koja se može tolerirati, koliko je zadržavanje lijeka u tkivu domaćina, odnosno koja je brzina izlučivanja iz životinjskog organizma namijenjenog za prehranu ljudi, te koliko je toksičan za okoliš i neciljane organizme (Holden-Dye i Walker, 2014).

2.3.1. Podjela sintetičkih antihelmintika i osnovni mehanizmi djelovanja

U literaturi se može naći više podjela antihelmintika s obzirom na njihovu kemijsku strukturu i način djelovanja na nametnike. U Tablici 2. je prikazana podjela prema Nixon i sur. (2020) u kojoj su navedene skupine ovih lijekova razvijenih prije 2000. i onih poslije te godine. U tretiranju životinjskih helmintijaza se u svijetu najčešće koriste terapeutici iz skupina makrocikličkih laktona (ivermektin, doramektin, eprinomektin, moksidektin, milbemicin oksim), benzimidazola (albendazol i mebendazol), imidazotiazola (levamisol, tetramizol), te tetrahidropirimidini. Iako se čini da je na tržištu veliki broj terapeutika koji djeluju na nametničke oblice, ako oduzmemo one na koje se javila rezistencija, broj preostalih antihelmintika za tretiranje životinja se jako smanjuje. A ako od tog broja izdvojimo one koji su toksični i koji nisu odobreni za ljudsku upotrebu ostaje nam jako malen broj dostupnih terapeutika, pod uvjetom da se i na njih ne razvije rezistencija.

U Tablici 2. su popisani antihelmintici korišteni za liječenje crijevnih infestacija oblicima kod ljudi i životinja, dok je lista lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2017) za tretiranje crijevnih nametnika kraća, te uključuje: pirantel (tetrahidropirimidini), levamisol (imidazotiazoli), ivermektin (makrociklički laktoni), niklozamid (salicilanilidi), prazikvantel (pirazinoizokinoloni), zatim albendazol i mebendazol (benzimidazoli). Antihelmintici mogu dvojako djelovati: nematocidno, tako da ubijaju oblice, i nematostatski, da paraliziraju nametnika koji peristaltikom crijeva biva izbačen iz organizma.

Benzimidazoli su najstarija skupina antihelmintika, s tiabendazolom koji se počeo primjenjivati na ljudima i životinjama kasnih 1950.-ih. To je prvi antihelmintik koji je kombinirao učinkovitu nematocidnu aktivnost širokog spektra djelovanja s niskom toksičnošću. Temeljem njegove modifikacije su se razvili i drugi lijekovi ove skupine: fenbendazol, flubendazol, kambendazol, luksbendazol, oksfendazol, oksibendazol, parbendazol, albendazol, mebendazol i dr. Pirantel je prvi antihelmintik iz skupine tetrahidropirimidina (pirantel, morantel, oksantel) koji se počeo koristiti 1966. godine. Godine 1966. se počeo koristiti tetramisol koji pripada skupini imidazotiazola, a kojeg je kasnije naslijedio njegov l-izomer, danas poznat kao levamisol. Imidazotiazoli (levamisol, tetramisol), aminoacetoni (monepantel), aminofenilamidini (tribendimin) i tetrahidropirimidini (pirantel, oksantel, morantel) su skupine antihelmintika koji djeluju kao ligandi nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR) oblića. Lijekovi iz ovih skupina u tijelu oblića preuzimaju ulogu neurotransmitera acetilkolina (agonist) i vežu se na nAChR mišićnih stanica, te izazivaju paralizu ciljanog organizma. Makrociklički laktoni (ili makrolidi) obuhvaćaju skupine avermektina (ivermektin, abamektin) i milbemicina (moksidektin) koji nastaju fermentacijskom aktivnošću bakterija aktinomiceta *Streptomyces avermitilis* i *Streptomyces hygroscopicus*. Oni su agonisti glutamatom reguliranih kloridnih kanala i GABA receptora (pojačavaju lučenje GABA (γ -aminomaslačna kiselina) inhibitornog neurotransmitera i vezanje na GABA receptore) i zaustavljaju prijenos živčanih impulsa u tijelu nametnika, što za posljedicu ima paralizu i uginuće. Piperazin pripada skupini heterocikličkih spojeva koji je u upotrebu ušao prije više od stotinu i dvadeset godina kao lijek za giht, da bi se 1953. g. počeo koristiti kao antihelmintik čiji derivati pokazuju odličnu nematocidnu učinkovitost i visoku sigurnost primjene. Piperazin je agonist GABA receptora; selektivno se veže izravno na GABA receptor na membrani mišićne stanice i izaziva hiperpolarizaciju živčanih završetaka što rezultira paralizom nametnika, te je tako omogućeno njegovo izbacivanje iz tijela domaćina.

Tablica 2. Podjela antihelmintika za tretiranje oblića, metilja i trakavica razvijenih prije i poslije 2000. g. (preuzeto i prevedeno na hrvatski jezik iz Nixon i sur., 2020).

	Nametnici Skupina lijeka:	Oblići <i>(Nematoda)</i>	Metilji <i>(Trematoda)</i>	Trakavice <i>(Cestoda)</i>	
<i>Razvijeni prije 2000. g.</i>	Benzimidazoli	Albendazol Febantel Fenbendazol Flubendazol Mebendazol Oksfendazol Oksibendazol Thiabendazol	Albendazol Triklabendazol	Albendazol Fenbendazol Oksfendazol	
	Salicilanilidi	Klozantel Rafoksanid Dizofenol Nitroskanat	Klozantel Rafoksanid Oksiklozanid	Klozantel Rafoksanid Niklozamid Rezorantel Nitroskanat	
	Pirazinoizokinoloni		Oksamnikin Prazikvantel	Epsiprantel Prazikvantel	
	Sulfonamidi		Klorsulon		
	Imidazotiazoli/ Tetrahidropirimidini	Levamisol Morantel Pirantel Oksantel			
	Organofosforni spojevi	Diklorvos Halokson Naftalofos			
	Makrociklički laktoni	Abamektin Doramektin Eprinomektin Ivermektin Moksidektin Milbemicin oksim Selamektin			
	Ostali	Piperazin Dietilkarbamazin Doksiciklin Melarsomin Nitroksinil			
	<i>Poslije 2000. g.</i>	Ciklički oktadepsipeptidi	Emodepsid		
		Aminoacetonitrilni derivati	Monepantel		
Spiroindoli		Derkvantel			

Aminofenilamidini (tribendimidin), ciklooktadepsiptidi (emodepsid), aminoacetonitrilni derivati (monepantel) i spiroindoli (derkvantel) su skupine modernih antihelmintika koje su ušle u upotrebu 2004., 2005., 2009. i 2010. godine. Aminofenilamidini i aminoacetonitrilni derivati djeluju kao agonisti nikotinskih acetilkolinskih (nAChR) receptora kao i mnogi njihovi prethodnici, dok ciklooktadepsiptidi, s predstavnikom emodepsidom, aktiviraju kalcijem aktivirane kalijeve kanale (SLO-1) i djeluju na receptore na koje se veže neurotoksični protein latroksin te uzrokuju paralizu nametnika. Spiroindoli su skupina najnovijih antihelmintika s predstavnikom derkvantel koji su antagonisti nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR) i uzrokuju paralizu.

Tablica 3. Najčešće korišteni antihelmintici za liječenje crijevnih infestacija oblicima kod ljudi i životinja (^a samo za ljude; ^b samo za pse i mačke), s nazivom lijeka i skupine kojoj pripada, osnovnim mehanizmom djelovanja i godinom odobrenja i pojave prve rezistencije (preuzeto i prevedeno na hrvatski jezik iz Liu i sur., 2020).

Skupina lijeka	Mehanizam djelovanja	Naziv lijeka	Godina odobrenja lijeka	Godina prve rezistencije
Heterociklički spojevi	Agonist (inhibicijskog) GABA-receptora	Piperazin	1954	1966
Benzimidazoli	Inhibitori polimerizacije mikrotubula	Mebendazol	1972	1975
		Albendazol	1972	1983
Tetrahidropirimidini	Agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora	Morantel	1970	1979
	Agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora	Pirantel	1974	1996
Imidazotiazoli	Agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora	Levamisol	1970	1979
Makrociklički laktoni	Alosterički modulatori glutatom reguliranih kloridnih kanala	Ivermektin	1981	1988
		Moksidektin	1991	1995
Amino-acetonitrilni derivati	Agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora	Monepantel	2009	2013
Spiroindoli	Antagonist nikotinskih acetilkolinskih Receptora	Derkvantel	2010	2016
Aminofenilamidini	Agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora	Tribendimidin ^a	2004	-
Ciklooktadepsiptidi	Aktivira SLO-1 (kalcijem aktivirani kalijev kanal)	Emodepsid ^b	2005	-

U Tablici 3. su navedeni najčešće korišteni antihelmintici za liječenje crijevnih infestacija oblicima kod ljudi i životinja s nazivom skupine i lijeka, osnovnim mehanizmima djelovanja, s navedenom godinom odobrenja i godinom prve zabilježene rezistencije, koju su objavili Liu i sur., 2020. godine. U ovom tekstu navedeni podaci vezani za godine pojavljivanja lijeka na tržištu, godine odobrenja za životinjsku ili ljudsku upotrebu, a naročito za vrijeme pojavljivanja prve rezistencije, se razlikuju od onih u Tablici 3., ali i drugih u ovom radu necitiranih autora iz razloga što su neki lijekovi korišteni bez prethodnog odobrenja od strane nadležnog tijela, što se navedeni podaci razlikuju među različitim zemljama i što pojave rezistencije često prolaze nezabilježene ili se kasni s njihovim izvješćivanjem.

2.3.2. Rezistencija oblića na antihelmintike

Rezistenciju ili otpornost (engl. *resistance*; otpornost na antinematodne lijekove, engl. *anthelmintic resistance*, AR) su još 1980.-te u svom radu definirali Prichard i suradnici: “Otpornost je prisutna kada unutar populacije postoji veća učestalost jedinki koji su u stanju podnijeti određene doze spoja nego što je to u normalnoj populaciji te iste vrste, i ona je nasljedna.” Ovu definiciju dublje objašnjava Coles (2006) i kaže da “Otpornost nastaje kada populacija koja je prethodno bila osjetljiva na lijek pokaže bilo kakav pad odgovora na liječenje i potpuna je kada maksimalna doza lijeka koju domaćin može podnijeti/tolerirati nema učinka.” Shalaby (2013) govori o potrebi korištenja termina 'tolerancija' ili 'podnošenje' (engl. *tolerance*) lijeka kao situacije između uspjeha i neuspjeha tretmana određenim lijekom. Precizniju definiciju rezistencije daje Prichard 2007. godine gdje je otpornost na lijek definirana kao povećanje udjela organizama u populaciji koji dokazano nose gen za rezistenciju. Nasljedne promjene koje se povezuju s rezistencijom oblića na lijekove mogu biti genetske (mutacije, delecije ili višestruke replikacije pojedinih gena) ili epigenetske (metilacijom gena ili promotorskih regija gena se mijenja ekspresija gena kao odgovor na lijek; Fojo, 2007). Wolstenholme (2004) i Vercruyse i sur. (2011) vjeruju da će masovna primjena antihelmintičkih lijekova povećati pritisak na populaciju nametnika te će se favorizirati genotipovi otporni na njih, a kako je otpornost na lijek, odnosno sposobnost nametnika da preživi tretman s antihelmintikom trajna, ona predstavlja veliki problem u veterinarstvu.

Neselektivna i masovna upotreba lijekova u veterinarstvu je rezultirala populacijama nametnika koje su selektivno rezistentne na različite farmakološke skupine (Shalaby, 2013). Kako se u tretmanima često koriste lijekovi s međusobno sličnim kemijskim strukturama,

rezistencija na jedan lijek najčešće znači i rezistenciju na ostale lijekove iz te skupine antihelmintika. Zbog pogrešne upotrebe antihelmintika za suzbijanje infestacija kod životinja i zbog genetskih predispozicija nametnika (Köhler, 2001) koje su dovele do sve učestalije pojave rezistencije u svijetu, na raspolaganju je sve manji broj kemoterapijskih sredstava za liječenje.

Pojava rezistencije na antihelmintike korištene za liječenje uzgojnih životinja se prati već desecima godina (Tablica 3.; Waghorn i sur., 2006; Geurden i sur., 2015), te je u svijetu do danas dokazana otpornost nametnika na većinu lijekova u svim skupinama antihelmintika kao što su benzimidazoli, tetrahidropirimidini, imidazotiazoli i makrociklički laktoni u skoro svim životinjskim uzgojnim vrstama (Geurden i sur., 2015; Crellen i sur., 2016; Bourguinat i sur., 2017; Furtado i sur., 2019; Jimenez Castro i sur., 2019). Važno je primijetiti da se u skorije vrijeme sve više počela bilježiti pojava višestruke rezistentnosti na lijekove (eng. *multidrug resistance*, MDR), pa tako Papadopoulos i sur. (2012) izvještavaju o ovoj rasprostranjenosti pojavi rezistencije vrsta *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia* i *Trichostrongylus* na benzimidazole, imidazotiazole i makrocikličke laktone uzgajanih životinja u Europi, dok Van den Brom i sur. (2015) upozoravaju na to da se sve više bilježe slučajevi rezistencije na novorazvijene lijekove, monopateli i amino-acetonitrilne derivate. Vercruysse i sur. (2011) upozoravaju da je samo pitanje vremena kada će se bilježiti masovni slučajevi rezistencije oblića koji infestiraju ljude, jer nakon relativno kratkog razdoblja upotrebe studije su pokazale smanjenu učinkovitost ivermektina protiv ljudskih infestacija oblicem *Onchocerca volvulus* (Osei-Atweneboana i sur., 2011) te smanjenoj učinkovitosti benzimidazolne skupine lijekova protiv velikih dječjih glista *Ascaris lumbricoides* (Krücken i sur., 2017; Furtado i sur., 2019) povezanih s masovnom i neprimjerenom primjenom lijekova u svijetu.

Prvi izvještaji o rezistenciji na antihelmintike kod životinja su se odnosili na lijek fenotiazin kasnih 1950.-ih, desetak godina od početka njegovog korištenja (Prichard i sur., 1980). Zatim je zabilježeno da je lijek tiabendazol, iz skupine benzimidazola (najstarije skupine antihelmintika) koji je početkom 1960.-tih ušao u upotrebu i od tada se intenzivno primjenjivao, pokazao smanjenu učinkovitost protiv oblića *Haemonchus contortus* već nekoliko godina kasnije, 1964. (Van den Bossche i sur., 1982). Iako primjena antihelmintika nije intenzivna kod kućnih ljubimaca, zabrinjavajuće je to što se u posljednje vrijeme sve više bilježi smanjena učinkovitost makrocikličkih laktona u njihovu liječenju (Wolstenholme i sur., 2015; Bourguinat i sur., 2017), ali i pojava višestruke otpornosti oblića u pasa na primijenjene lijekove (Jimenez Castro i sur., 2019). Vercruysse i sur. (2011) upozoravaju da je samo pitanje vremena kada će se bilježiti masovni slučajevi rezistencije oblića koji infestiraju ljude, jer već postoje izvještaji

o smanjenoj učinkovitosti ivermektina protiv oblića *Onchocerca volvulus* (Osei-Atweneboana i sur., 2011) i smanjenoj učinkovitosti benzimidazolne skupine lijekova protiv velikih dječjih glista *Ascaris lumbricoides* (Krücken i sur., 2017; Furtado i sur., 2019) povezanih s masovnom i neprimjerenom primjenom lijekova u svijetu.

Crijevni nametnici parazitiraju ljude, kućne ljubimce, uzgojne životinje, ali i one u akvakulturi, što utječe na zdravlje ljudi i na proizvodnju hrane s negativnim ekonomskim posljedicama zbog smanjenja imuniteta, slabije fizičke kondicije, smanjenja težine, lošijih proizvodnih karakteristika zaraženih životinja, a često i smrtnih ishoda. Godišnje se izgube milijarde dolara od posljedica infestacije nametničkim oblicima uzgojnih životinja (Preston i sur., 2017). Većina sintetičkih antihelmintika koji su trenutno u upotrebi ne zadovoljavaju sigurnosne standarde zbog svoje toksičnosti i brojnih nuspojava. Na tržištu je mali broj ove vrste lijekova od kojih mnogi imaju uzak spektar djelovanja, nisku razinu sigurnosti, visoku cijenu ili nepraktičan način tretiranja, a mnogi od njih se više neće koristiti zbog pojave rezistencije tretiranih nametnika (Wolstenholme i sur., 2004). Tako je razvijena otpornost na benzimidazole samo četiri godine nakon uvođenja ove vrste lijeka, sedam godina u slučaju tetrahidropirimidina i isto toliko u slučaju makrocikličkih laktona. Upotreba velikih količina veterinarskih lijekova u akvakulturi može doprinjeti stvaranju okolišnog stresa, a sve učestaliji razvoj rezistencije nametnika na antihelmintike postaje problem svjetskih razmjera koji ima utjecaj na životinje, ljude i ekonomiju. Shalaby (2013) upozorava da je od iznimne važnosti naći bolje i održivije načine korištenja postojećih (i onih koji će tek doći na tržište) antihelmintičkih lijekova s ciljem što dugotrajnijeg održavanja njihove učinkovitosti u što većem broju nametničkih vrsta, dok Schulz i sur. (2018) ističu potrebu za unaprjeđenjem već postojećih lijekova, ali i iznalaženjem njihovih alternativnih izvora.

2.3.2.1. Mehanizmi rezistencije

Prema Wolstenholme (2004), otpornost na lijekove može biti posljedica nekoliko mehanizama kao što su: genetičke promjene ciljnog mjesta djelovanja lijeka, kada lijek više ne prepoznaje cilj i time postaje neučinkovit; promjene u transportu lijeka (npr. aktivacija ABC transportera) kada nastane promjena u metabolizmu koja sprječava aktivaciju, inaktivira ili uklanja lijek; promjene u metabolizmu lijeka u tijelu nametnika kada promjena distribucije lijeka u ciljanom organizmu sprječava pristup lijeku do mjesta djelovanja; te umnažanje ciljnih gena za prevladavanje djelovanja lijeka. Ovi mehanizmi i njihova povezanost s rezistencijom

ovise o vrsti nametničkog oblića. Primjerice, iako rezistencija na benzimidazole u oblića može biti posljedica mutacije gena koji kodira za ciljno mjesto djelovanja, ta ista mutacija ne stvara rezistenciju na triklabendazol u metilja *Fasciola hepatica* (Wilkinson i sur., 2012). Nadalje, unutar iste vrste nametnika različite mutacije mogu uzrokovati rezistenciju na isti antihelmintik, kao što različiti mehanizmi rezistencije unutar iste vrste oblića na isti antihelmintik mogu biti posljedica promjene u mehanizmima transporta ili metabolizmu tog lijeka (James i sur., 2007). Mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (engl. *multixenobiotic resistance*, MXR) je stanični obrambeni sustav u obliku staničnog detoksifikacijskog mehanizma koji je odgovoran za istovremenu otpornost organizma na različite ksenobiotike (Kurelec, 1992). Ksenobiotici su sintetičke ili prirodne tvari koje su prisutne u organizmu, ali nisu dio njegovog uobičajenog metabolizma i/ili koje se u organizmu nalaze u neuobičajeno visokim koncentracijama. ABC (engl. *ATP binding cassette*, ABC) transportni proteini stanične membrane vezanjem i hidroliziranjem ATP molekule koriste dobivenu energiju za obavljanje određenih staničnih procesa, ali i za aktivan transport kroz membrane stanica ili organela, kao što je unos i koncentriranje tvari bitnih za život tog organizma, odnosno izbacivanje (engl. *efflux*) potencijalno toksičnih tvari iz stanica organizma (Jones i George, 2004). U ovom radu su istraživani ABC transporteri koji aktivno izbacuju ksenobiotike iz stanice, tzv. proteini eksporter. Glavni čimbenici MXR mehanizma su transmembranski ABC transporteri iz tri potporodice: ABCB (P-glikoprotein, P-gp), ABCC (ili MRP- tip proteina, engl. *multidrug resistance associated protein*) i ABCG (engl. *breast cancer resistance protein*, BCRP ili ABCG2 protein; Cole i Deeley, 1998). Glavna uloga P-gp transportera je sprječavanje akumulacije lipofilnih, organskih tvari unutar stanice, dok MRP najbolje transportiraju organske anione i njihove konjugate, spojeve konjugirane sulfatom i glutation (Holland i sur., 2003).

Također, postoje tvari koje nazivamo MXR inhibitorima (kemosenzibilizatorima) koji mogu blokirati aktivnost ovih transportnih membranskih proteina te tako uzrokovati povećanu akumulaciju ksenobiotika u stanici i omogućiti njihovo potencijalno toksično djelovanje na organizam (Kurelec, 1997). Primjena inhibitora ABC transportera istodobno s primjenom lijeka povećava osjetljivost stanica na terapiju, sprječavajući aktivno izbacivanje lijeka (Ozben, 2006).

2.3.3. Prirodni terapeutici

Zbog sve učestalije pojave otpornosti oblića na različite terapeutike diljem svijeta, ali i informacija o toksičnim učincima na vodene i kopnene životinje, te izvješća o pronalasku ovih terapeutika u prehrambenim proizvodima i njihove sve učestalije pojavnosti u okolišu (Lara, 2003), u ovom radu smo istražili djelovanje dvaju poznatih antihelmintika (abamektina i levamisola), ali i dvaju prirodnih spojeva (nerolidola i farnesola) koji potencijalno otvaraju mogućnost kontrole oblića primjenom prirodnih biljnih spojeva. U zadnjem desetljeću se bilježi porast istraživanja pesticidnih svojstava biljaka, kao alternativa sintetički proizvedenim antihelminticima, ali s malim napretkom u razvoju novih proizvoda (Isman i Grieneisen, 2013). U usporedbi sa sintetičkim proizvodima, aktivni spojevi biljaka su ekološki prihvatljiviji zbog brže razgradnje u okolišu, prirodno niskih koncentracija složenog sastava aktivnih spojeva i načina na koji djeluju na nametnika, ali ne i na domaćina. Iznalaženje novih terapeutika za tretiranje oblića ima određene prepreke, a dio njih je posljedica složenih životnih ciklusa oblića, uključujući nemogućnost dugotrajnijeg održavanja relevantnih životnih stadija nametnika za *in vivo* eksperimentalna istraživanja ili neprikladnost životinjskih modela za *in vivo* istraživanja ljudskih nametničkih vrsta.

Eterična ulja iz biljnih materijala se ekstrahiraju vodenom parom, vodom ili suhom destilacijom, te mehaničkim putem. To su složene smjese koje mogu sadržavati preko stotinu spojeva u različitim količinama u kojima obično dominiraju jedna do tri glavne komponente u relativno visokim koncentracijama (20 – 70 %). Dvije visokoaktivne kemijske grupe spojeva u smjesi eteričnih ulja su fenilpropanski derivati i terpeni (mono-, seskvi- i diterpeni; Bakkali i sur., 2008). Seskviterpenski izolati eteričnih ulja farnesol i nerolidol su prvi put sintetički proizvedeni 1960. te njihovi prirodni izvori više nisu potrebni. Uzimajući u obzir njihova korisna biološka djelovanja, popularnost biljnih proizvoda i eteričnih ulja koja sadrže seskviterpene u narodnoj medicini raste (Špičáková i sur., 2017).

Farnesol je seskviterpenski alkohol koji se može naći u voću, povrću, bilju i sjemenkama (rajčici, kukuruzu, breskvi, limunskoj travi, ruži, jasminu, ciklami, kamilici, eteričnim uljima sjemenki, i dr.; Bartikova i sur., 2014). Zbog ugodnog cvjetnog mirisa se koristi u proizvodnji parfema, te u duhanskoj industriji za aromatiziranje cigareta, a zbog svojstva antibakterijskog djelovanja koristi se i u kozmetičkoj industriji. Dokazano je da posjeduje i antifungicidna svojstva, pa tako svojim djelovanjem inhibira rast raznih gljivica kao što su *Penicillium expansum* (Liu i sur., 2009) i *Botrytis cinerea* (Cotoras i sur. 2013), ali i uzrokuje apoptozu stanica patogene gljivice *Aspergillus flavus* (Wang i sur., 2014). Sharma i

sur. (2022) su zaključili da liječenje infestacije nametničke vrste *Leishmania major* konvencionalnim sintetičkim lijekovima ostavlja negativne učinke koji bi se mogli izbjeći primjenom prirodnih spojeva, te su dokazali učinkovitost niskih koncentracija farnesola na ovog uzročnika u usporedbi sa sintetičkim lijekom Paromomicinom.

Nerolidol je prirodni seskviterpenski alkohol prisutan u eteričnim uljima biljaka poput đumbira, jasmína, lavande, nerolija, čajevca i limunske trave (Ferreira, 2012) kojima daje aromu koja podsjeća na miris kore drveta, pa je čest sastojak kozmetičkih proizvoda (šampona i parfema), kao i deterdženata i sredstava za čišćenje (Lapczynski i sur., 2008), a u prehrambenoj industriji se koristi kao pojačivač okusa mnogih prehrambenih proizvoda. Kao i ostali seskviterpenski spojevi, nerolidol ima visoku hidrofobnost, čime omogućuje lakši prodor kroz plazmatsku membranu i interakciju s unutarstaničnim proteinima i/ili mjestima unutar organela (Park i sur., 2009). Mnoge studije su dokazale snažno antibakterijsko djelovanje nerolidola na različite sojeve *Staphylococcus aureus* na način da oštećuje stanične membrane bakterija (Hada i sur., 2003; Inoue i sur., 2004; Togashi i sur., 2010). Tako je i nerolidol dobiven iz lista eteričnog ulja biljke *Ginkgo biloba* pokazao najveću antibakterijsku aktivnost na vrste *Salmonella enterica* i *S. aureus* u odnosu na druga eterična ulja (izofitol, linalol, β -sitosterol acetat, β -sitosterol, stigmasterol, ergosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozid i poliprenoli iz ginka bilobe) obuhvaćena navedenim istraživanjem (Tao i sur., 2013). Parreira i sur. (2010) su *in vitro* studijom dokazali djelovanje eteričnog ulja ekstrahiranog iz lišća *Baccharis dracunculifolia* na nametnika *Leishmania donovani* uzročnika bolesti lišmanijaze. U ovom ulju su identificirali 14 spojeva, uglavnom seskviterpena, među kojima je najzastupljeniji bio nerolidol (33,51 %). Zabilježeno je i antitripanosomsko djelovanje nerolidola ekstrahiranog iz lišća stabla *Strychnos spinosa* na bičaća *Tripanosoma brucei brucei* (Hoet i sur., 2006), dok su Abdel-Rahman i sur. (2013) potvrdili njegovu snažnu nematocidnu aktivnost na oblića *Caenorhabditis elegans*. Chan i sur. (2016) smatraju da kada se sagledaju sve njegove odlike, nerolidol ima veliki potencijal za upotrebu kao novi terapijski lijek u poljoprivredi i medicini. Crellen i sur. (2016) zaključili da učestala primjena prazikvantela u visokim koncentracijama ima za posljedicu smanjenu učinkovitost na metilja *Schistosoma mansoni*, što bi se moglo prevazići primjenom racemske smjese cis- i trans-nerolidola (1:1) koja uspješno djeluje na ovu vrstu nametnika smanjujući njegovu motoričku aktivnost i uzrokujući uginuće (Silva i sur., 2014). Također, u studiji od Navarro-Moll i sur. (2011) o toksičnom djelovanju prirodnih spojeva na nametničke oblice *Anisakis* vrste, je ustanovljeno da je nerolidol najaktivniji (u

manjoj mjeri i farnesol) spoj među ispitanim seskviterpenima koji su uzrokovali 100 %-tnu smrtnost L3 ličinke *Anisakis simplex* (Navarro-Moll i sur., 2011).

2.4. Primijenjene metode pri određivanju toksičnog djelovanja terapeutika na *Anisakis* ličinke

2.4.1. Određivanje ispitivanih spojeva metodom tekućinske kromatografije

U analizama tekućinskom kromatografijom se sve češće primjenjuje metoda tekućinske kromatografije ultra-visoke učinkovitosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). UHPLC kolone su punjene znatno manjim česticama (< 2 μm) od HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) kolona (3 – 5 μm) što dovodi do značajnog povećanja brzine, razlučivosti i osjetljivosti metode. Kolona C-18 s reverznom fazom je najčešće korištena u tekućinskoj kromatografiji. Reverzno-fazna kromatografija (engl. *reverse phase chromatography*, RPC) ili kromatografija na obrnutim fazama je kromatografska metoda koja koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Budući da se prvo eluiraju polarni spojevi, a nepolarni spojevi zadržavaju, proces se naziva 'obrnuta faza'. Stacionarna faza je inertna nepolarna tvar. Uobičajeno korištena kolona je oktadecil ugljikov lanac (C-18) vezan na silicij dioksid. Različite C-18 kolone imaju isti opći mehanizam zadržavanja, ali različite stacionarne faze imaju male razlike u kemiji površine koje stvaraju promjene u selektivnosti i dovode do različitih svojstava zadržavanja. Najčešća otapala koja se koriste za eluiranje analita iz kolone s obrnutim fazama su organska, kao što su acetonitril, metanol ili tetrahidrofuran (THF), i anorganska kao što su etanol i 2-propanol (izo-propilni alkohol). Analit se iz kolone može eluirati izokratično ili u gradijentu. Pri izokratičnom eluiranju sastav pokretne faze je konstantan, dok se pri gradijentnom eluiranju sastav mobilne faze mijenja kontinuirano ili skokovito čime se postiže djelotvornije odjeljivanje i znatno kraće vrijeme eluiranja. Ovisno o svojstvima analita, primjenjuju se različiti detektori, tj. oni koji reagiraju na karakteristiku koja je jedinstvena za taj analit. Najčešće primjenjivani su fluorescentni i UV detektori. Fluorescentni detektor (engl. *fluorescence*, FL) mjeri optičku emisiju svjetlosti (fluorescenciju) molekula analita nakon što su pobuđene na višoj energetskej valnoj duljini, stoga pokazuje visoku osjetljivost na spojeve koji imaju prirodnu ili derivatizacijom izazvanu fluorescenciju. Mjeri se intenzitet ovog emitiranog svjetla u svrhu kvantifikacije koncentracije analita. UV-detektor reagira na analit koji apsorbira u ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) dijelu spektra na određenoj valnoj duljini i reagira samo

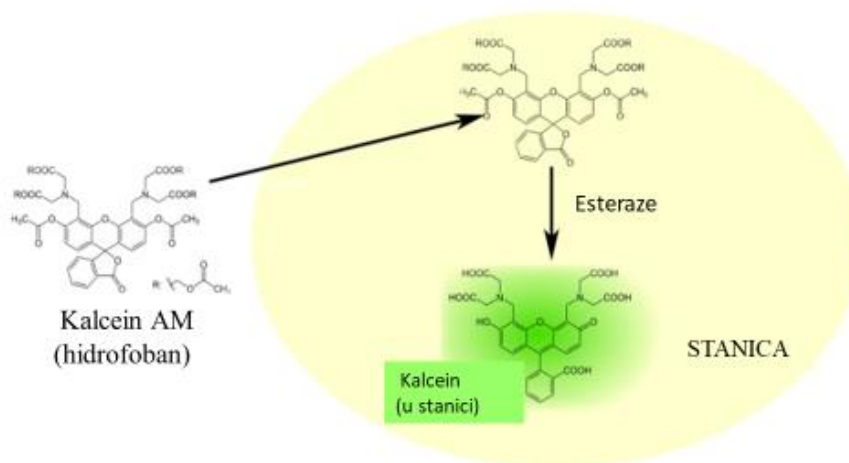
na spojeve s kromoforima. Standardni UV detektor omogućuje korisniku odabir valne duljine između 195 i 370 nm, dok se detektori koji pružaju širi odabir valne duljine, i pokrivaju i UV i VIS raspon (195 do 700 nm) nazivaju UV/VIS detektori. UV i VIS detektori prikazuju dobiveni rezultat u dvije dimenzije (intenzitet svjetlosti i vrijeme), ali detektor s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) očitava cijeli spektar istovremeno i dodaje treću dimenziju (valnu duljinu), što je korisno za određivanje najprikladnije valne duljine bez ponavljanja analiza.

2.4.2. Određivanje oksidativnog stresa mjerenjem razine reaktivnih kisikovih čestica (ROS)

Reaktivne kisikove čestice (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su produkt aerobnog metabolizma živih stanica u normalnim uvjetima, ali i različitih upalnih reakcija u organizmu. To su slobodne nesparene kisikove čestice koje imaju oksidativno djelovanje i nastale su od kisika, a radikali su negativno nabijeni ioni koji sadrže barem jedan nespareni elektron kao što je: superoksidni anion (superoksid ($O_2^{\cdot-}$), jedno-elektronsko stanje), hidroksilni radikal (HO^{\cdot} , tro-elektronsko stanje), vodikov peroksid (RO_2^{\cdot} , dvostruko elektronsko redukcijско stanje) te alkoksilni radikal (RO^{\cdot}). Reaktivne kisikove čestice koje nisu slobodni radikali, ali mogu lako prijeći u njih, su jednostavni singletni kisik (1O_2 ili $O^{\cdot-}$, primarno pobuđeno stanje), ozon (O_3), hipokloritna kiselina ($HOCl$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja ovih čestica se naziva oksidativni stres. U niskoj razini, ROS čestice su uključene u regulaciju bioloških i fizioloških procesa kao važne obrambene i signalne molekule, ali su i jaki oksidansi koji mogu sudjelovati u oksidativnom stresu podizanjem unutarstaničnih razina kako bi oštetili oksidirane proteine, DNA i lipide. Najčešće primjenjivana metoda za praćenje količine unutarstaničnih reaktivnih kisikovih čestica je 2,7-diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA) test, gdje navedeni spoj slobodno prolazi kroz staničnu membranu, a nakon ulaska u stanicu ga unutarstanična esteraza hidrolizira u diklorofluorescein (DCFH) koji ne može proći kroz stanične membrane. Unutarstanične reaktivne kisikove čestice (uglavnom vodikov peroksid, H_2O_2) oksidiraju nefluorescentni DCFH u fluorescentni DCF, što znači da se s povišenjem razine ovih čestica u stanici, raste i intenzitet fluorescencije. Ovu reakciju katalizira unutarstanična peroksidaza, citokrom C ili Fe(II) (Jia i sur., 2020).

2.4.3. Acetometoksi kalcein (C-AM) test

Kalcein-AM (engl. *calcein-acetomethoxy*, C-AM) je acetometoksi derivat kalceina, odnosno hidrofobna boja koja lako prolazi kroz staničnu membranu u žive stanice. Ova boja se koristi za određivanje stanične sposobnosti za preživljavanje (engl. *viability*) većine eukariotskih stanica. U živim stanicama nefluorescentni acetometoksi kalcein se hidrolizira unutarstaničnim esterazama u mikroskopski vidljiv zeleno-fluorescentni kalcein koji se zadržava u citoplazmi stanice (Slika 3.). Intenzitet kalceinske boje mjeren fluorimetrom izravno je proporcionalan aktivnosti staničnih esteraza, što je pak proporcionalno količini živih stanica. Kalcein-AM je istovremeno i supstrat za transmembranske proteine (P-glikoprotein, Pgp, i protein rezistencije na više lijekova, MRP), te se koristi u istraživanjima funkcije ovih membranskih transportera metodom protočne citometrije ili sličnim metodama.



Slika 3. Hidroliza acetometoksi kalceina (kalcein-AM) s unutarstaničnim esterazama u fluorescentni kalcein (preuzeto i prilagođeno iz *Calcein AM Cell Viability Assay*, A Geno Technology, Inc., USA).

2.4.4. Imunohistokemijske metode analize

Metode imunohistokemije su često korištene dijagnostičke metode koje se temelje na vezanju specifičnog antitijela za istraživani antigen te daju informaciju o području istraživanog antigena u stanici (Sukswai i Khoury, 2019). Osnovni reagens imunohistokemijske tehnike je antitijelo. Jednu skupinu čine monoklonska antitijela. To su antitijela koja nastaju iz identičnih imunskih stanica, kloniranih iz jedne matične stanice, stoga imaju stalnu strukturu i vežu se

na iste antigene. U tkivu se antigeni mogu imunohistokemijski detektirati na dva načina, direktnom ili indirektnom metodom. Direktna metoda uključuje upotrebu označenog antitijela koje na sebi ima vezan enzim ili neku fluorescentnu molekulu, i koje reagira direktno sa ciljnim antigenom. Primjerice, imunohistokemijskom vizualizacijom aktina i tubulina dobivamo informaciju o potencijalnim učincima ispitivanih spojeva na elemente citoskeleta *Anisakis* L3 ličinki.

§ 3. CILJEVI I HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

1. Metodom tekućinske kromatografije odrediti količine akumuliranih ispitivanih spojeva u tkivima L3 ličinki *Anisakis pegreffii* nakon 24-satnog *in vitro* tretmana sintetičkim terapeutcima abamektinom, levamisolom, te prirodnim seskviterpenskim spojevima farnesolom i nerolidolom u šest radnih koncentracija za svaki ispitivani spoj: a) bez prisustva inhibitora, b) u prisustvu inhibitora ABC transportera valspodara, c) u prisustvu inhibitora ABC transportera MK571.

2. Odrediti letalne koncentracije LC_{50} za L3 ličinke *Anisakis pegreffii* nakon 24-satnog *in vitro* tretmana s abamektinom, levamisolom, farnesolom i nerolidolom, u šest radnih koncentracija, s/bez inhibitora ABC transportera valspodara i MK571, te statistički odrediti LC_d (statistički značajna koncentracija pojedinačnog ispitivanog spoja koja je pokazala najveću razliku u larvicidnom učinku među ličinkama tretiranim samo pojedinačnim ispitivanim spojem i onih uz dodatak jednog od inhibitora).

3. Utvrditi razlike u aktivnosti ABC transmembranskih transportera uključenih u MXR (višestruku rezistenciju na ksenobiotike) mehanizme L3 ličinki *Anisakis pegreffii* nakon *in vitro* tretmana s abamektinom, levamisolom, farnesolom i nerolidolom u kombinaciji s jednim inhibitorom, valspodarom ili MK571, nakon 2, 6, 12 i 18 h izloženosti LC_d koncentraciji, mjerenjem količine akumuliranih ispitivanih spojeva u tkivu ličinki metodom tekućinske kromatografije, i utjecaj pojedinog inhibitora metodom akumulacije kalceina-AM.

4. Odrediti ovisnost akumulacije abamektina, levamisola, farnesola i nerolidola, s/bez inhibitora valspodara/MK571 o vremenu *in vitro* izloženosti (nakon 2, 6, 12 i 18 h) statistički određenoj LC_d koncentraciji.

5. Utvrditi postoje li razlike u akumulaciji između sintetičkih i prirodnih ispitivanih spojeva u tkivima L3 ličinki *Anisakis pegreffii* nakon 24-satnog *in vitro* tretmana s abamektinom, levamisolom, farnesolom i nerolidolom u šest različitih koncentracija za svaki ispitivani spoj:

a) bez prisustva inhibitora, b) u prisustvu inhibitora ABC transportera valspodara, c) u prisustvu inhibitora ABC transportera MK571.

6. Utvrditi postoje li razlike u aktivnosti ABC transportera primjenom sintetičkih i prirodnih ispitivanih spojeva na L3 ličinke *Anisakis pegreffii* nakon 24-satnog *in vitro* tretmana s abamektinom, levamisolom, farnesolom i nerolidolom u šest različitih koncentracija za svaki ispitivani spoj: a) bez prisustva inhibitora, b) u prisustvu inhibitora ABC transportera valspodara, c) u prisustvu inhibitora ABC transportera MK571.

7. Odrediti djelovanje ispitivanih spojeva na razinu reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u tretiranim stanicama L3 ličinki *Anisakis pegreffii*.

8. Imunohistokemijski analizirati djelovanje ispitivanih spojeva na cjelovitost citoskeletnih proteina (β -tubulina i aktina) konfokalnom mikroskopijom.

3.2. Hipoteze

H1 Abamektin, levamisol, farnesol i nerolidol djeluju toksično na L3 ličinke *Anisakis pegreffii* u 24-satnim *in vitro* tretmanima

H2 Dodatak inhibitora (valspodara/MK571) utječe na toksičnost ispitivanih spojeva za L3 ličinke vrste *Anisakis pegreffii* u 24-satnim *in vitro* tretmanima

H3 Povišenje koncentracije ispitivanih spojeva utječe na toksičnost za *Anisakis* ličinke

H4 Vrijeme izloženosti utječe na toksičnost ispitivanih spojeva za *Anisakis* ličinke

H5 Utvrđene su razlike u aktivnosti ABC transportera *Anisakis* ličinki u *in vitro* tretmanima s pojedinim ispitivanim spojem metodom akumulacije kalceina i mjerenjem količine akumuliranih ispitivanih spojeva u tkivu ličinki metodom tekućinske kromatografije

- H6** Utvrđene su razlike u akumulaciji između sintetičkih i prirodnih ispitivanih spojeva u tkivima L3 ličinki *Anisakis pegreffii* u *in vitro* tretmanima
- H7** Utvrđeno je djelovanje ispitivanih spojeva na proizvodnju reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u tretiranim stanicama ličinki

§ 4. MATERIJALI I METODE

4.1. Reagensi i kemikalije

Kemikalije korištene u *in vitro* tretmanu *Anisakis* L3 ličinki i analizi akumulacije istraživanih spojeva u tkivima ličinki metodom tekućinske kromatografije su navedene u nastavku. Nerolidol, farnesol, abamektin, levamisol, MK571, valsopodar, dimetil sulfoksid (DMSO), antitubulin-Cy3 antitijelo i Atto 488 Phalloidin su od proizvođača Sigma–Aldrich (St. Louis, SAD), te 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Invitrogen). Kalcein acetoksimetil ester (Calcein-AM, C-AM) je proizveden od Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR). Svi reagensi, kemikalije i ultračista voda korišteni za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti su bili HPLC čistoće ili više: metanol (J. T. Baker), 96 % etanol (Honeywell), mravlja kiselina (Honeywell), acetonitril (J. T. Baker) i ultračista voda (J. T. Baker).

4.1.1. Priprema mobilnih faza za tekućinsku kromatografiju

Mobilna faza A: mravlja kiselina (0,01 %); priprema se tako da se u tikvicu od 1 L ulije oko 500 mL ultračiste vode i doda 1 mL mravlje kiseline (LC-MS čistoće) te se nadopuni vodom do oznake.

Mobilna faza B: mravlja kiselina (0,01 %) u acetonitrilu; priprema se tako da se u tikvicu od 1 L ulije oko 500 mL acetonitrila i doda 1 mL mravlje kiseline (LC-MS čistoće) te se nadopuni acetonitrirom do oznake.

4.1.2. Priprema standardnih otopina ispitivanih spojeva

Temeljne standardne otopine (engl. *stock*) pojedinačnih ispitivanih spojeva su pripremljene otapanjem njihovih standardnih otopina u za njih prikladnim otapalima. Nakon pripremanja otopine su čuvane pri temperaturi od 4 °C najviše tjedan dana.

Farnesol: temeljna standardna otopina je pripremljena otapanjem 5 g standarda farnesola u 96 %-tnom etanolu. Dobivena koncentracija temeljne standardne otopine 475 mg/mL je služila za pripremu radnih otopina.

Nerolidol: temeljna standardna otopina je pripremljena dodavanjem 96 %-tnog etanola u 1 mL standarda nerolidola. Dobivena koncentracija temeljne standardne otopine je bila 86,19 mg/mL i služila je za pripremu radnih otopina.

Abamektin: temeljna standardna otopina je pripremljena otapanjem 100 mg standarda abamektina u metanolu. Dobivena koncentracija temeljne standardne otopine je bila 10 mg/mL i služila je za pripremu radnih otopina.

Levamisol: temeljna standardna otopina je pripremljena otapanjem 250 mg standarda levamisola u metanolu. Dobivena koncentracija temeljne standardne otopine je bila 25 mg/mL i služila je za pripremu radnih otopina.

Radne otopine standarda (engl. *working solutions*) pojedinačnih ispitivanih spojeva su pripremljene otapanjem njihovih temeljnih standardnih otopina u za njih prikladnim otapalima. Za pripremanje otopina inhibitora MK571 i valspodara je korišten DMSO kao otapalo, a koncentracije radnih otopina su bile 10 μ M/L za MK571 i 5 μ M/L za valspodar.

4.2. Prikupljanje L3 ličinki vrste *Anisakis pegreffii*

Riba ulovljena u vanjskim vodama srednjeg istočnog Jadrana (ribolovna zona C1; FAO 37.2.1 Jadransko more), šarun (*Trachurus trachurus*), pišmolj (*Merlangius merlangus*), ugotica (*Micromesistius poutassou*) ili oslić (*Merluccius merluccius*), je transportirana na ledu do laboratorija, te je obrađena isti dan na način da je razrezana duž trbušne strane i ostavljena jedan sat da *Anisakis* ličinke spontano migriraju van iz trbušnih organa (Slika 4.). Temeljem istraživanja raspodjele ovih vrsta u Jadranskom moru (Mladineo i sur., 2017) i morfološkim pregledom korištenjem Olympus SZX10 svjetlosnog mikroskopa (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan) prema morfološkim dijagnostičkim ključevima (Berland, 1961) je potvrđeno da se radi o vrsti *Anisakis pegreffii*, što je kasnije i potvrđeno molekularnom analizom ličinki (nije prikazano u ovom radu). Aktivne i neoštećene ličinke duže od 1,5 cm su sakupljene plastičnom pincetom i isprane filtriranom i autoklaviranom morskom vodom (a. m. v.) da se odstrane nečistoće, a prislanjanjem na filter papir je uklonjen višak tekućine. Ličinke su raspodijeljene po 10 jedinki u svaku od šest jažica polistirenskih pločica za daljnje testiranje u eksperimentima u laboratorijskim uvjetima (*in vitro*).



Slika 4. Prikupljanje *Anisakis pegreffii* L3 ličinki iz utrobe šaruna *Trachurus trachurus* rezanjem duž trbušne strane (a), vađenje unutrašnjih organa ribe (b) i prikaz tkiva infestiranog *Anisakis* ličinkama (c).

4.3. *In vitro* tretmani L3 ličinki vrste *Anisakis pegreffii*

Testovi toksičnosti za L3 ličinke vrste *Anisakis pegreffii* u *in vitro* uvjetima su rađeni s ciljem određivanja karakterističnih letalnih LC_{50} (engl. *lethal concentration*) i razlikovnih LC_d (engl. *differentiating*) koncentracija za svaki ispitivani spoj: farnesol, nerolidol, abamektin i levamisol, u odsustvu i prisustvu ABC inhibitora, MK571 i valspodara. Letalna koncentracija je ona koncentracija tvari/spoja u zraku ili vodi/otopini koja u ispitivanom uzorku izaziva uginuće 50 % ispitivanih životinja u određenom vremenskom periodu izražena u miligramima raspršene tvari na litru zraka (mg/L) ili u miligramima spoja po litri vode/otopine (mg/L). Razlikovna koncentracija (LC_d) je koncentracija karakteristična za svaki ispitivani spoj i pri kojoj je vidljiva najveća razlika u larvicidnom učinku između ličinki tretiranih samo s ispitivanim spojem i onih tretiranih s ispitivanim spojem uz dodatak jednog od inhibitora.

4.3.1. Testiranje toksičnosti i određivanje LC_{50} ispitivanih spojeva

U ovom dijelu eksperimenta je testirana toksičnost pojedinog ispitivanog spoja: farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola, u odsustvu i prisustvu ABC inhibitora, MK571 i valspodara; te su određene njihove LC_{50} koncentracije za L3 ličinke vrste *Anisakis pegreffii* u *in vitro* uvjetima.

4.3.1.1. Postavljanje eksperimenta za određivanje LC₅₀ ispitivanih spojeva

Provedeni su testovi toksičnosti ispitivanih spojeva kako bi se odredile njihove radne koncentracije koje će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Kako bi se omogućilo pouzdano određivanje letalne koncentracije LC₅₀ svakog ispitivanog spoja, nakon pregleda dostupnih relevantnih informacija u literaturi, preliminarno je testiran široki raspon koncentracija (Slika 5.), te na temelju eksperimentalno dobivenih krivulja doza-odgovor (engl. *dose-reponse*; podaci nisu prikazani), je određeno šest radnih koncentracija za farnesol, nerolidol, abamektin i levamisol koje su korištene u daljnjim eksperimentima.



Slika 5. Postavljanje *in vitro* eksperimenta preliminarnih ispitivanja toksičnosti tretiranjem *Anisakis* L3 ličinki s širokim rasponima koncentracija ispitivanih spojeva: farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola.

S ciljem određivanja LC₅₀ letalnih koncentracija, pripremljeno je šest koncentracija radnih otopina pojedinog ispitivanog spoja: nerolidola, farnesola, abamektina i levamisola. U konačni volumen od 2 mL, s 1,8 mL autoklavirane morske vode i 0,2 mL pojedine koncentracije svakog od ispitivanih spojeva, je u svaku jažicu nanijeto po deset ličinki (Slika 6.). U svakom setu je na svaku polistirensku pločicu s po šest jažica dodan po jedan ispitivani spoj (farnesol, nerolidol, abamektin i levamisol) u jednoj od ukupno šest koncentracija (Tablica 4.) koji je na žive ličinke djelovao sam, pa je svaka pojedina koncentracija bila u šesteroplikatu. U drugom setu istovjetnih jažica, u šesteroplikatima, se uz po jedan ispitivani spoj u svakoj od ukupno šest radnih koncentracija dodao valspodar (kao P-gp inhibitor), a u trećem setu MK571 (kao MRP inhibitor), u koncentracijama 5 μM za valspodar i 10 μM za MK571. Dodane koncentracije inhibitora su određene prema radu Hamdoun i sur. (2004) koje su bile dovoljne da potpuno

inhibiraju P-gp i MRP upravljaju transportnu aktivnost u embrijima morskog ježinca *Strongylocentrotus purpuratus*. Prvo su pločice inkubirane pri 36 °C tijekom jednog sata kako bi se omogućilo zasićenje P-gp ili MRP transportera, potom su pojedine radne koncentracije ispitivanih spojeva dodane u jažice i pokrivene parafilmom, nakon čega su pločice stavljene u inkubator na 36 °C tijekom 24 sata.

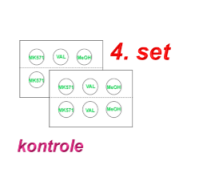
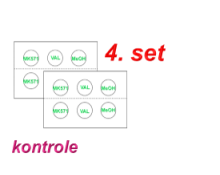
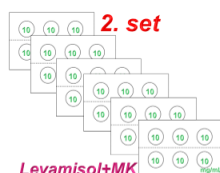
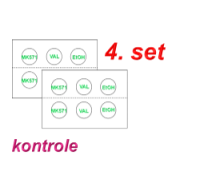
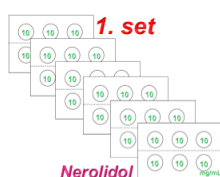
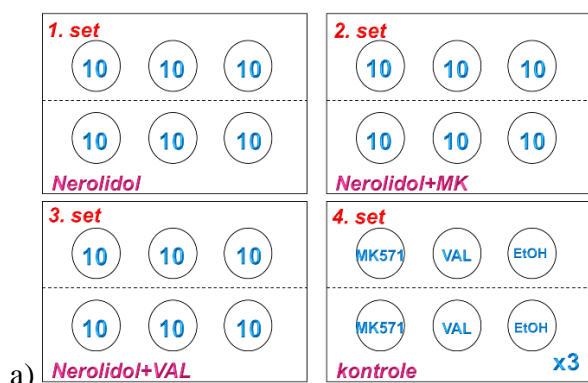
Tablica 4. Koncentracije radnih otopina ispitivanih spojeva korištenih tijekom *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki, pri određivanju LC₅₀ koncentracija.

ISTRAŽIVANI SPOJ	KONCENTRACIJE RADNIH OTOPINA STANDARDA (μmol/L)					
FARNESOL	22,262	44,525	89,050	155,837	222,624	356,199
NEROLIDOL	25,442	50,885	101,769	178,096	254,423	356,199
ABAMEKTIN	0,004	0,089	0,354	0,709	1,418	5,670
LEVAMISOL	0,020	0,099	0,494	2,468	12,338	61,688

Negativne kontrole su pratile svaki prethodno navedeni set eksperimenta, rađene su isti dan i pod istim uvjetima, a sastojale su se od po 10 ličinki inkubiranih u svakoj jažici s 2 mL konačnog volumena autoklavirane morske vode (1,8 mL) samo s otapalom ispitivanog spoja (0,2 mL etanola ili metanola) u jednom setu, te s po jednim inhibitorom (otapalu DMSO; 0,5% konačne koncentracije) u druga dva seta.



Slika 6. Nanošenje *Anisakis* L3 ličinki u jažice polistirenske pločice pri *in vitro* eksperimentima testiranja toksičnosti.



b)

Slika 7. Shematski prikaz *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti ispitivanih spojeva na *Anisakis* L3 ličinke: a) prikaz smještanja ličinki u jažice polistirenskih pločica u *in vitro* tretmanu nerolidolom u jednoj od radnih koncentracija; b) prikaz smještanja ličinki u jažice u *in vitro* tretmanu farnesolom, nerolidolom, abamektinom i levamisolom u svih šest radnih koncentracija u odsustvu/prisustvu jednog od ABC inhibitora (valsopodara ili MK571).

4.3.1.2. Postupak očitavanja rezultata eksperimenta za određivanje LC₅₀ ispitivanih spojeva

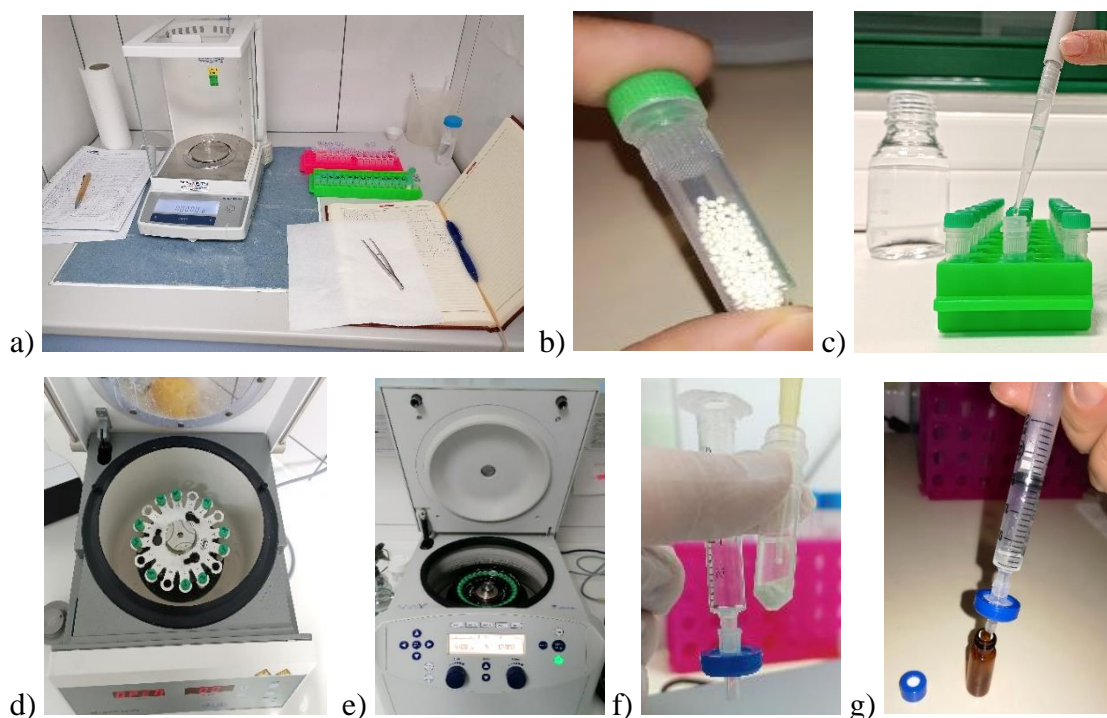
Po isteku vremena inkubacije se, promatrajući pod stereomikroskopom (Slika 8.), bilježio broj živih (ako se ličinka spontano pomiče ili reagira pokretom unutar 10 sekundi nakon dodira iglom za histološke preparate), odnosno uginulih ličinki. Nakon vizualnog pregleda ličinke su prislonjene uz filter papir da se odstrani tekućina s vanjske strane tkiva, isprane autoklaviranom morskom vodom, prislonjene uz filter papir da se posuše i sakupljene u prethodno označene polietilenske dvomililitarske epruvetice s čepom, te čuvane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. U ovom dijelu *in vitro* eksperimenta se tretiralo *Anisakis* ličinke s četiri ispitivana spoja, svaki u šest radnih koncentracija, u tri seta (bez dodatka inhibitora ili s dodatkom jednog od njih), a svaki set je napravljen u šest replika, što znači da je u 432 jažice tretirano ukupno 4320 ličinki (Slika 7.). Negativne kontrole su se sastojale od inkubacije ličinki bez ispitivanih spojeva i pratile su svaki prethodno navedeni set tretmana, rađene su u tri seta (bez dodatka inhibitora ili s dodatkom jednog od njih), što čini 18 kontrolnih jažica za svaki ispitivani spoj, odnosno ukupno 72 jažice, tj. 720 ličinki (Slika 7.).



Slika 8. Promatranje *Anisakis* L3 ličinki pod stereomikroskopom: a) svjetlosni mikroskop Olympus, SZX10 (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan); b) jažica s *Anisakis pegreffii* L3 ličinkama u autoklaviranoj morskoj vodi.

4.3.1.3. Ekstrakcija ispitivanih spojeva iz tretiranih *Anisakis* L3 ličinki nakon LC₅₀ eksperimenta

Nakon LC₅₀ pokusa, L3 *Anisakis* ličinke su isprane i osušene po prethodno opisanom postupku i stavljene u označene polietilenske epruvetice s čepom. Nakon odmrzavanja, epruvetice s ličinkama su izvagane na analitičkoj vagi s četiri decimale (Slika 9.a) i njihova masa je zabilježena. Nakon toga su u epruveticu dodane keramičke kuglice za usitnjavanje (Slika 9.b) i 0.6 mL metanola ili 96 % etanola ovisno o ispitivanom spoju (Slika 9.c). Epruvetice su začepljene i smještene u MagNA Lyser gdje su homogenizirane (Roche; Slika 9.d) u dva ciklusa po 45 sekundi pri brzini postavljenoj na 7000, s petominutnim hlađenjem nakon svakog ciklusa homogeniziranja pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, te su potom centrifugirane 4 min. na $15.294\text{ } \times\text{ } \text{g}$, pri $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Slika 9.e). Supernatant je odpipetiran (Slika 9.f), te filtriran kroz 0,22 mm najlonski filter (Slika 9.g) direktno u vial za analizu metodom tekućinske kromatografije kojom je analizirana razina akumulacije farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola u tretiranim tkivima.



Slika 9. Postupak ekstrakcije je uključivao: a) vaganje epruvetice s tretiranim *Anisakis* ličinkama na analitičkoj vagi; b) dodavanje keramičkih kuglica za usitnjavanje; c) dodavanje otopine za ekstrakciju; d) homogenizaciju; e) centrifugiranje; f) pipetiranje supernatanta i g) filtraciju.

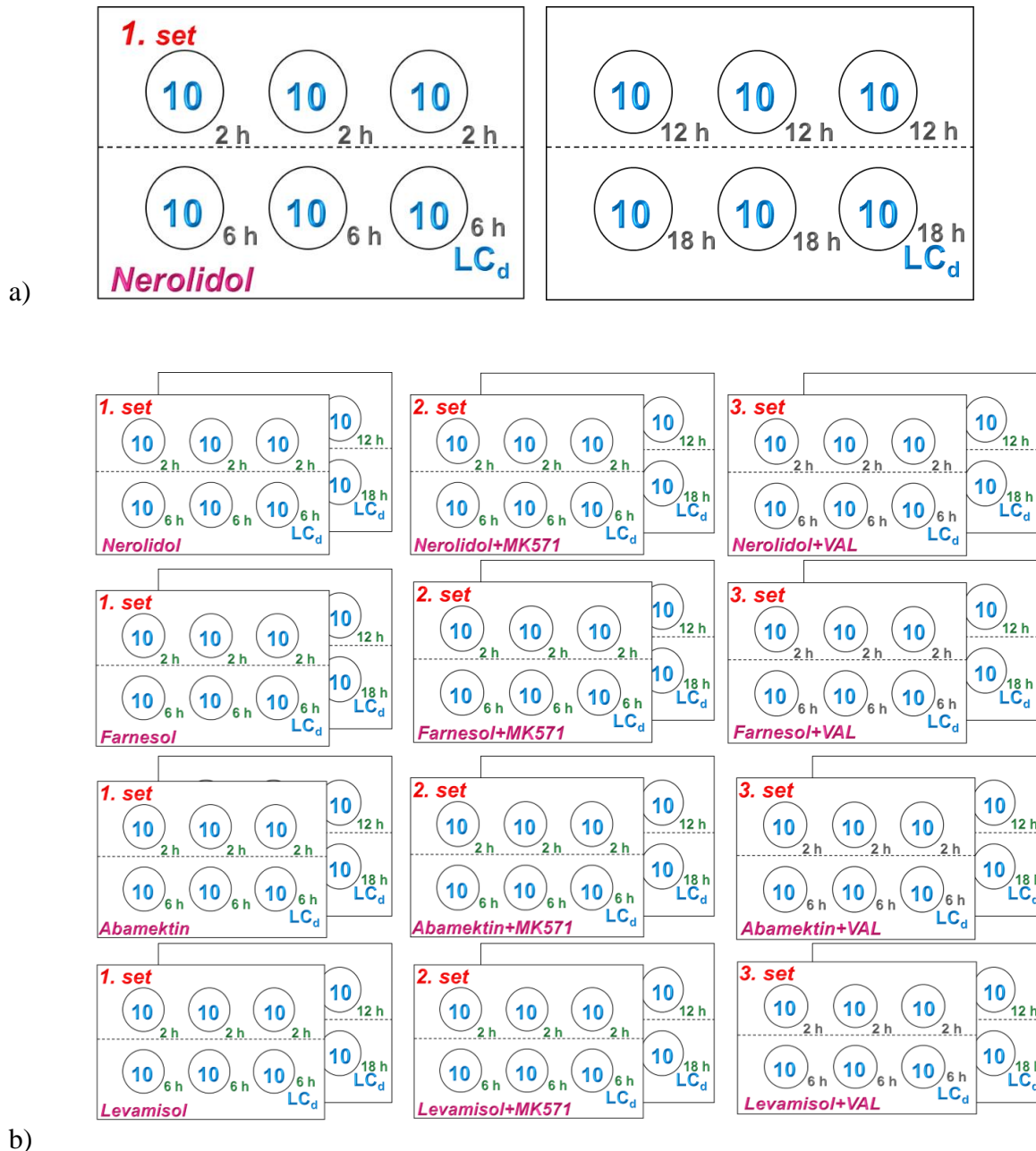
4.3.2. Određivanje LC_d ispitivanih spojeva na *Anisakis* ličinke i priprema za daljnje analize

LC_d koncentracija u smislu ovog istraživanja predstavlja koncentraciju ispitivanog spoja pri kojoj inhibicija određenog ABC transportera s jednim od inhibitora (valsopodara ili MK571) izaziva značajno veći larvicidni učinak u odnosu na onu s drugim inhibitorom ili u odnosu na odsustvo obaju inhibitora u tretmanu, na temelju čega bi se moglo pretpostaviti da se određeni istraživani spoj iz stanice oblića izbacuje djelovanjem tog transportera koji može biti inhibiran s tim inhibitorom.

Prema podacima dobivenim iz prethodnog eksperimenta se odredila LC_d koncentracija nerolidola, farnesola, abamektina i levamisola, izračunata uparenim t-testom sa statistički značajnim p-vrijednostima < 0,05. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). S intervalima pouzdanosti (engl. *confidence intervals*, CI) od 95 %.

5.3.2.1. Određivanje učinaka LC_d ispitivanih spojeva na *Anisakis* ličinke

S ciljem određivanja učinaka LC_d karakterističnih koncentracija za svaki od ispitivanih spojeva (nerolidola, farnesola, abamektina i levamisola) *Anisakis* ličinke su raspoređene po 10 jedinki u svaku jažicu polistirenske pločice u konačni volumen od 2 mL, s 1,8 mL autoklavirane morske vode i 0,2 mL pojedine LC_d koncentracije svakog od ispitivanih spojeva (Slika 10.).



Slika 10. Shematski prikaz *in vitro* eksperimenta u kojem su *Anisakis* L3 ličinke tretirane ispitivanim spojevima u LC_d koncentracijama u odsustvu/prisustvu jednog od ABC inhibitora (valspondara i MK571) i inkubirane 2, 6, 12 i 18 sati: a) smještanje ličinki u jažice polistirenskih pločica pri tretmanu nerolidolom u LC_d koncentraciji; b) sveobuhvatni prikaz smještanja ličinki u jažice pri tretmanu sa sva četiri ispitivana spoja: farnesolom, nerolidolom, abamektinom i levamisolom.

Postavljena su tri seta za svaki ispitivani spoj, gdje je u svakom setu na svaku polistirensku pločicu s po šest jažica dodan po jedan ispitivani spoj u svojoj LC_d koncentraciji koja je određena u prethodnom *in vitro* eksperimentu; jedan set u kojem je na žive *Anisakis* L3 ličinke ispitivani spoj djelovao sam; u drugi set istovjetnih jažica je uz svaki ispitivani spoj dodan valsopodar (kao P-gp inhibitor); dok je u treći set dodan MK571 (kao MRP inhibitor). Inhibitori su dodavani u koncentracijama radnih otopina 5 μM za valsopodar i 10 μM za MK571. Na početku eksperimenta su polistirenske pločice inkubirane pri 36 °C tijekom jednog sata kako bi se omogućilo zasićenje P-gp ili MRP transportera, potom su pojedine LC_d koncentracije ispitivanih spojeva (s/bez inhibitora) dodane u jažice i pokrivene parafilmom, nakon čega su pločice stavljene u inkubator pri 36 °C. Po dvije ličinke su sakupljene nakon svake točke inkubacije od 2, 6, 12 i 18 sati (svaka vremenska točka u triplikatu). U ovom dijelu eksperimenta je u 144 jažice tretirano 288 ličinki. Uz svaku vremensku točku svakog seta se radila kontrola u tri replike, što čini ukupno 48 kontrolnih jažica s 96 ličinki.

4.3.2.2. Uzorkovanje i priprema tretiranih *Anisakis* L3 ličinki za daljnje analize

Po završetku *in vitro* eksperimenta u kojem su *Anisakis* L3 ličinke bile izložene LC_d koncentracijama karakterističnim za svaki ispitivani spoj, one su uzorkovane na svakoj od postavljenih vremenskih točaka kao što je navedeno u poglavlju 4.3.2.1. ovog rada.

4.3.2.2.1. Priprema tretiranih *Anisakis* L3 ličinki za određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u stanicama metodom kolorimetrije

Po dvije ličinke su se sakupile nakon svake točke inkubacije od 2, 6, 12 i 18 sati (svaka vremenska točka u triplikatu), a tkivo tretiranih *Anisakis* L3 ličinki je korišteno za određivanje slobodnih kisikovih radikala (ROS).

4.3.2.2.2. Priprema tretiranih *Anisakis* L3 ličinki za imunohistokemijsku (IHC) analizu

Nakon 18 h inkubacije su sakupljene žive *Anisakis* L3 ličinke za testiranje učinka ispitivanih spojeva na njihove citoskeletne proteine, aktin i tubulin, imunohistokemijskom metodom.

4.3.2.2.3. Ekstrakcija ispitivanih spojeva iz tkiva tretiranih *Anisakis* L3 ličinki za analizu tekućinskom kromatografijom

Nakon LC_d tretmana, L3 *Anisakis* ličinke su ekstrahirane po istom protokolu kao što je opisano u poglavlju 4.3.1.3., te je analizirana razina akumulacije farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola u tretiranim tkivima metodom tekućinske kromatografije.

4.3.2.2.4. Priprema *Anisakis* L3 ličinki za acetometoksi kalcein (C-AM) test

Po deset netretiranih prethodno izvaganih *Anisakis* ličinki je postavljeno u svaku jažicu u koju je dodan po jedan od inhibitora, valsopodar ili MK571, i inkubirano 1 h pri 36 °C. U sve jažice (osim kontrolnih) je dodan nerolidol, farnesol, abamektin i levamisol u karakterističnoj LC_d koncentraciji.

4.4. Određivanje akumulacije ispitivanih spojeva u tkivu *Anisakis* ličinke metodom tekućinske kromatografije

Tekućinska kromatografija ultra-visoke učinkovitosti na obrnutoj fazi (engl. *reverse-phase ultra-high performance liquid chromatography*; UHPLC) je kvalitativna i kvantitativna kromatografska tehnika koja mjeri apsorpciju ultraljubičastog zračenja (UV-DAD) i ovdje je primijenjena za određivanje razine akumulacije ispitivanih spojeva (farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola) kojima su L3 ličinke vrste *Anisakis pegreffii* bile izložene tijekom *in vitro* eksperimenata.

Za kromatografske analize je korišten uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) Agilent 1290 Infinity II LC (Agilent, Germany; Slika 11.) opremljen s Agilent 1290 High Speed Pump pumpom (G7120A), 1290 MCT termostatiranim odjeljkom za kolone (G7116B), 1290 Vialsampler automatskim uzorkivačem (G7129B), 1290 DAD FS detektorom s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD; G7117A) i 1260 FLD Spectra fluorescentnim detektorom (engl. *fluorescence detector*, FLD; G7121B), dok je izlazni signal detektora sniman i obrađen OpenLab CDS version 2.5 software. Analizirani spojevi su detektirani ultraljubičastom (engl. *ultraviolet*, UV) spektrofotometrijom na nekoliko različitih valnih duljina UV spektra, dok je kvantifikacija rađena na eksperimentalno određenoj valnoj duljini koja je pod navedenim

kromatografskim uvjetima odgovarala apsorpcijskom maksimumu pojedinog ispitivanog spoja (nerolidol: 202 nm, farnesol: 196 nm, levamisol: 214 nm i abamektin: 245 nm).



Slika 11. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) Agilent 1290 Infinity II LC (Agilent, Germany) korišten pri određivanju razina akumulacije ispitivanih spojeva u tkivu *Anisakis* L3 ličinki.

4.4.1. Uvjeti kromatografske analize

Kromatografsko odvajanje je odrađeno na C-18 koloni s obrnutom fazom (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 5 mm, 2.7 μm veličine čestica; Agilent, USA) s odgovarajućom C-18 pretkolonom istog proizvođača (Slika 12.), pri temperaturi od 30 °C. Ispitivani spojevi su eluirani gradijentom pokretne mobilne faze A (0,01 % mravlja kiselina u ultračistoj vodi) i B (0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu), a ostali kromatografski uvjeti su bili prilagođeni pojedinom ispitivanom spoju.



Slika 12. C-18 kolona i pripadajući nosač s pretkolonom spojeni na uređaj za tekućinsku kromatografiju.

4.4.1.1. Kromatografska metoda za analizu farnesola

Pripremljeni ekstrakti tretiranog tkiva *Anisakis* L3 ličinki su analizirani na prisutnost ispitivanog spoja farnesola metodom tekućinske kromatografije upotrebom Agilent 1290 UHPLC sustava primjenjujući Poroshell 120 EC-C18 kolonu i pripadajuću predkolonu za kromatografsko odvajanje i pri ostalim uvjetima prethodno opisanim u poglavlju 4.4. Farnesol je eluran u gradijentu otapala A i B (prema Tablici 5.), a detektiran UV apsorpcijom na valnoj duljini svog apsorpcijskog maksimuma, 196 nm. Vrijeme trajanja analize je postavljeno na 12,0 minuta, brzina protoka 0,4 mL/min, s volumenom injektiranja 20 μ L.

Tablica 5. Prikaz gradijenta otapala A i B i protoka pri kromatografskom odvajanju farnesola.

VRIJEME	Mobilna faza:	A	B	PROTOK
0,0 min		80 %	20 %	0,4 mL/min
9,0 min		20 %	80 %	0,4 mL/min
10,0 min		0 %	100 %	0,4 mL/min
12,0 min		80 %	20 %	0,4 mL/min

4.4.1.2. Kromatografska metoda za analizu nerolidola

Pripremljeni ekstrakti tretiranog tkiva *Anisakis* L3 ličinki su analizirani na prisutnost ispitivanog spoja nerolidola metodom tekućinske kromatografije upotrebom Agilent 1290 UHPLC sustava primjenjujući Poroshell 120 EC-C18 kolonu i pripadajuću predkolonu za kromatografsko odvajanje i pri ostalim uvjetima prethodno opisanim u poglavlju 4.4. Nerolidol je eluran u gradijentu otapala A i B (prema Tablici 6.), a detektiran UV apsorpcijom na valnoj duljini svog apsorpcijskog maksimuma, 202 nm. Vrijeme trajanja analize je postavljeno na 12,0 minuta, brzina protoka 0,4 mL/min, s volumenom injektiranja 2 μ L.

Tablica 6. Prikaz gradijenta otapala A i B i protoka pri kromatografskom odvajanju nerolidola.

VRIJEME	Mobilna faza:	A	B	PROTOK
0,0 min		80 %	20 %	0,4 mL/min
9,0 min		20 %	80 %	0,4 mL/min
10,0 min		0 %	100 %	0,4 mL/min
12,0 min		80 %	20 %	0,4 mL/min

4.4.1.3. Kromatografska metoda za analizu abamektina

Pripremljeni ekstrakti tretiranog tkiva *Anisakis* L3 ličinki su analizirani na prisutnost ispitivanog spoja abamektina metodom tekućinske kromatografije upotrebom Agilent 1290 UHPLC sustava primjenjujući Poroshell 120 EC-C18 kolonu i pripadajuću predkolonu za kromatografsko odvajanje i pri ostalim uvjetima prethodno opisanim u poglavlju 4.4. Abamektin je eluran u gradijentu otapala A i B (prema Tablici 7.), a detektiran UV apsorpcijom na valnoj duljini svog apsorpcijskog maksimuma, 245 nm. Vrijeme trajanja analize je postavljeno na 9,0 minuta, brzina protoka 0,2 mL/min, s volumenom injektiranja 40 μ L.

Tablica 7. Prikaz gradijenta otapala A i B i protoka pri kromatografskom odvajanju abamektina.

VRIJEME	Mobilna faza: A	B	PROTOK
0,0 min	50 %	50 %	0,2 mL/min
0,5 min	50 %	50 %	0,2 mL/min
3,0 min	0 %	100 %	0,2 mL/min
7,0 min	0 %	100 %	0,2 mL/min
9,0 min	50 %	50 %	0,2 mL/min

4.4.1.4. Kromatografska metoda za analizu levamisola

Pripremljeni ekstrakti tretiranog tkiva *Anisakis* L3 ličinki su analizirani na prisutnost ispitivanog spoja levamisola metodom tekućinske kromatografije upotrebom Agilent 1290 UHPLC sustava primjenjujući Poroshell 120 EC-C18 kolonu i pripadajuću predkolonu za kromatografsko odvajanje i pri ostalim uvjetima prethodno opisanim u poglavlju 4.4. Levamisol je eluran u gradijentu otapala A i B (prema Tablici 8.), a detektiran UV apsorpcijom na valnoj duljini svog apsorpcijskog maksimuma, 214 nm. Vrijeme trajanja analize je postavljeno na 6,5 minuta, brzina protoka 0,25 mL/min, s volumenom injektiranja 20 µL.

Tablica 8. Prikaz gradijenta otapala A i B i protoka pri kromatografskom odvajanju levamisola.

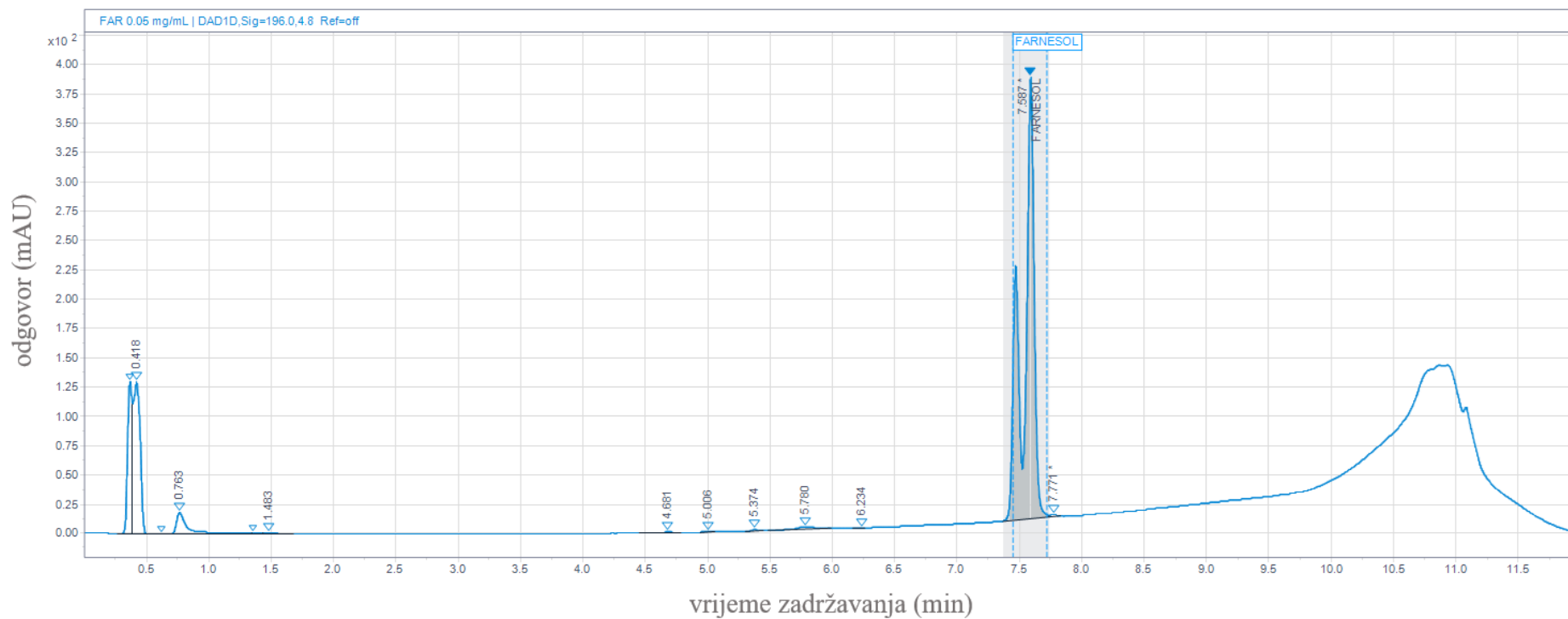
VRIJEME	Mobilna faza: A	B	PROTOK
0,0 min	100 %	0 %	0,25 mL/min
1,2 min	90%	10 %	0,25 mL/min
3,0 min	40 %	60 %	0,25 mL/min
3,6 min	5 %	95 %	0,25 mL/min
5,6 min	100 %	0 %	0,25 mL/min
6,5 min	100 %	0 %	0,25 mL/min

4.4.2. Kalibracijski pravci ispitivanih spojeva

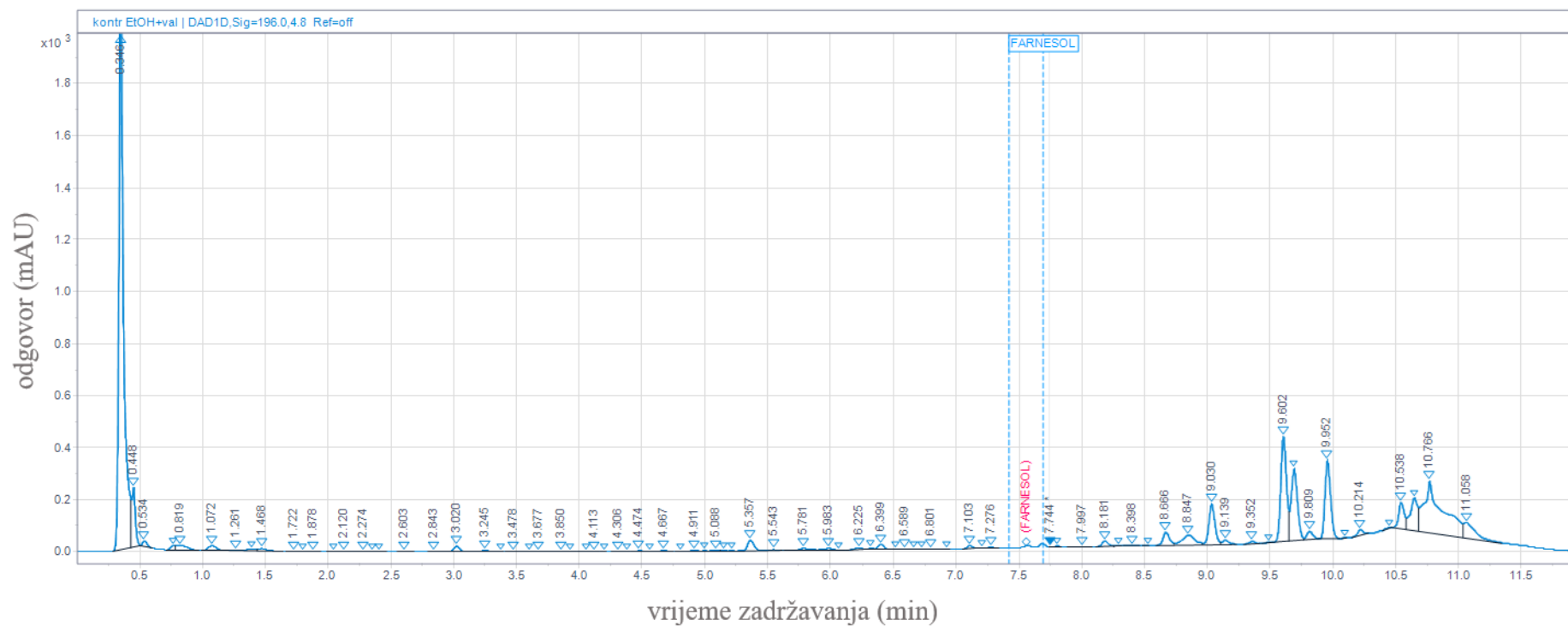
Kalibracijski pravci standardnih otopina ispitivanih spojeva (farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola) su dobiveni koristeći srednje vrijednosti površina pikova njihovih pojedinačnih standardnih otopina pripremljenih u osam različitih koncentracija i izmjerenih četiri puta. Kvalitativno određivanje pojedinog ispitivanog spoja u ličinkama je vršeno direktnom usporedbom s kromatogramom odgovarajuće standardne otopine, identifikacijom pika na temelju uspoređivanja položaja pika na kromatogramu, vremena zadržavanja (engl. *retention time*, RT), i njegovim maksimumom apsorpcije u ultraljubičastom području spektra. Dok se kvantitativno određivanje temeljilo na izračunu površine ispod pika i nagiba pravca dobivenog iz odgovarajućeg kalibracijskog pravca. Uzorci bez ispitivanog spoja (negativni kontrolni uzorak matriksa, negativni kontrolni uzorak otapala i slijepi kontrolni uzorak; engl. *blank*) i oni u koje je dodana poznata koncentracija ispitivanog spoja (obogaćenje matriksa; engl. *spiked*) se koristila za kontrolu kvalitete instrumentalne analize, odnosno kao potvrda da se odvojio pozadinski signal (engl. *background interference*) od onog od ispitivanog spoja na kromatogramu.

4.4.2.1. Kalibracijski pravac farnesola

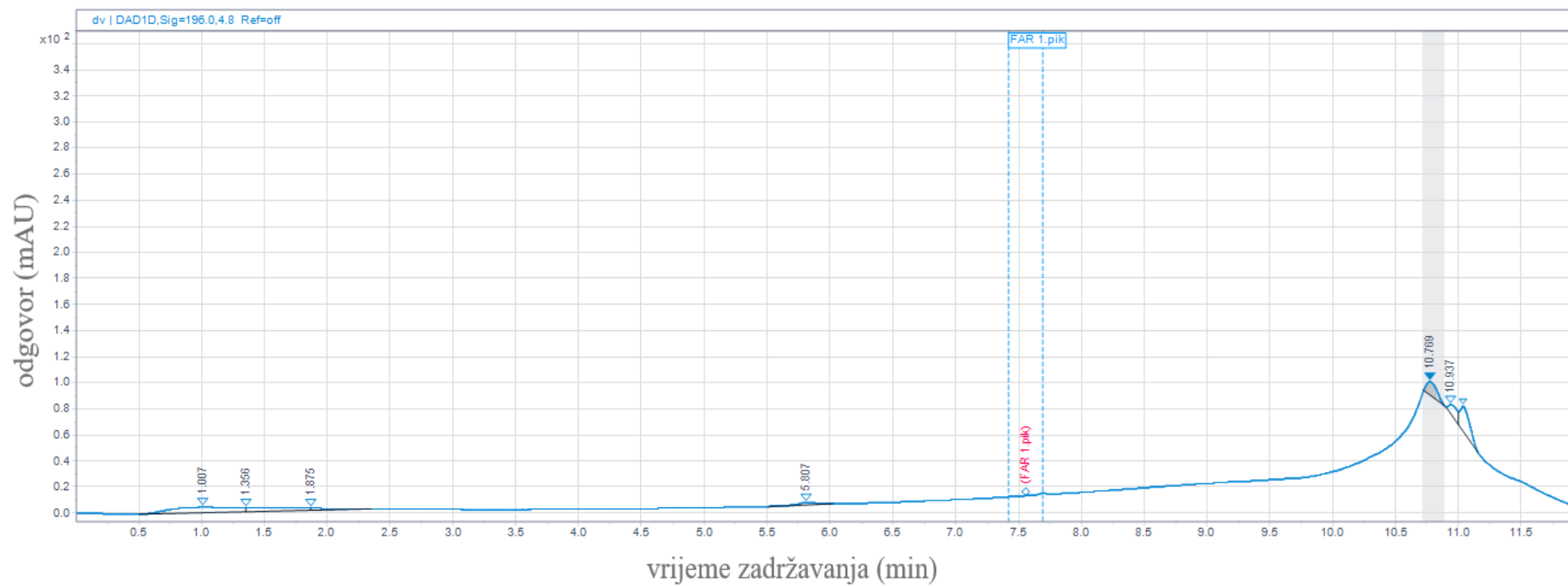
Prema metodi navedenoj u poglavlju 4.4.1.1. tehnikom tekućinske kromatografije ultra-visoke učinkovitosti na obrnutoj fazi s primjenom ultraljubičaste detekcije (UHPLC-UV-DAD) je prema dobivenim kromatogramima standardnih otopina (Slika 13.) određeno vrijeme zadržavanja farnesola na kromatografskoj koloni, RT= 7,587 min. Usporedno sa standardnim otopinama, primjenjujući iste kromatografske uvjete (poglavlje 4.4.1.) su analizirani kromatogrami uzoraka negativnih kontrola (Slika 14.), bez injektiranja analita (Slika 15.) i etanola kao ekstrakcijskog otapala (Slika 16.).



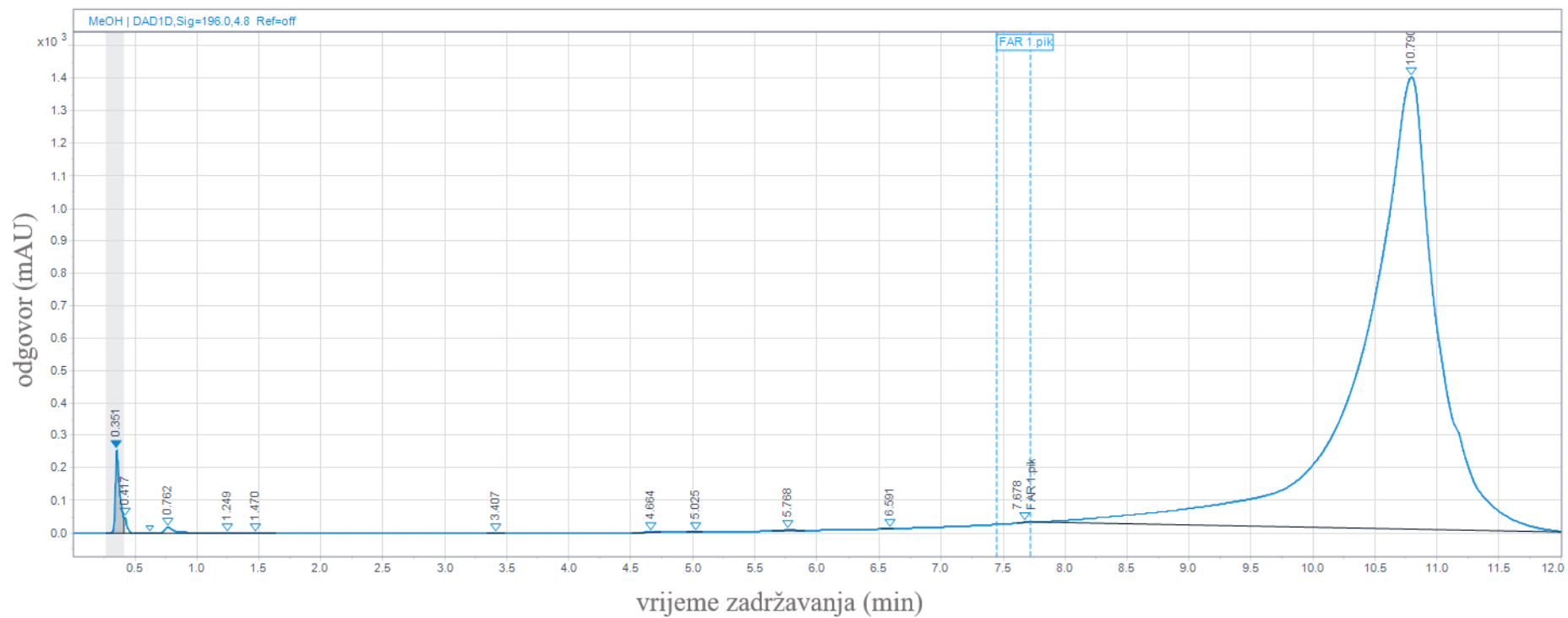
Slika 13. Kromatogram standardne otopine farnesola, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za farnesol navedenoj u poglavlju 4.4.1.1. (vrijeme zadržavanja farnesola, RT= 7,587 min).



Slika 14. Kromatogram uzorka negativne kontrole postavljene tijekom tretmana s farnesolom, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za farnesol navedenoj u poglavlju 4.4.1.1.

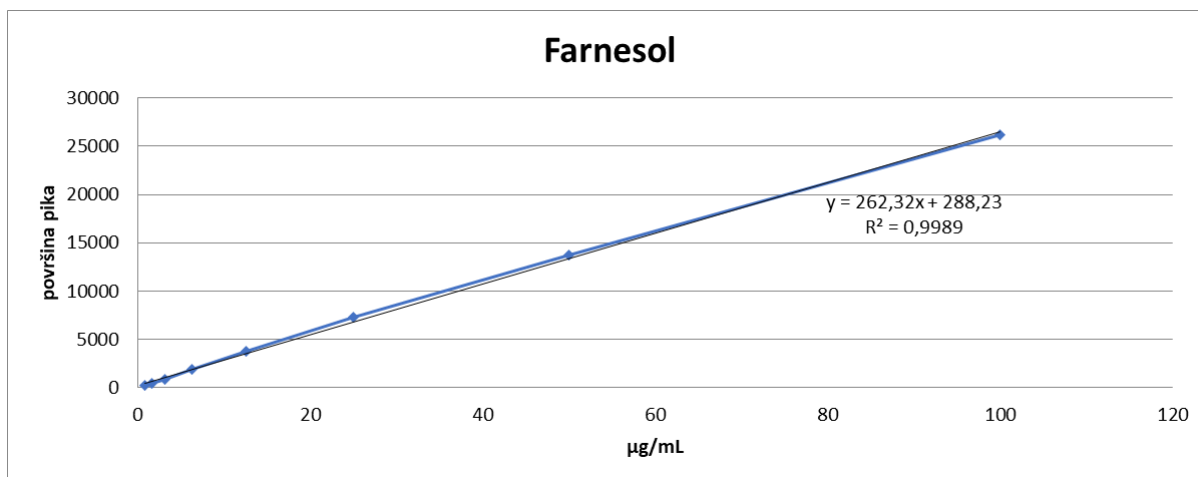


Slika 15. Kromatogram protoka bez injektiranja analita, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za farnesol navedenoj u poglavlju 4.4.1.1.



Slika 16. Kromatogram s injektiranih 2 μ L etanola (ekstrakcijsko otapalo), dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za farnesol navedenoj u poglavlju 4.4.1.1.

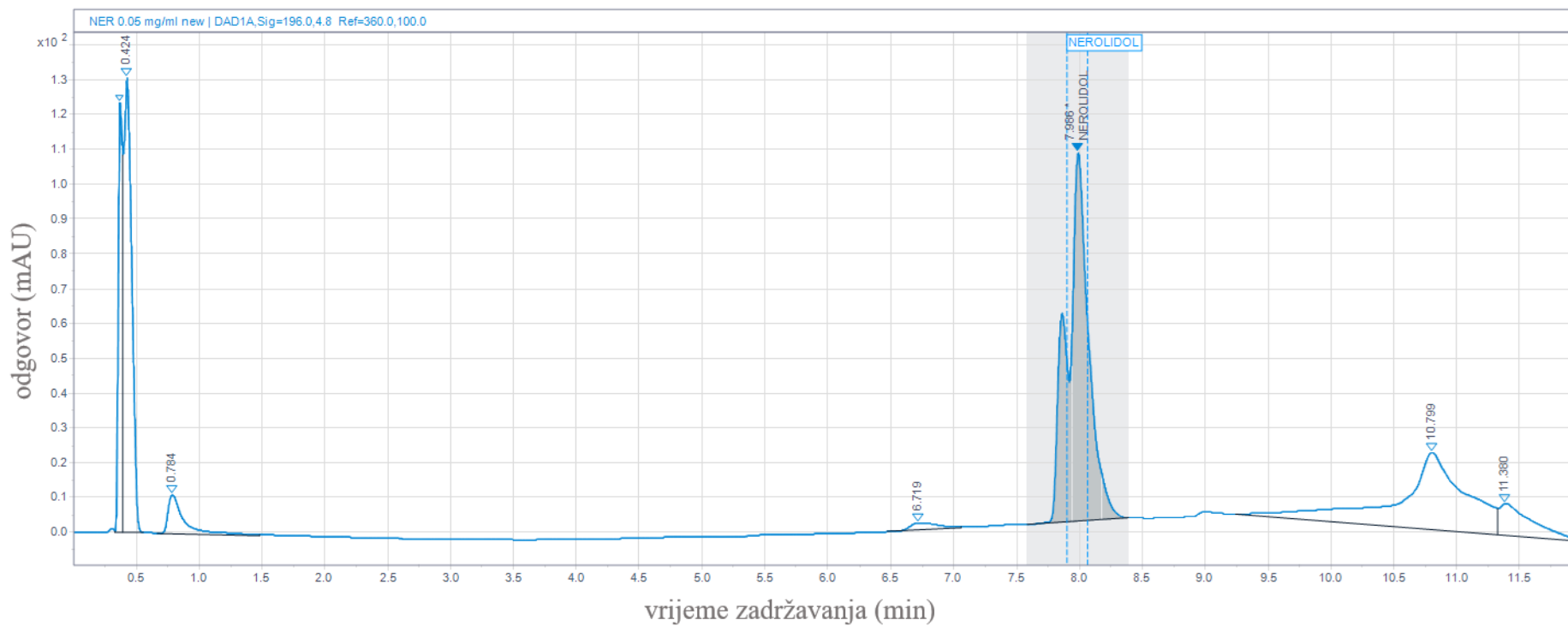
Standardni kalibracijski pravac za farnesol (Slika 17.) je dobiven pripremom osam radnih otopina sljedećih koncentracija: 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 µg/mL odgovarajućim razrjeđivanjem temeljne standardne otopine.



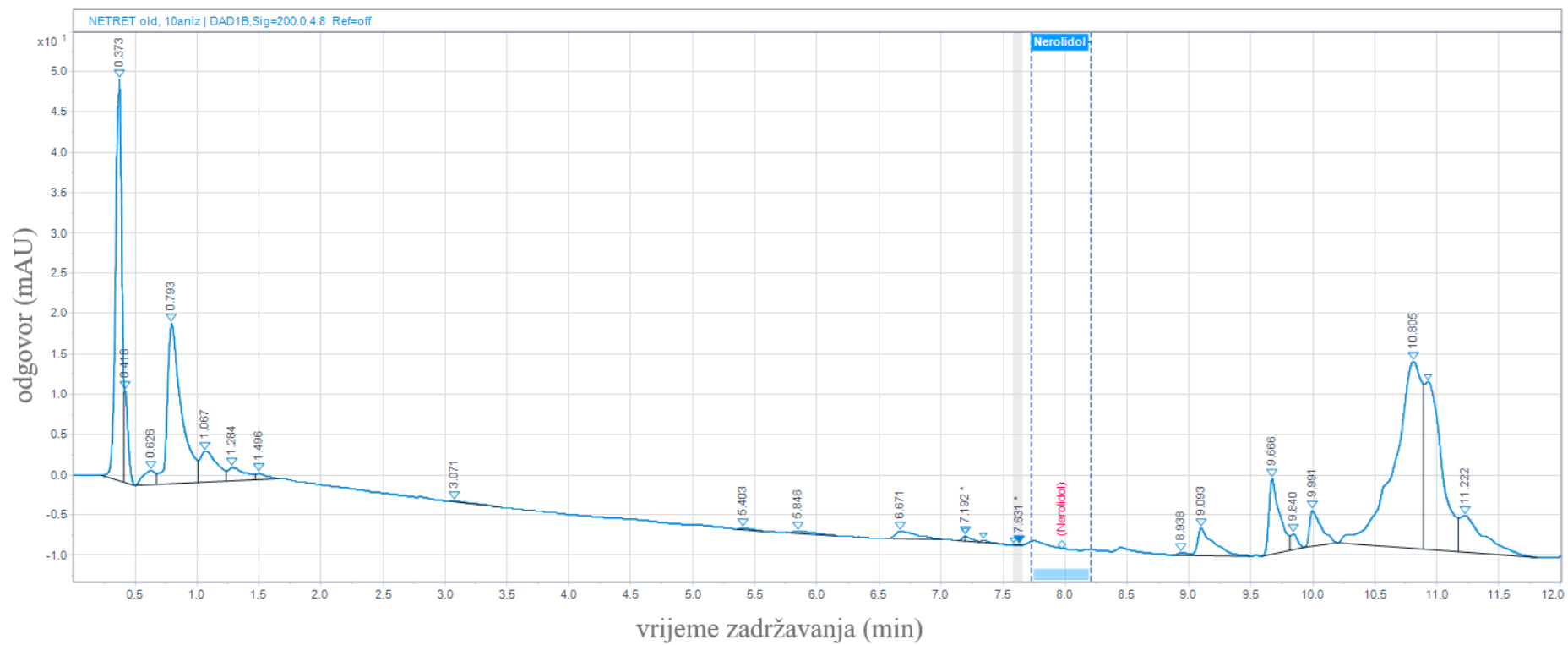
Slika 17. Linearni kalibracijski pravac dobiven UHPLC-UV-DAD metodom (poglavlje 4.4.1.1.) za određivanje farnesola.

4.4.2.2. Kalibracijski pravac nerolidola

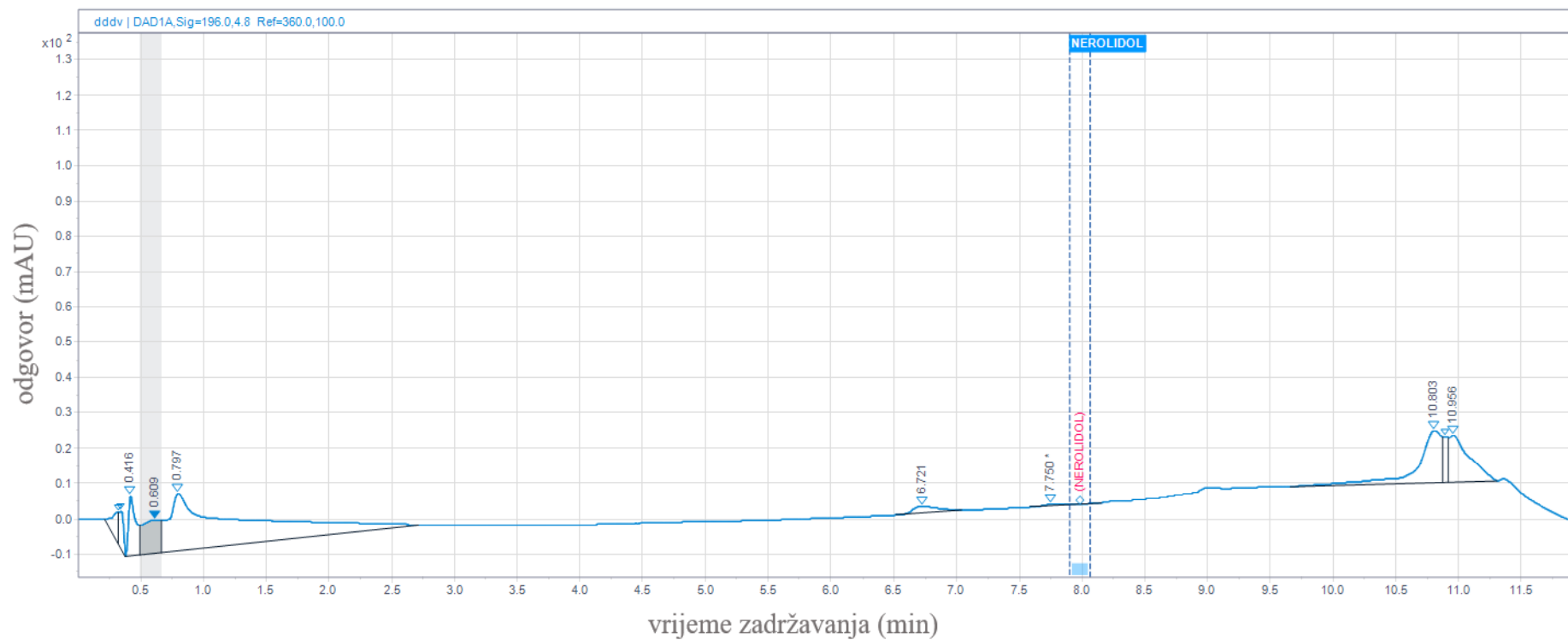
Prema metodi navedenoj u poglavlju 4.4.1.2. tehnikom tekućinske kromatografije ultra-visoke učinkovitosti na obrnutoj fazi s primjenom ultraljubičaste detekcije (UHPLC-UV-DAD) je prema dobivenim kromatogramima standardnih otopina (Slika 18.) određeno vrijeme zadržavanja nerolidola na kromatografskoj koloni, RT= 7,986 min. Usporedno sa standardnim otopinama, primjenjujući iste kromatografske uvjete (poglavlje 4.4.1.) su analizirani kromatogrami uzoraka negativnih kontrola (Slika 19.), bez injektiranja analita (Slika 20.) i etanola kao ekstrakcijskog otapala (Slika 21.).



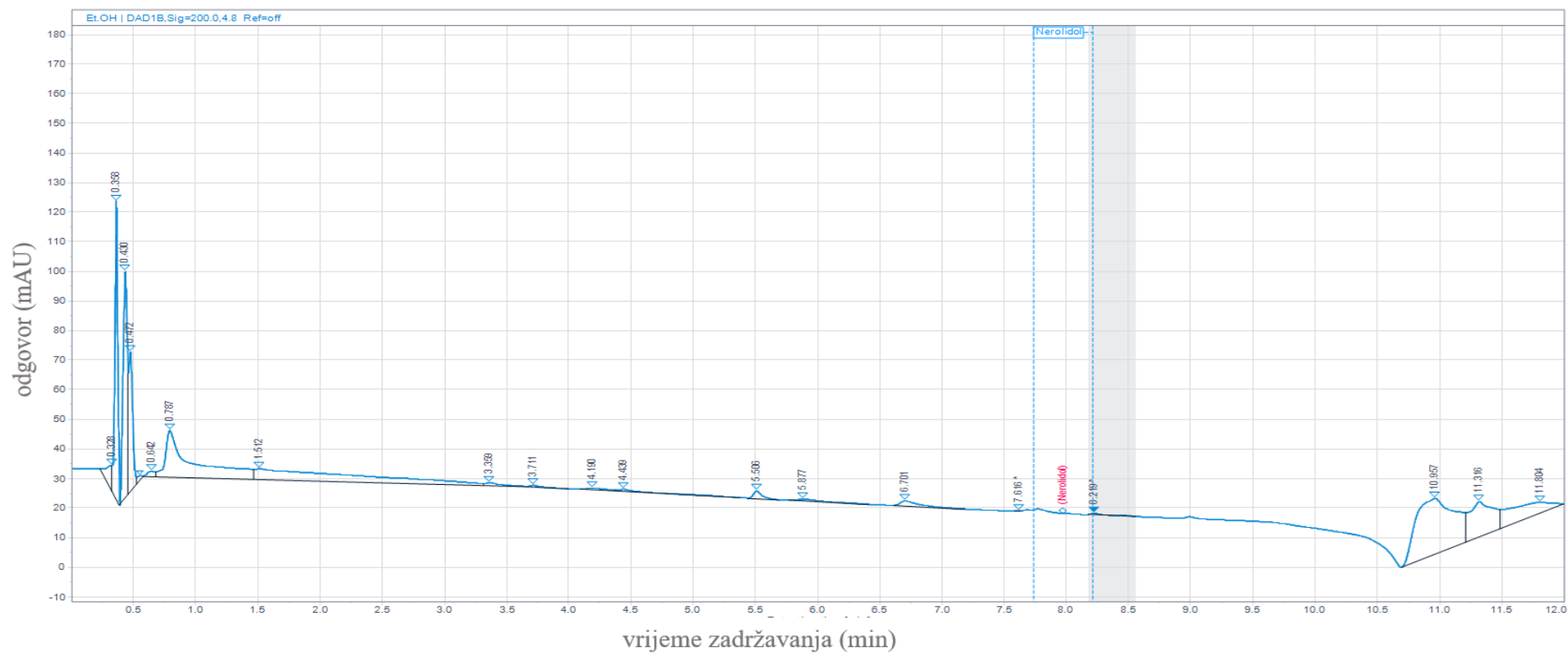
Slika 18. Kromatogram standardne otopine nerolidola, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za nerolidol navedenoj u poglavlju 4.4.1.2. (vrijeme zadržavanja nerolidola, RT= 7,986 min).



Slika 19. Kromatogram uzorka negativne kontrole postavljene tijekom tretmana nerolidolom, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za nerolidol navedenoj u poglavlju 4.4.1.2.

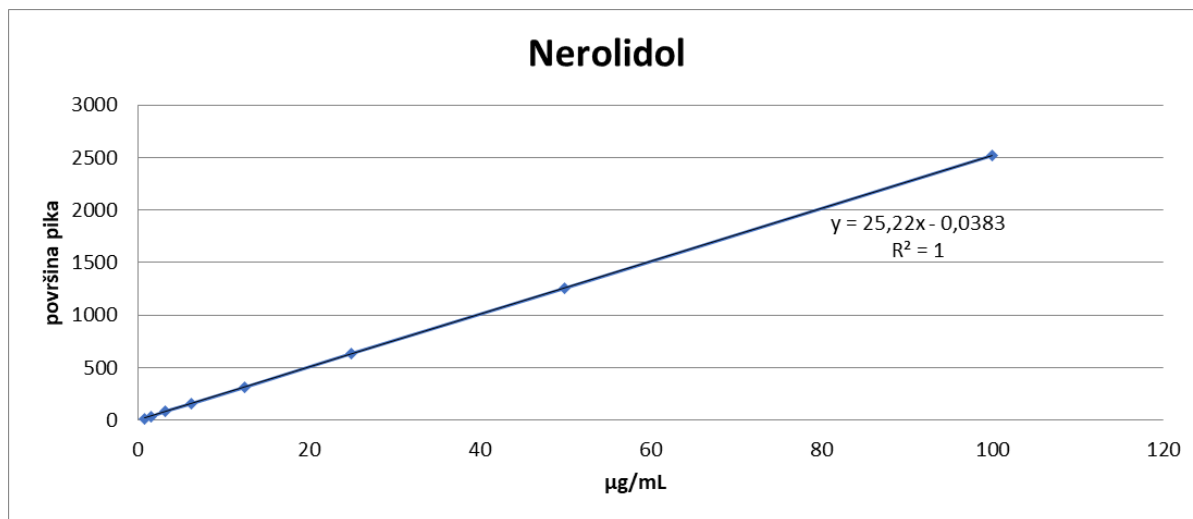


Slika 20. Kromatogram protoka bez injektiranja analita, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi navedenoj u poglavlju 4.4.1.2.



Slika 21. Kromatogram s injektiranih 2 μ L etanola (ekstrakcijsko otapalo), dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za nerolidol navedenoj u poglavlju 4.4.1.2.

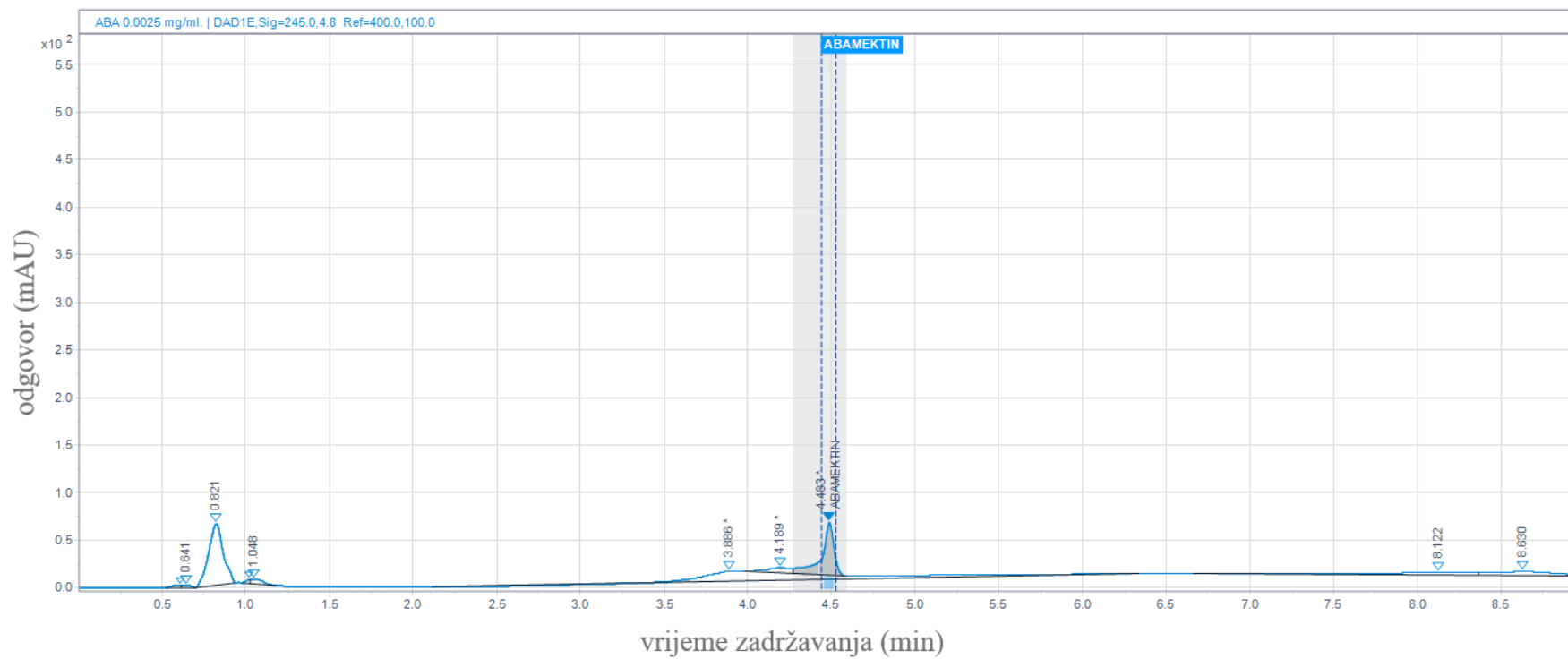
Standardni kalibracijski pravac za nerolidol (Slika 22.) je dobiven pripremom osam radnih otopina sljedećih koncentracija: 0,78; 1,53; 3,13; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 i 100,00 µg/mL odgovarajućim razrjeđivanjem temeljne standardne otopine.



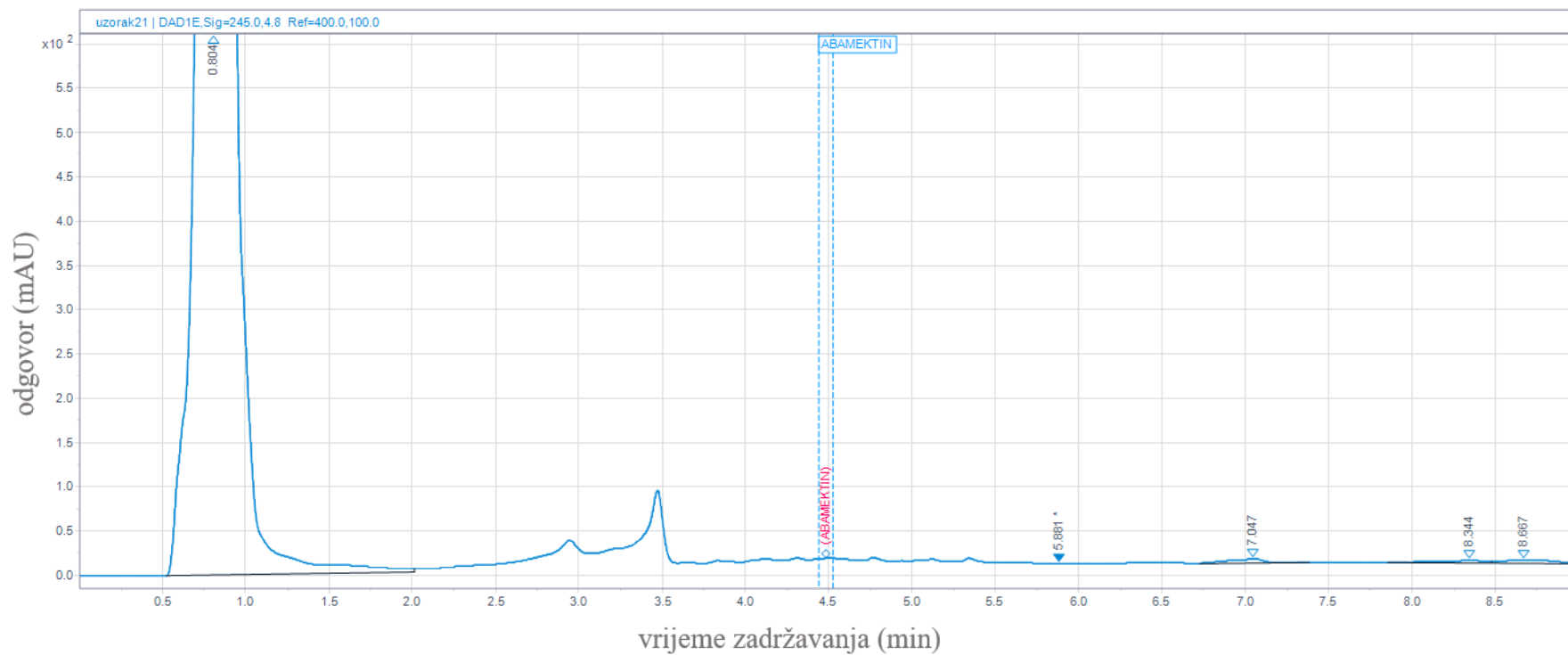
Slika 22. Linearni kalibracijski pravac dobiven UHPLC-UV-DAD metodom za određivanje nerolidola (poglavlje 4.4.1.2.).

4.4.2.3. Kalibracijski pravac abamektina

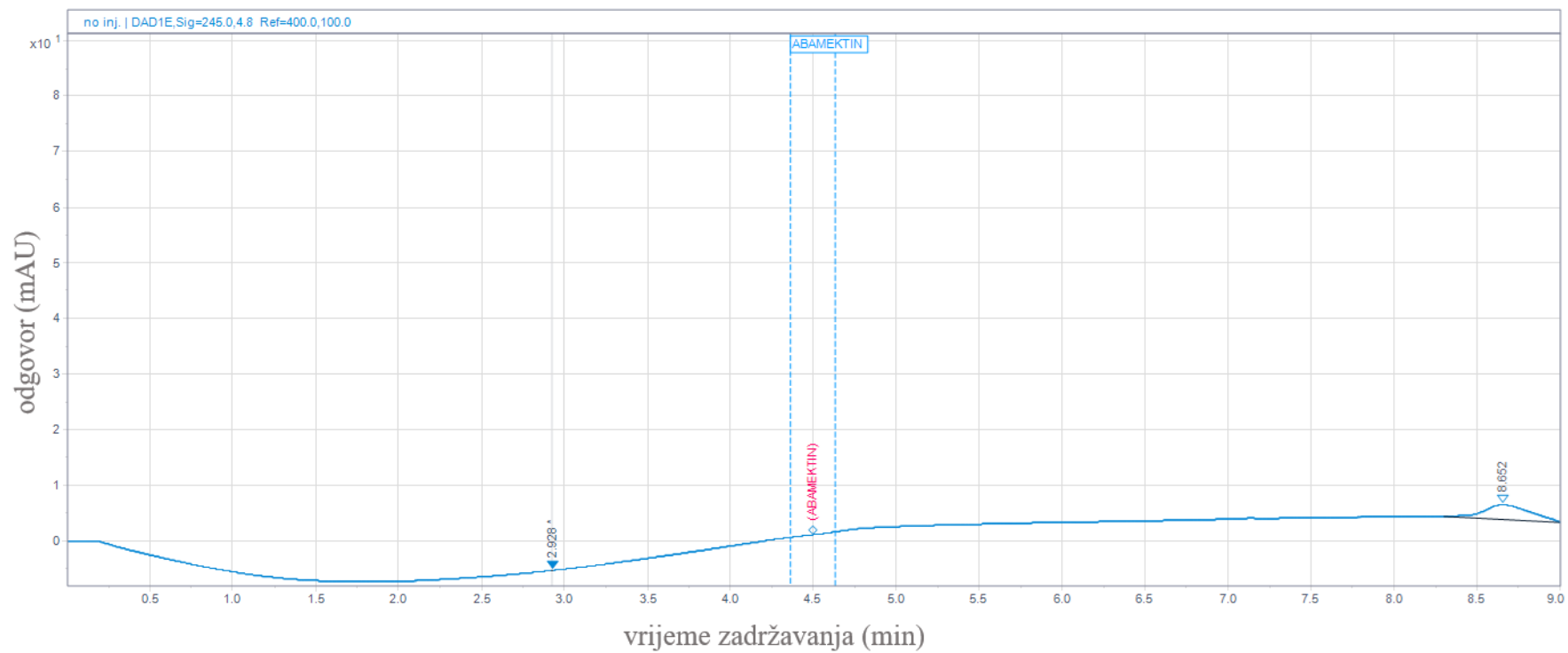
Prema metodi navedenoj u poglavlju 4.4.1.3. tehnikom tekućinske kromatografije ultra-visoke učinkovitosti na obrnutoj fazi s primjenom ultraljubičaste detekcije (UHPLC-UV-DAD) je prema dobivenim kromatogramima standardnih otopina (Slika 23.) određeno vrijeme zadržavanja abamektina na kromatografskoj koloni, $RT = 4,483$ min. Usporedno sa standardnim otopinama, primjenjujući iste kromatografske uvjete (poglavlje 4.4.1.) su analizirani kromatogrami uzoraka negativnih kontrola (Slika 24.), bez injektiranja analita (Slika 25.) i metanola kao ekstrakcijskog otapala (Slika 26.).



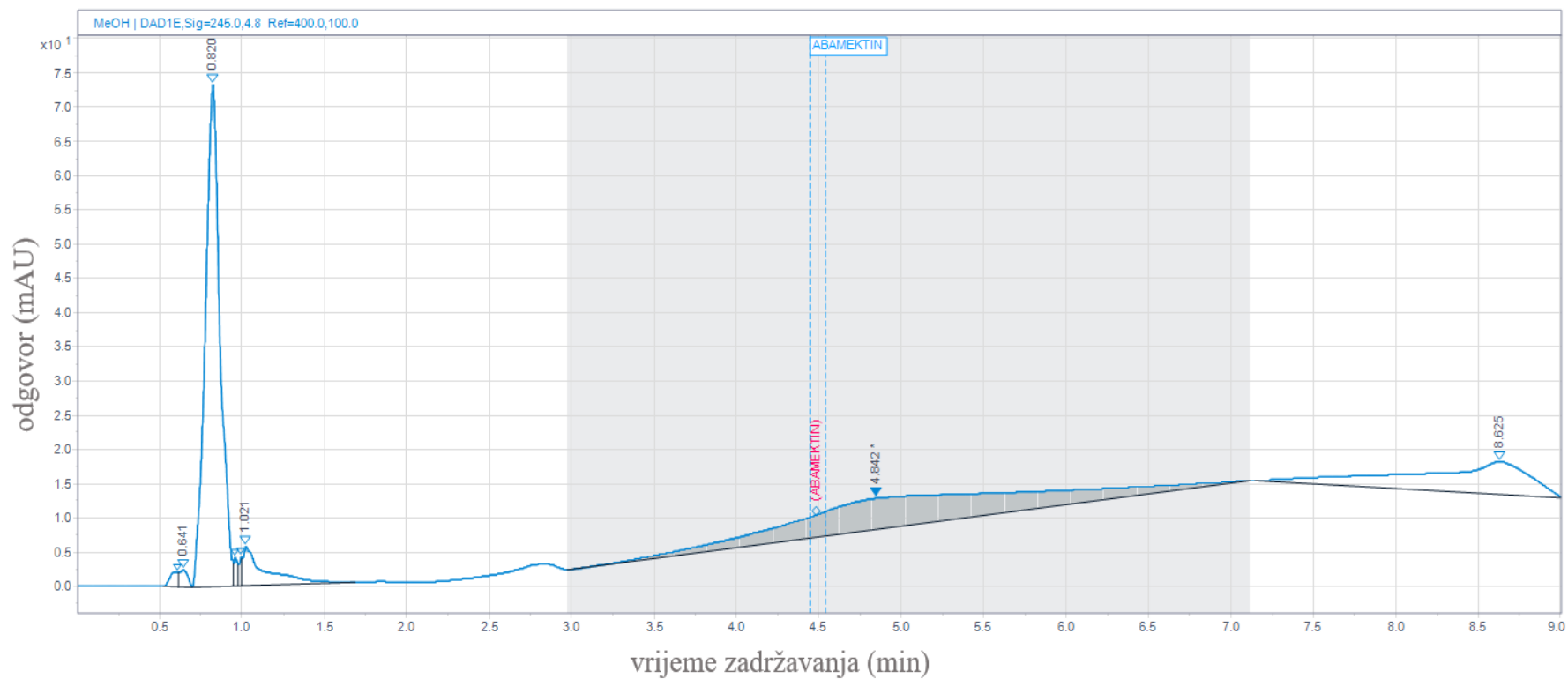
Slika 23. Kromatogram standardne otopine abamektina, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za abamektin navedenoj u poglavlju 4.4.1.3. (vrijeme zadržavanja farnesola, RT= 4,483 min).



Slika 24. Kromatogram uzorka negativne kontrole postavljene tijekom tretmana s abamektinom, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za abamektin navedenoj u poglavlju 4.4.1.3.

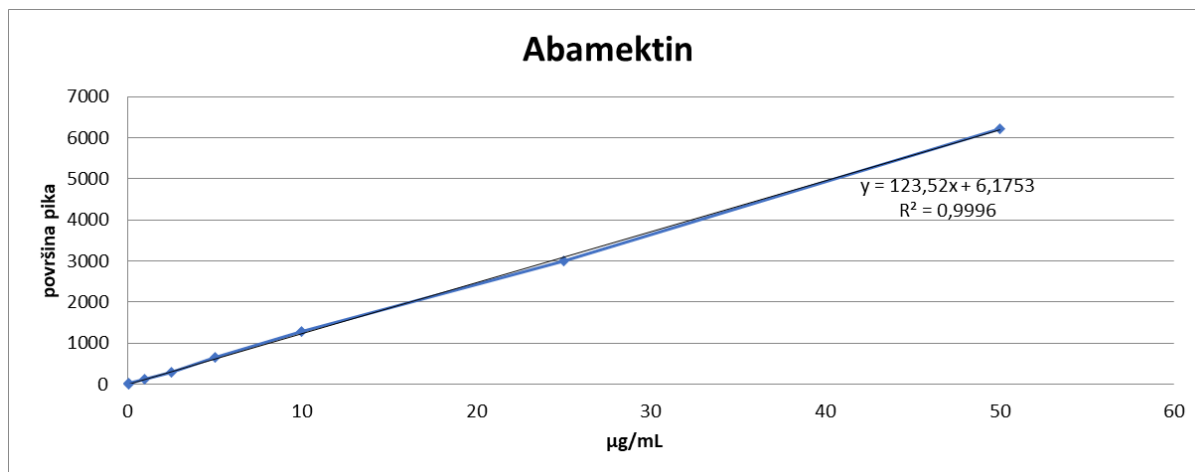


Slika 25. Kromatogram protoka bez injektiranja analita, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za abamektin navedenoj u poglavlju 4.4.1.3.



Slika 26. Kromatogram s injektiranih 2 μ L metanola (ekstrakcijsko otapalo), dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za abamektin navedenoj u poglavlju 4.4.1.3.

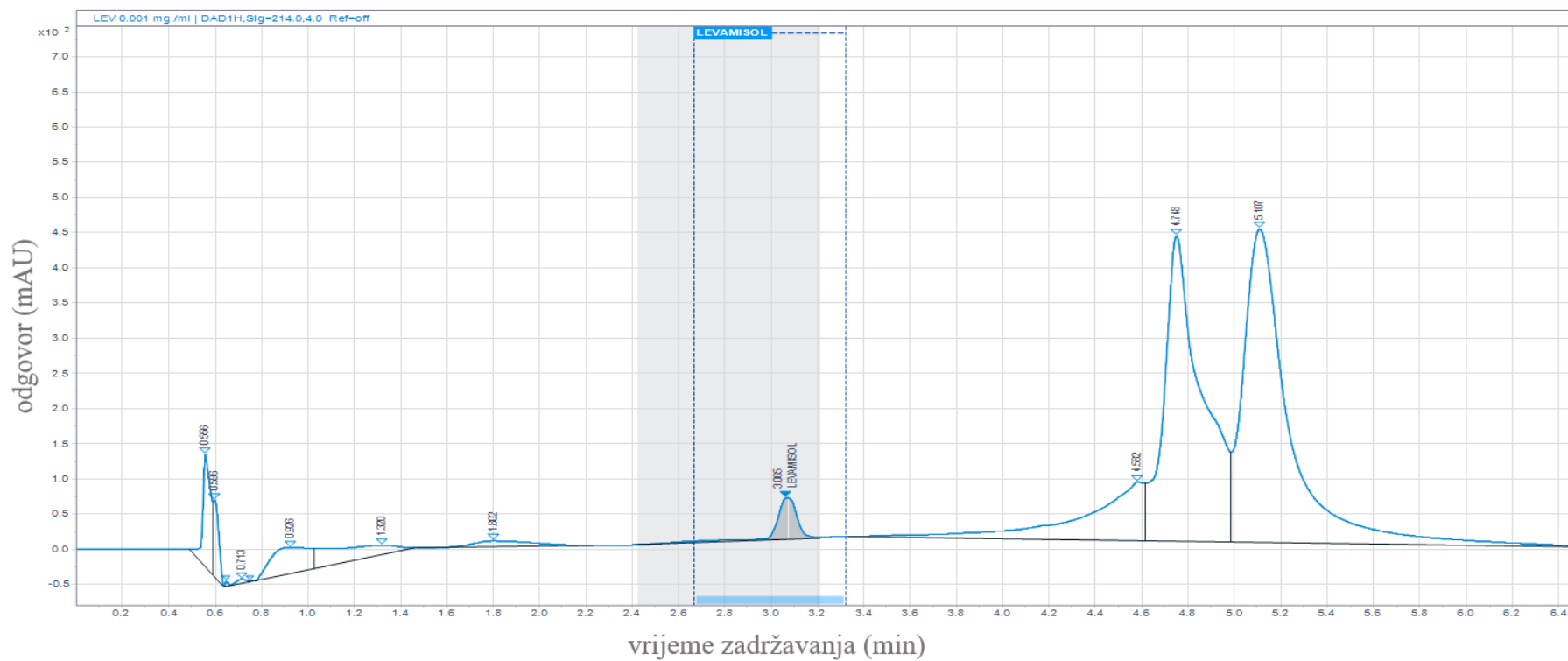
Standardni kalibracijski pravac za abamektin (Slika 27.) je dobiven pripremom osam radnih otopina sljedećih koncentracija: 0,05; 0,10; 1,00; 2,50; 5,00; 10,00; 25,00 i 50,00 µg/mL odgovarajućim razrjeđivanjem temeljne standardne otopine.



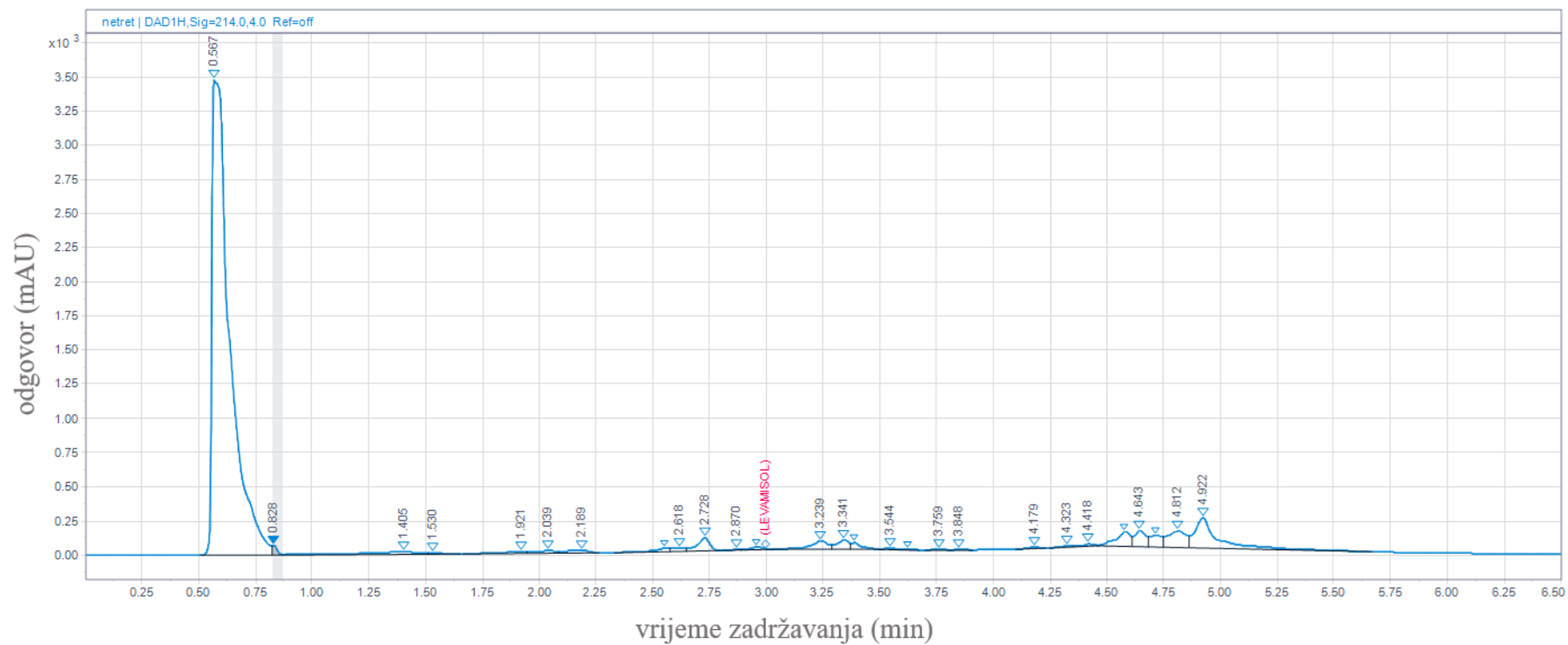
Slika 27. Linearni kalibracijski pravac dobiven UHPLC-UV-DAD metodom za određivanje abamektina (poglavlje 4.4.1.3.).

4.4.2.4. Kalibracijski pravac levamisola

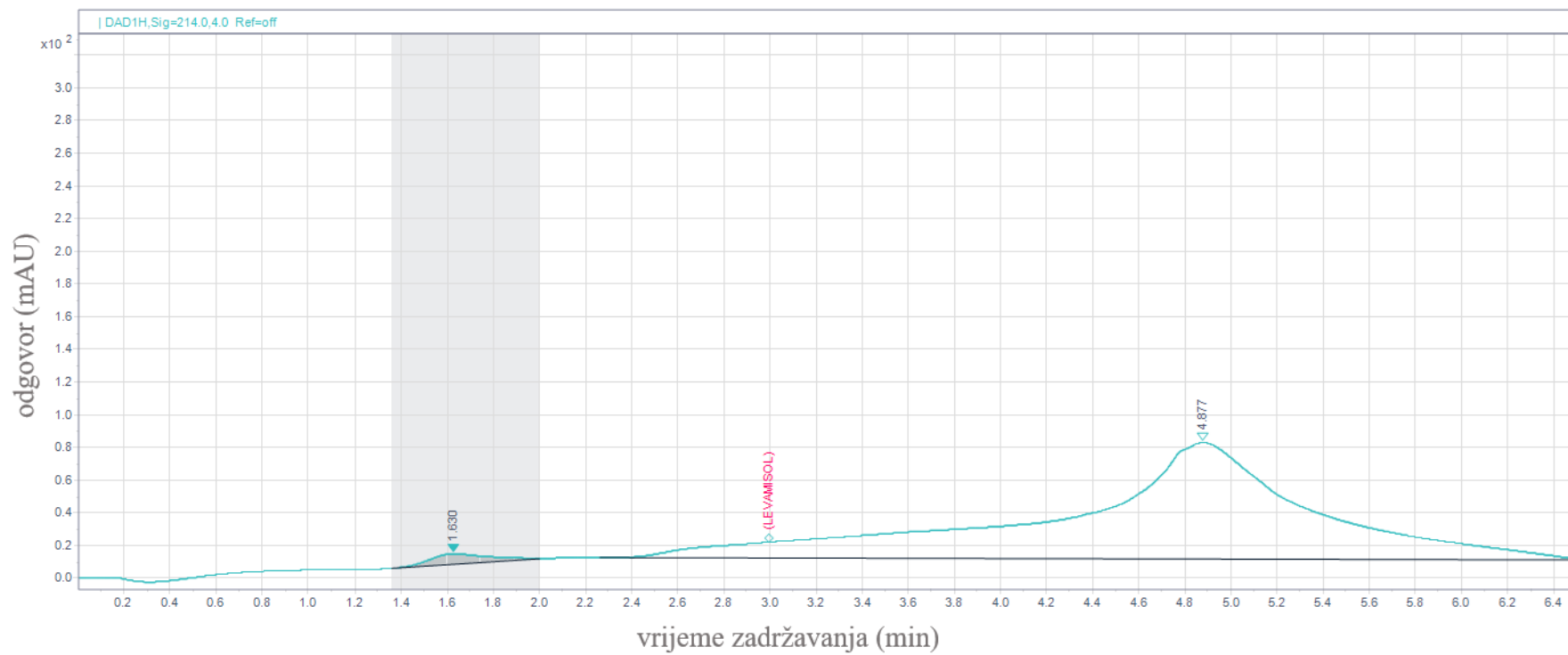
Prema metodi navedenoj u poglavlju 4.4.1.4. tehnikom tekućinske kromatografije ultra-visoke učinkovitosti na obrnutoj fazi s primjenom ultraljubičaste detekcije (UHPLC-UV-DAD) je prema dobivenim kromatogramima standardnih otopina (Slika 28.) određeno vrijeme zadržavanja levamisola na kromatografskoj koloni, $RT = 3,066$ min. Usporedno sa standardnim otopinama, primjenjujući iste kromatografske uvjete (poglavlje 4.4.1.) su analizirani kromatogrami uzoraka negativnih kontrola (Slika 29.), bez injektiranja analita (Slika 30.) i metanola kao ekstrakcijskog otapala (Slika 31.).



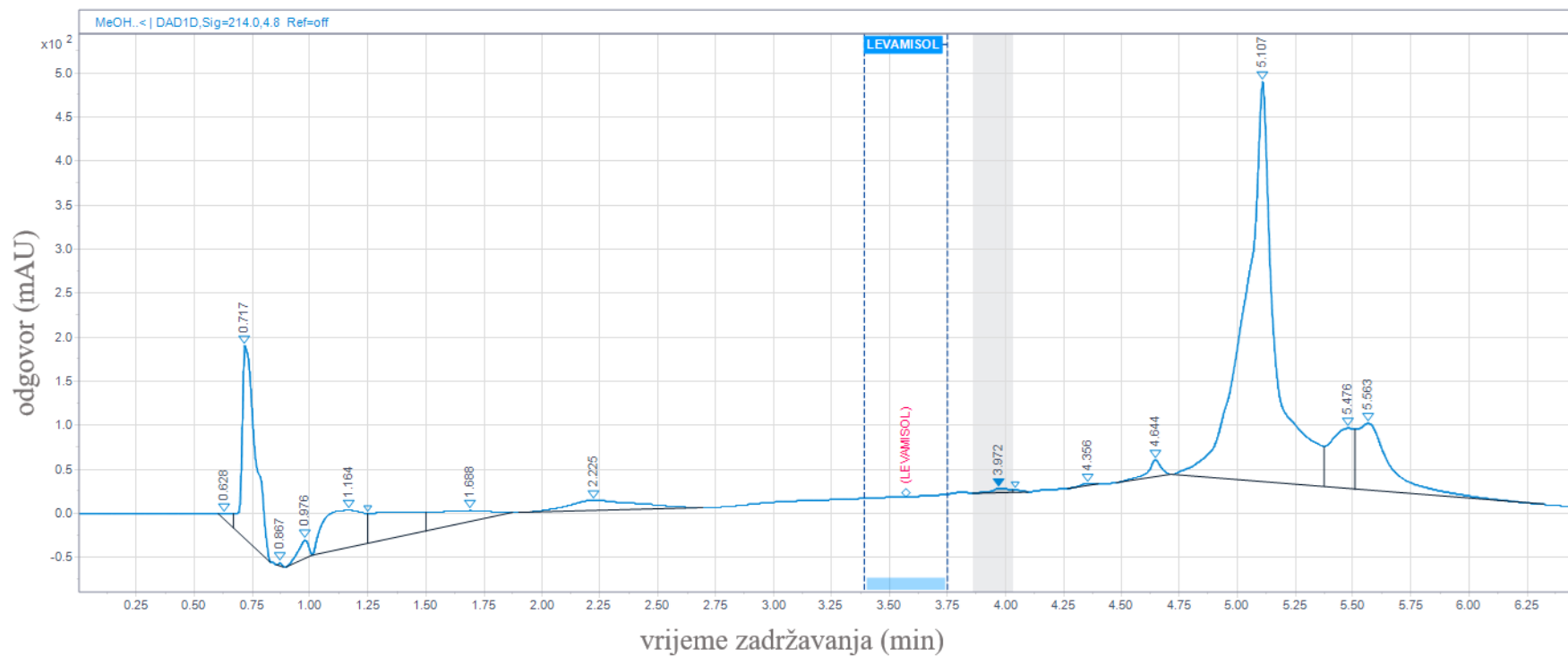
Slika 28. Kromatogram standardne otopine levamisola, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za levamisol navedenoj u poglavlju 4.4.1.4. (vrijeme zadržavanja farnesola, RT= 3,066 min).



Slika 29. Kromatogram uzorka negativne kontrole postavljene tijekom tretmana s levamisolom, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za levamisol navedenoj u poglavlju 4.4.1.4.

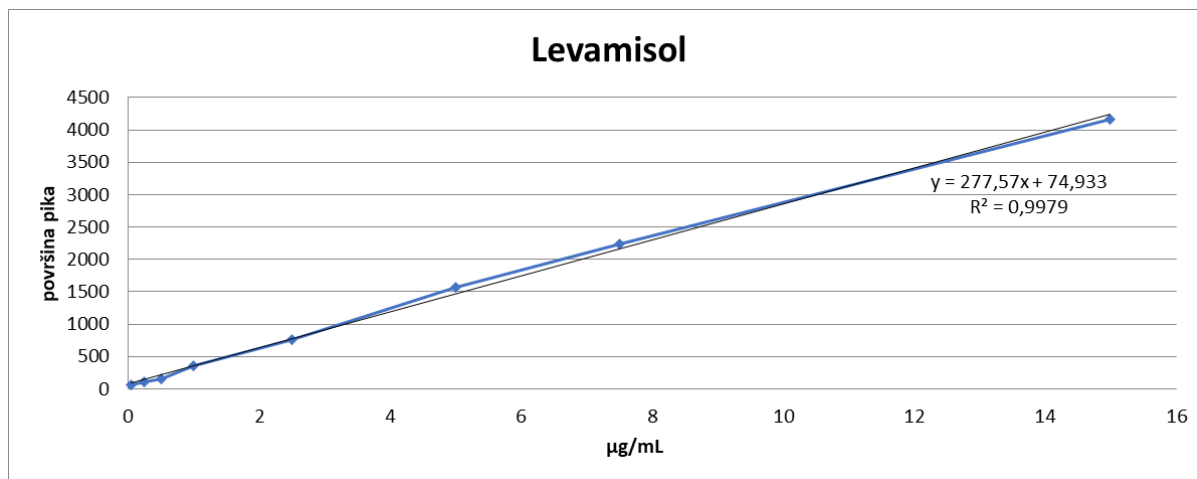


Slika 30. Kromatogram protoka bez injektiranja analita, dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za levamisol navedenoj u poglavlju 4.4.1.4.



Slika 31. Kromatogram s injektiranih 2 μ L metanola (ekstrakcijsko otapalo), dobiven UHPLC-UV-DAD tehnikom prema metodi za levamisol navedenoj u poglavlju 4.4.1.4.

Standardni kalibracijski pravac za levamisol (Slika 32.) je dobiven pripremom osam radnih otopina sljedećih koncentracija: 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50 i 15,00 µg/mL odgovarajućim razrjeđivanjem temeljne standardne otopine.



Slika 32. Linearni kalibracijski pravac dobiven UHPLC-UV-DAD metodom za određivanje levamisola (poglavlje 4.4.1.4.).

4.5. Određivanje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u stanicama *Anisakis* ličinki

Prisutnost reaktivnih kisikovih čestica (engl. *reactive oxygen species*, ROS) je metodom prema Kampkötter i sur. (2007) određena u homogeniziranim stanicama *Anisakis* L3 ličinki iz prethodnog eksperimenta u kojem su tretirane nerolidolom, farnesolom, abamektinom i levamisolom u prisustvu/odsustvu inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara. Po dvije ličinke (u triplikatu) iz navedenog eksperimenta uzorkovane nakon 2, 6, 12 i 18 sati izlaganja LC_a koncentracijama ispitivanih spojeva su isprane u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini s Tweenom 20 (PBST), te su prebačene u mikrotitarske pločice s 384 jažice u kojima se nalazio PBS i 250 µM 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCF-DA) i inkubirane 5 min pri 37 °C. H₂DCF-DA zbog svoje izražene hidrofobnosti lako prolazi staničnu membranu živih stanica. U citoplazmi je stanične esterase, odnosno unutarstanični kisikovi radikali (čestice) hidroliziraju u diklorofluorescein (DCFH) čiji se intenzitet fluorescencije mjeri (Ambudkar i sur., 1999), te je nakon navedene inkubacije spektrofotometrom (Varian Cary Eclipse;

Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) izmjeren intenzitet fluorescencije (pobuda (λ_{ex}) 485 nm; emisija (λ_{em}) 530 nm) nastalog produkta oksidacije DCF. Promjena fluorescencije tijekom vremena ukazuje na stvaranje reaktivnih kisikovih čestica, a njihova prisutnost u stanicama je dodatno dokazana na način da su dodatne jažice tretirane antioksidansom N-acetilcisteinom koji inhibira njihovo stvaranje, odrađeno prema standardiziranom protokolu (Cole i Deeley, 2006). Svi tretmani s pojedinačnim ispitivanim spojem u njegovoj LC_d koncentraciji su odrađeni u šest ponavljanja, a mjerenja su rađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao relativna fluorescencija (engl. *relative fluorescence*, RF) po masi (μ g) ukupnih proteina (engl. *total protein*, TP), RF/ μ g TP.

4.6. Kalcein (C-AM) test

Po deset netretiranih prethodno izvaganih *Anisakis* ličinki je postavljeno u svaku jažicu u koju je dodan po jedan od inhibitora, valspodar ili MK571, i inkubirano tijekom jednog sata pri 36 °C kako bi se omogućilo zasićenje ABC membranskih transportera. Uz ova dva seta s inhibitorima ABC transportera, napravljen je još jedan set sa samim ispitivanim spojevima bez prisustva inhibitora, i jedan dodatni set negativne kontrole, sve u duplikatima. U sva tri seta jažica (sa samim ispitivanim spojevima, ispitivanim spojevima s po jednim inhibitorom) je dodana LC_d koncentracija karakteristična za nerolidol, farnesol, abamektin i levamisol, te je nakon 2 sata u jažice dodan i acetometoksi kalcein (C-AM). Nakon inkubacije od 90 min, što je bilo dovoljno za djelovanje staničnih esteraza, ličinke su sakupljene, homogenizirane, ultrazvučno tretirane i centrifugirane pri 1.699 x g tijekom jedne minute. Pojedinom supernatantu je fluorimetrom na crnim pločicama s 96 jažica određena razina fluorescencije (pobuda (λ_{ex}) 485 nm; emisija (λ_{em}) 530 nm).

4.7. Imunohistokemijska (IHC) analiza strukturnih proteina tretiranih *Anisakis* ličinki

U svrhu procjene potencijalnog učinka ispitivanih spojeva na strukturne proteine *Anisakis* ličinki, žive ličinke su bile izložene monoklonskom antitijelu antitubulin-Cy3 za detekciju tubulina, boji Atto 488 Phalloidin za detekciju aktina, te boji 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) za bojanje stanične jezgre. Nakon 18 sati inkubacije pri 36 °C s ispitivanim

spojevima u prisutnosti i odsutnosti jednog od dva inhibitora ABC membranskih transportera, MK571 i valspodara, ličinke su fiksirane u hladnom 1 % paraformaldehidu u M9 mediju, te uronjene u smjesu suhog leda i 96 % etanola, a zatim odmrzavane u toploj vodi. Postupak je ponovljen uzastopno četiri puta kako bi se omogućilo potpuno prodiranje boje kroz kutikulu ličinke. Ličinke su u M9 mediju postavljene na stakalce za mikroskopiranje i promatrane konfokalnim mikroskopom TCS SP8 X (Leica). Postupak je izveden slijedeći protokol Finney i Ruvkun (1990) za bojanje antitijela vrste *Caenorhabditis elegans*.

4.8. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih podataka u ovoj disertaciji su korišteni odgovarajući statistički modeli odabrani na temelju Akaike-ovog informacijskog kriterija (engl. *Akaike information criteria*, AIC) i testa ispravnosti modeliranja (engl. *lack-of-fit test*). Inhibitori MK571 i valspodar su bili varijabla prema kojoj su grupirani podatci. Odabrani modeli su uspoređeni s osnovnim modelom koristeći F-test. Parametri modela i procijenjene letalne koncentracije (10 %, 50 % i 90 %) sa zadanim standardnim pogreškama i intervalima pouzdanosti (95 %) na temelju delta metode uspoređeni su s onima kontrolne skupine. Podaci su obrađeni nelinearnim regresijskim doza-odgovor modelima statističkog paketa drc (Ritz i sur., 2015) za programski jezik R (v3.3.1), s postavljenim donjim i gornjim granicama na 0 i 1 (jer je smrtnost u svim testovima dosegla 100 %). Model Weibull 2.2 je prilagođen podacima farnesola i nerolidola, a logistički model (LL.2) je prilagođen podacima abamektina i levamisola. Krivulje doza-odgovor s intervalima pouzdanosti od 95 % za *Anisakis* ličinke tretirane farnesolom i nerolidolom (s ili bez prisustva inhibitora ABC transportera MK571 (MRP inhibitor) ili valspodara (P-gp inhibitor) su dobivene koristeći Weibull 2.2 kao najprikladniji dvoparametarski model drc paketa za R, dok je log-logistički model s dva parametra (LL.2) odabran kao najprikladniji za podatke abamektina i levamisola koji su u tretmanima djelovali sami ili u kombinaciji s inhibitorima MK571 ili valspodarom. Koncentracije su ucrtane na \log_2 skali radi jasnijeg prikaza. Podaci svih kvantitativnih analiza su obrađeni i predloženi pomoću paketa ggplot2 (Wickham, 2009) i cowplot (Wilke, 2017) za programski jezik R.

Dobiveni podaci za reaktivne kisikove čestice su podvrgnuti Cochranovom testu i analizi varijance (ANOVA), nakon čega je primijenjen Student-Newman-Keulsov test (SNK), koristeći programski jezik STATISTICA (verzija 8.0, Statsoft Inc., SAD).

Pri obradi UHPLC-UV-DAD spektara korišten je programski paket Agilent OpenLab CDS version 2.5.

§ 5. REZULTATI

5.1. Određivanje toksičnosti ispitivanih spojeva nakon *in vitro* tretmana ličinki *Anisakis pegreffii*

In vitro testovi toksičnosti farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola za L3 ličinke oblića *Anisakis pegreffii* su rađeni s ciljem određivanja njihovih karakterističnih LC₅₀ i LC_d koncentracija.

5.1.1. Rezultati testova toksičnosti i LC₅₀ ispitivanih spojeva

U ovom dijelu *in vitro* eksperimenta su testovima toksičnosti određene letalne koncentracije (LC) prirodnih spojeva farnesola, nerolidola, te sintetičkih antihelmintika abamektina i levamisola za *Anisakis* L3 ličinke postupkom njihovog tretiranja navedenim ispitivanim spojevima u šest koncentracija. Koncentracije ispitivanih spojeva koje su djelovale na *Anisakis* ličinke u *in vitro* testovima toksičnosti sami, ili u kombinaciji s inhibitorima ABC transmembranskih transportera, MK571 (10 µM; MRP inhibitor) ili valspodara (5 µM; P-gp inhibitor), su bile sljedeće: farnesol (0,00; 22,26; 44,52; 89,05; 155,84; 222,62 i 356,20 µmol/L), nerolidol (0,00; 25,44; 50,88; 101,77; 178,10; 254,42; 356,20 µmol/L), abamektin (0,0; 0,0044; 0,0886; 0,3544; 0,7088; 1,4175; 5,6702 µmol/L) i levamisol (0,00; 0,0197; 0,0987; 0,4935; 2,4675; 12,3377; 61,6884 µmol/L).

Rezultat ovog *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti ispitivanih spojeva, odnosno testiranje preživljavanja ličinki, je prikazan kao postotak (%) uginuća ličinki nakon 24 sata tretmana. Prema doza-odgovor krivuljama određene su razine toksičnosti ispitivanih spojeva od 10 % (LC₁₀), 50 % (LC₅₀) i 90 % (LC₉₀), s intervalima pouzdanosti (engl. *confidence intervals*, CI) od 95 % (drc paket za programski jezik R (v3.3.1); Ritz i sur., 2015; Tablica 9.). Količine akumuliranih ispitivanih spojeva u tretiranim ličinkama su po završetku ovog LC *in vitro* eksperimenta određene UHPLC-UV-DAD metodom.

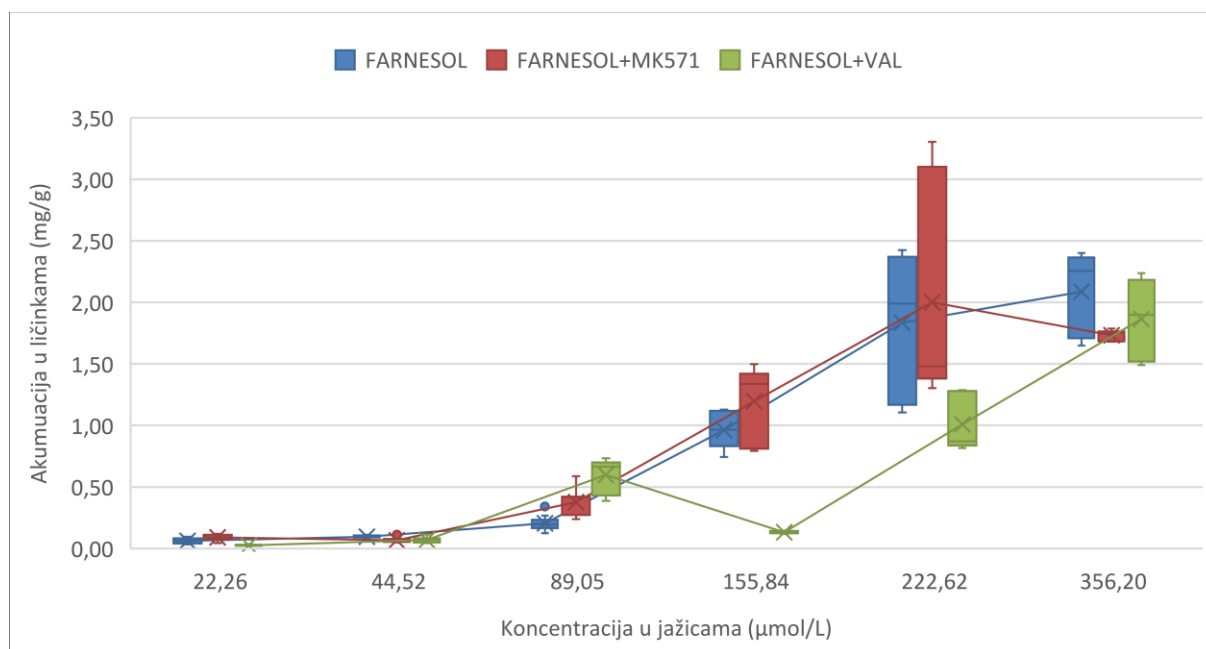
Tablica 9. Rezultati testova toksičnosti prirodnih spojeva farnesola i nerolidola, te sintetičkih antihelmintika abamektina i levamisola, nakon *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki ispitivanim spojevima u šest koncentracija (s/bez prisustva inhibitora ABC transportera, MK571 ili valspodara) s prikazanim LC₁₀, LC₅₀ i LC₉₀ koncentracijama (letalne koncentracije pri kojima ugiba 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki, N= 10/tretman) u µmol/L. Podaci su statistički obrađeni drc paketom za programski jezik R (v3.3.1); model Weibull 2.2 prilagođen je podacima farnesola i nerolidola, a log-logistički model (LL.2) prilagođen je podacima abamektina i levamisola. CI (engl. *confidence interval*), interval pouzdanosti je 95 %. Statistički značajne razlike između tretmana samim ispitivanim spojevima i tretmana u kombinaciji s inhibitorima su prikazane kao: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 i ****, p < 0,0001.

ISPITIVANI SPOJ/ INHIBITOR ABC TRANSPORTERA	PARAMETAR MODELA DOZA-ODGOVOR		RAZINA TOKSIČNOSTI		
	b (SE)	e (SE)	LC ₁₀ (95% CI)	LC ₅₀ (95% CI)	LC ₉₀ (95% CI)
FARNESOL					
(bez inhibitora)	3,79 (0,51)	148,10 (5,42)	81,7 (67,1–96,4)	134,4 (123,8–145,0)	184,6 (168,6–200,6)
MK571	3,17 (0,35)	102,16 (4,65)****	50,3 (41,0–59,5)**	91,1 (82,4– 99,7)****	132,9 (119,6– 146,2)****
valspodar	3,47 (0,42)	134,88 (5,23)	70,5 (57,8–83,1)	121,3 (111,3–131,4)	171,6 (156,1–187,0)
NEROLIDOL					
(bez inhibitora)	2,03 (0,19)	162,75 (8,66)	53,8 (40,3–67,3)	135,9 (120,0–151,8)	245,3 (217,9–272,7)
MK571	1,82 (0,18)	139,81 (8,27)	40,5 (29,1–51,9)	114,3 (99,7–128,8)	221,2 (191,0–251,4)
valspodar	1,53 (0,15)*	112,97 (7,47)****	26,0 (17,2–34,8)*	88,9 (75,8– 102,0)****	194,8 (166,0–223,5)*
ABAMEKTIN					
(bez inhibitora)	–0,91 (0,11)	0,30 (0,05)	0,03 (0,01–0,05)	0,30 (0,20–0,40)	3,36 (1,45–5,27)
MK571	–0,91 (0,11)	0,22 (0,04)	0,02 (0,01–0,03)	0,22 (0,15–0,29)	2,44 (1,13–3,75)
valspodar	–1,04 (0,12)	0,20 (0,03)	0,02 (0,01–0,04)	0,20 (0,13–0,26)	1,63 (0,88–2,39)
LEVAMISOL					
(bez inhibitora)	–1,32 (0,15)	0,84 (0,13)	0,16 (0,08–0,24)	0,84 (0,58–1,10)	4,41 (2,41–6,41)
MK571	–1,31 (0,15)	0,43 (0,06)**	0,08 (0,04–0,12)	0,43 (0,31–0,55)*	2,30 (1,22–3,38)
valspodar	–1,31 (0,14)	0,35 (0,05)***	0,06 (0,03–0,09)*	0,35 (0,24–0,45)**	1,85 (0,99–2,7)

5.1.1.1. Toksičnost farnesola na *Anisakis* L3 ličinke

Nakon 24 sata *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki sa šest koncentracija farnesola (u prisustvu/odsustvu inhibitora MK571 ili valsopodara), dobivene su letalne koncentracije pri kojima je ovaj ispitivani spoj uzrokovao smrtnost 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki (LC₁₀, LC₅₀ i LC₉₀; Tablica 9.). Farnesol je pokazao statistički značajno jače larvicidno djelovanje pri sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora MK571 (LC₅₀= 91,1 μmol/L) dok primjena inhibitora valsopodara uz ovaj ispitivani spoj nije izazvala statistički značajne promjene njegove toksičnosti (drc paket za R (v3.3.1); Weibull 2.2 model; interval pouzdanosti od 95 %).

Pri nižim koncentracijama, odnosno do izloženosti farnesolu od 22,26 μmol/L su zabilježene slične vrijednosti akumulacije ovog ispitivanog spoja u tkivu ličinki u prisustvu jednog od inhibitora ili bez njih koje su oscilirale oko srednje vrijednosti 0,18 mg/g, dok se s povećanjem koncentracije tretiranja na 155,84 μmol/L zabilježio pad razine akumulacije ovog spoja samo kada je djelovao u kombinaciji s inhibitorom valsopodarom. Nakon te vremenske točke koncentracije su nastavile linearno rasti od 0,13 do 1,86 mg/g. Najviše srednje vrijednosti akumulacije (2,09 mg/g) su zabilježene pri djelovanju samog farnesola u najvišoj koncentraciji (356,20 μmol/L) tretmana (Slika 33.).

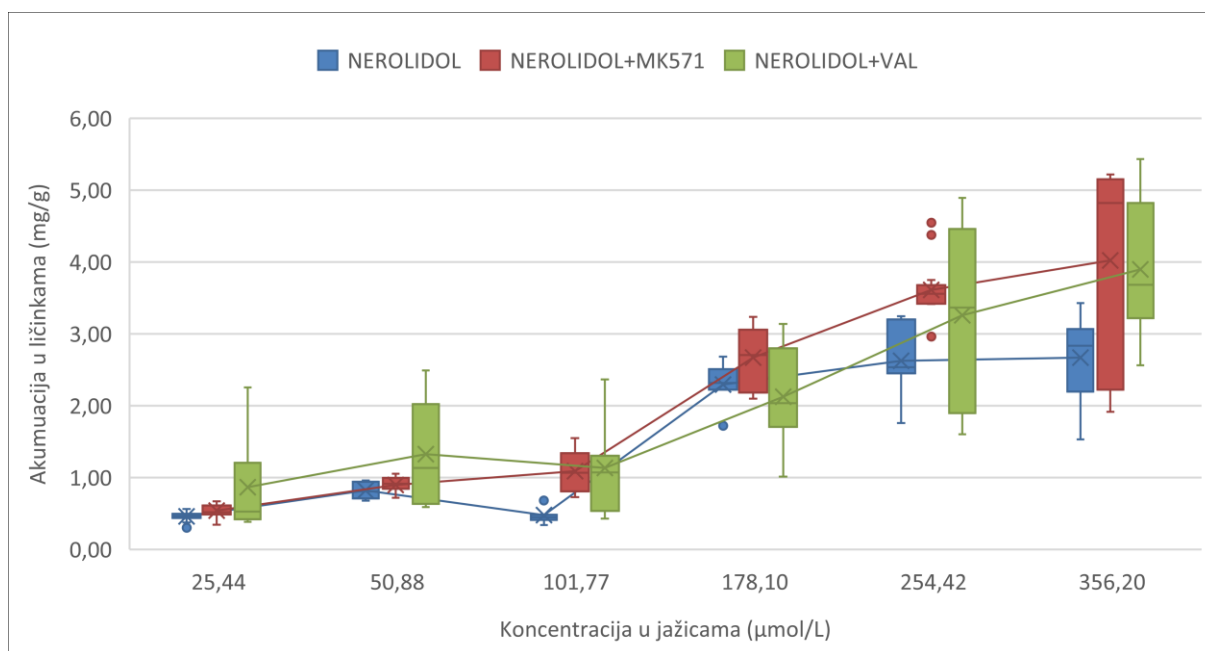


Slika 33. Rezultat *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti prirodnog spoja farnesola (u prisustvu/odsustvu inhibitora, MK571 ili valsopodara) u šest koncentracija (μmol/L) kojima su u jažicama tretirane *Anisakis* L3 ličinke, s prikazanim količinama akumuliranog farnesola

(mg/g) po gramu tkiva ličinki nakon 24 sata tretmana izmjerenih UHPLC-UV-DAD metodom. Unutar pravokutnika su označeni medijani (-); srednje vrijednosti (X), te najniže i najviše vrijednosti koncentracija akumulacije (-).

5.1.1.2. Toksičnost nerolidola na *Anisakis* L3 ličinke

Nakon 24 sata *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki sa šest koncentracija nerolidola (u prisustvu/odsustvu inhibitora MK571 ili valspodara), dobivene su letalne koncentracije pri kojima je ovaj ispitivani spoj uzrokovao smrtnost 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki (Tablica 9.). Nerolidol je pokazao statistički značajno jače larvicidno djelovanje pri sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora valspodara ($LC_{50} = 88,92 \mu\text{mol/L}$) dok primjena inhibitora MK571 uz ovaj ispitivani spoj nije izazvala statistički značajnije promjene njegove toksičnosti (drc paket za R (v3.3.1); Weibull 2.2 model; interval pouzdanosti od 95 %). Pri nižim koncentracijama izloženosti nerolidolu (25,44 do 101,77 $\mu\text{mol/L}$) su vrijednosti akumulacije u tkivima ličinki u sve tri kombinacije tretmana oscilirale oko srednje vrijednosti 0,85 mg/g, a zabilježena je povišena akumulacija ovog ispitivanog spoja u tkivu ličinki u prisustvu inhibitora valspodara. Daljnjim povećanjem koncentracije povećavao se i utjecaj inhibitora MK571, te je najviša srednja vrijednost akumulacije u ličinkama (4,02 mg/g) zabilježena pri djelovanju nerolidola u najvišoj koncentraciji (356,20 $\mu\text{mol/L}$) u kombinaciji s ovim inhibitorom. Najviša pojedinačna vrijednost (5,43 mg/g) je zabilježena pri djelovanju nerolidola u najvišoj koncentraciji (356,20 $\mu\text{mol/L}$) u kombinaciji s valspodarom. Akumulacija u tkivima ličinki u tretmanu najvišom koncentracijom samim nerolidolom je imala srednju vrijednost 2,67 mg/g, odnosno u tretmanu nerolidolom u kombinaciji s valspodarom je ta vrijednost bila 3,90 mg/g (Slika 34.).



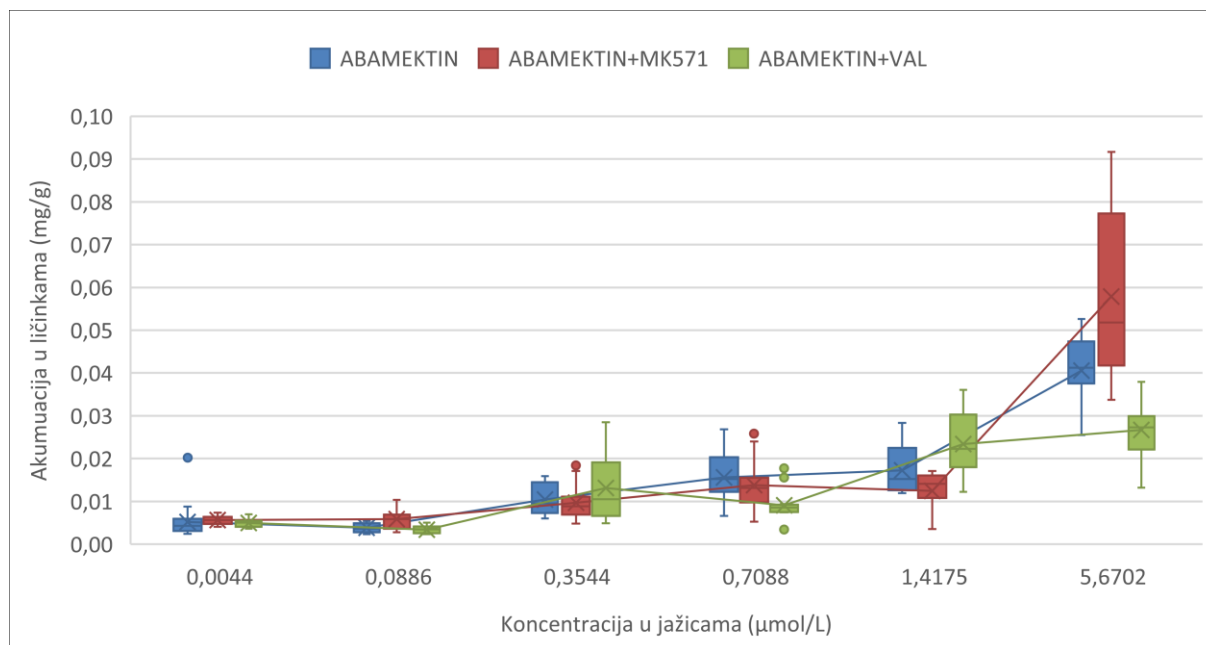
Slika 34. Rezultat *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti prirodnog spoja nerolidola (u prisustvu/odsustvu inhibitora, MK571 ili valspodara) u šest koncentracija ($\mu\text{mol/L}$) kojima su u jažicama tretirane *Anisakis* L3 ličinke, s prikazanim količinama akumuliranog nerolidola (mg/g) po gramu tkiva ličinki nakon 24 sata tretmana izmjerenih UHPLC-UV-DAD metodom. Unutar pravokutnika su označeni medijani (-); srednje vrijednosti (X), te najniže i najviše vrijednosti koncentracija akumulacije (-).

5.1.1.3. Toksičnost abamektina na *Anisakis* L3 ličinke

Nakon 24 sata *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki sa šest koncentracija abamektina (u prisustvu/odsustvu inhibitora MK571 ili valspodara), dobivene su letalne koncentracije pri kojima je ovaj ispitivani spoj uzrokovao smrtnost 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki (Tablica 9.). Kod ličinki tretiranih abamektinom nije primijećena statistički značajna razlika u toksičnosti (drc paket za R (v3.3.1); log-logistički model (LL.2); interval pouzdanosti od 95 %) pri tretmanima samim ispitivanim spojem i u prisustvu po jednog od dva inhibitora, što je vidljivo iz blago izraženijeg larvicidnog djelovanja kroz sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora, valspodara ($\text{LC}_{50} = 0,20 \mu\text{mol/L}$) i MK571 ($\text{LC}_{50} = 0,22 \mu\text{mol/L}$), nego kada je djelovao sam ($\text{LC}_{50} = 0,30 \mu\text{mol/L}$).

Tijekom tretmana abamektinom bez i s jednim od inhibitora, valspodara ili MK571, razine akumulacije su pokazivale slične vrijednosti koje su kontinuirano rasle s porastom koncentracija u tretmanima. Pri najvišoj koncentraciji, odnosno izloženosti abamektinu od

5,6702 $\mu\text{mol/L}$, najviša zabilježena pojedinačna vrijednost akumulacije ovog ispitivanog spoja u tkivu ličinki je bila ona u tretmanu s MK571 inhibitorom (0,092 mg/g), kao i najviša srednja vrijednost (0,058 mg/g) što potvrđuje najizraženiji rastući trend (Slika 35.).

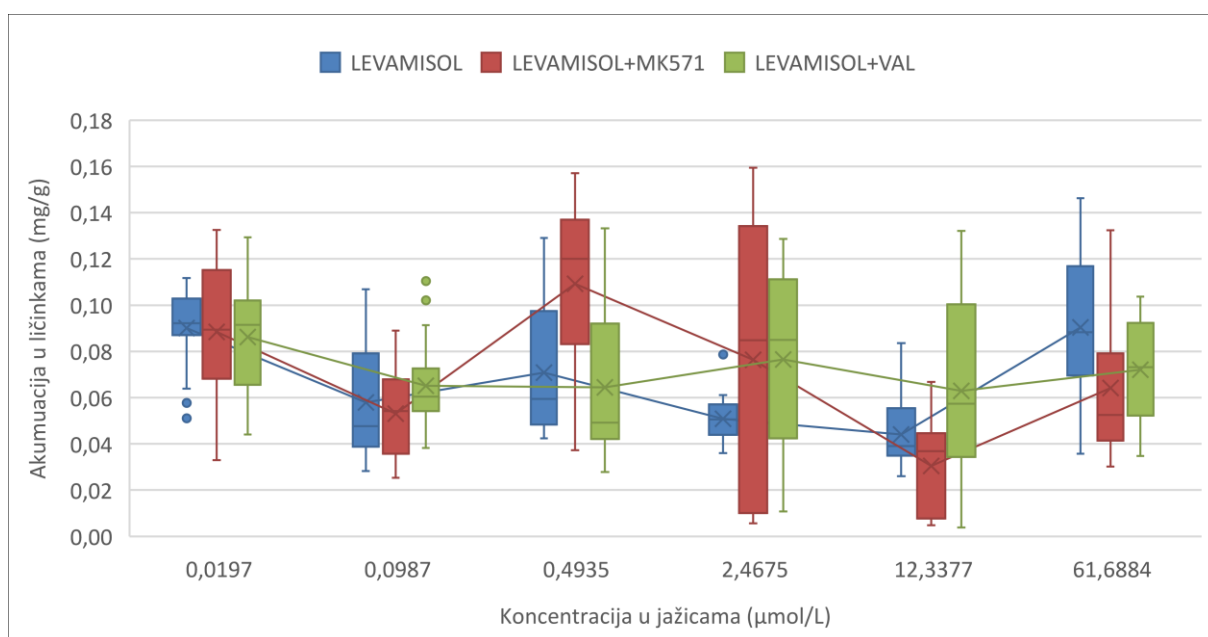


Slika 35. Rezultat *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti abamektina (u prisustvu/odsustvu inhibitora, MK571 ili valsopodara) u šest koncentracija ($\mu\text{mol/L}$) kojima su u jažicama tretirane *Anisakis* L3 ličinke, s prikazanim količinama akumuliranog abamektina (mg/g) po gramu tkiva ličinki nakon 24 sata tretmana izmjerenih UHPLC-UV-DAD metodom. Unutar pravokutnika su označeni medijani (-); srednje vrijednosti (X), te najniže i najviše vrijednosti koncentracija akumulacije (-).

5.1.1.4. Toksičnost levamisola na *Anisakis* L3 ličinke

Nakon 24 sata *in vitro* tretmana *Anisakis* L3 ličinki sa šest koncentracija levamisola (u prisustvu/odsustvu inhibitora MK571 ili valsopodara), dobivene su letalne koncentracije pri kojima je ovaj ispitivani spoj uzrokovao smrtnost 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki (Tablica 9.). Prisustvo pojedinih inhibitora uz levamisol je pokazao sličan larvicidni učinak, valsopodara ($\text{LC}_{50} = 0,35 \mu\text{mol/L}$) i MK571 ($\text{LC}_{50} = 0,43 \mu\text{mol/L}$), koji je bio statistički značajno veći (drc paket za R (v3.3.1); log-logistički model (LL.2); interval pouzdanosti od 95 %) od onog u tretmanu samim ispitivanim spojem.

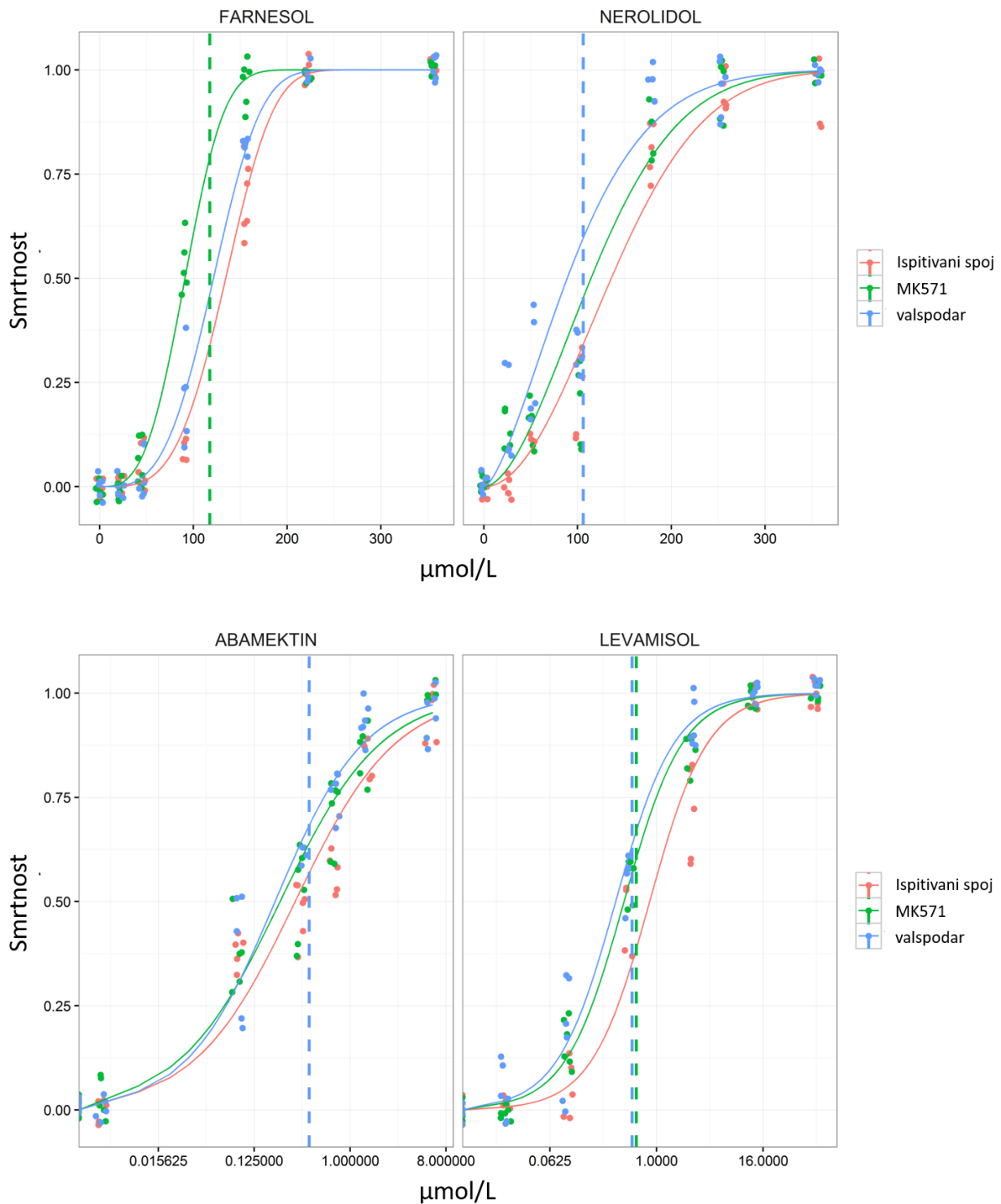
Tijekom tretmana levamisolom razine akumulacije u tkivu ličinki su oscilirale oko sličnih srednjih vrijednosti, koja je u tretmanu ovim samim ispitivanim spojem iznosila 0,0678 mg/g, dok je u kombinaciji s MK571 ta vrijednost bila 0,0703 mg/g, a srednja vrijednost razine akumulacije levamisola u kombinaciji s valsopodarom je iznosila 0,0712 mg/g. Najviša srednja vrijednost akumulacije od 0,109 mg/g i pojedinačna vrijednost akumulacije od 0,1594 mg/g su zabilježene u tretmanu levamisola i MK571 pri koncentracijama 0,4935 $\mu\text{mol/L}$ i 2,4675 $\mu\text{mol/L}$. S porastom koncentracije levamisola u jažicama, pri 12,3377 $\mu\text{mol/L}$ razina akumulacije u tkivima ličinki u svim tretmanima se smanjuje i oscilira oko srednje vrijednosti 0,0458 mg/g, dok je pri 61,6884 $\mu\text{mol/L}$ ta srednja vrijednost iznosila 0,0756 mg/g (Slika 36.).



Slika 36. Rezultat *in vitro* eksperimenta testiranja toksičnosti levamisola (u prisustvu/odsustvu inhibitora, MK571 ili valsopodara) u šest koncentracija ($\mu\text{mol/L}$) kojima su u jažicama tretirane *Anisakis* L3 ličinke, s prikazanim količinama akumuliranog levamisola ($\mu\text{g/g}$) po gramu tkiva ličinki nakon 24 sata tretmana izmjerenih UHPLC-UV-DAD metodom. Unutar pravokutnika su označeni medijani (-); srednje vrijednosti (X), te najniže i najviše vrijednosti koncentracija akumulacije (-).

5.1.2. Ovisnost djelovanja ABC inhibitora (MK571 i valspodara) o vremenu izloženosti ispitivanim spojevima

U LC_{50} *in vitro* eksperimentu su određene letalne koncentracije farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola za *Anisakis* L3 ličinke tretanima samim ispitivanim spojem u šest različitih koncentracija ili u kombinaciji s po jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 (MRP inhibitor) ili valspodara (P-gp inhibitor). Koncentracije farnesola, nerolidola, abamektina i levamisola pri kojima, nakon 24 sata *in vitro* tretmana *Anisakis pegreffii* L3 ličinki, inhibicija određenog transportera jednim ispitivanim inhibitorom izaziva statistički značajno veći larvicidni učinak (s intervalom pouzdanosti od 95 %) u odnosu na tretman s drugim ispitivanim inhibitorom ili u odnosu na tretman ispitivanim spojem u odsustvu obaju inhibitora su označene LC_d . Temeljem krivulje doza-odgovor (Slika 37.) su dobivene sljedeće vrijednosti LC_d koncentracija ispitivanih spojeva: farnesol 117,5 $\mu\text{mol/L}$, nerolidol 106 $\mu\text{mol/L}$, abamektin 0,41 $\mu\text{mol/L}$ i levamisol 0,56 $\mu\text{mol/L}$.



Slika 37. Krivulje doza-odgovor (koncentracije na log₂ skali; intervali pouzdanosti (CI) su 95 %) za *Anisakis* L3 ličinke tretirane 24 h pri 36 °C s: a) prirodnim spojevima, farnesolom i nerolidolom, u odsustvu/prisustvu jednog od ABC inhibitora, MK571 ili valsopodara (dvoparametarski Weibull 2.2 model drc paketa za R); b) sintetičkim antihelminticima, abamektinom i levamisolom u odsustvu/prisustvu jednog od ABC inhibitora, MK571 ili

valspodara (dvoparametarski log-logistički model drc paketa za R). Isprekidane okomite linije označavaju LC_d (koncentraciju pri kojoj je vidljiva najveća razlika u larvicidnom učinku ispitivanog spoja uz dominantni inhibitor), označene su bojom dominantnog inhibitora.

Tablica 10. Predviđena smrtnost *Anisakis* ličinki pri karakterističnim LC_d za prirodne spojeve farnesol i nerolidol, te sintetičke antihelmintike abamektin i levamisol tijekom 24 sata *in vitro* tretmana. Vrijednosti smrtnosti dobivene djelovanjem ABC inhibitora koji statistički značajno utječe na toksičnost ispitivanog spoja su označene podebljanim slovima; rasponi vrijednosti su navedeni u zagradama.

ISPITIVANI SPOJ/ INHIBITOR ABC TRANSPORTERA	PREDVIĐENA SMRTNOST PRI LC _d (95% CI)
FARNESOL+	
(bez inhibitora)	0,34 (0,24 – 0,44)
MK571	0,79 (0,69 – 0,88)
valspodar	0,46 (0,36 – 0,56)
NEROLIDOL+	
(bez inhibitora)	0,34 (0,26 – 0,42)
MK571	0,45 (0,37 – 0,53)
valspodar	0,60 (0,52 – 0,67)
ABAMEKTIN+	
(bez inhibitora)	0,57 (0,50 – 0,64)
MK571	0,64 (0,57 – 0,71)
valspodar	0,68 (0,61 – 0,75)
LEVAMISOL+	
(bez inhibitora)	0,37 (0,27 – 0,47)
MK571	0,59 (0,49 – 0,68)
valspodar	0,65 (0,56 – 0,75)

Iz krivulje doza-odgovor (Slika 37.) su određene vrijednosti predviđene smrtnosti (Tablica 10.) *Anisakis* ličinki pri karakterističnim LC_d koncentracijama prirodnih spojeva farnesola i nerolidola, te sintetičkih antihelmintika abamektina i levamisola tijekom 24 sata *in vitro* tretmana. Najviše vrijednosti smrtnosti pri ovim koncentracijama su određene za ličinke tretirane nerolidolom u kombinaciji s valspodarom (0,60), farnesolom (0,79) i levamisolom (0,65) u kombinaciji s MK571, te je nešto viša vrijednost određena za ličinke tretirane

abamektinom u kombinaciji s valspodarom (0,68) nego što je određena kada je djelovao u kombinaciji s MK571 (0,64).

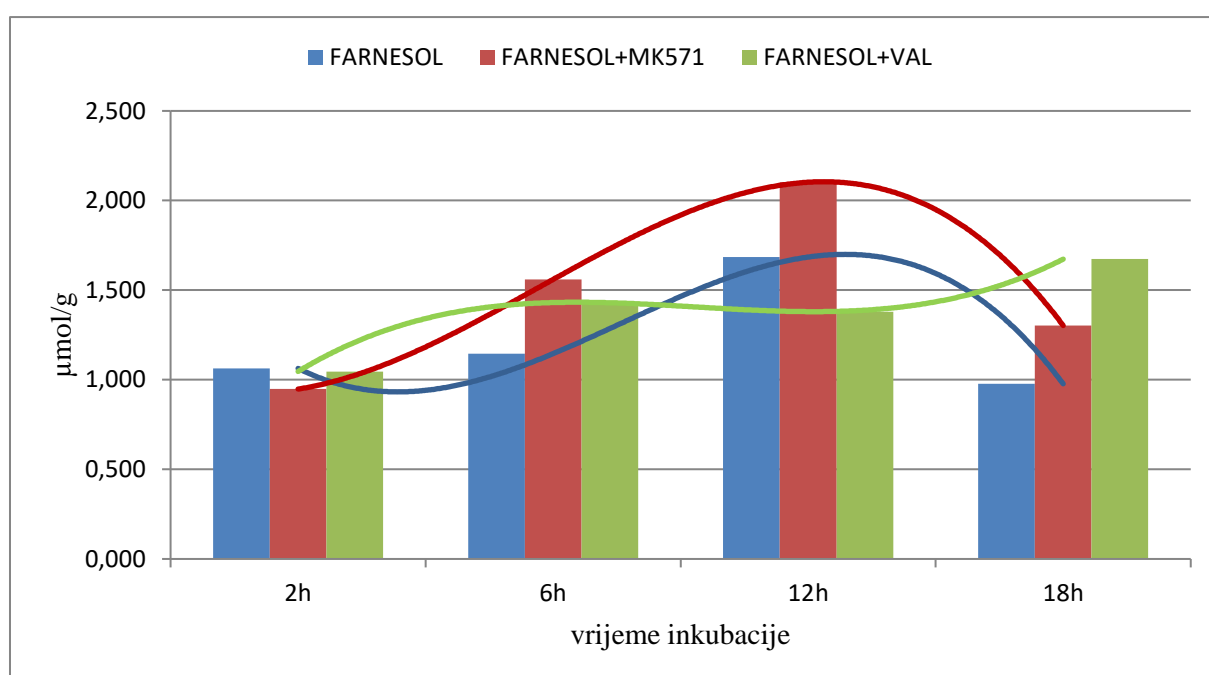
Tablica 11. Srednje vrijednosti koncentracija ($\mu\text{mol/g}$) i iskorištenje (engl. *recovery*, r; %) ispitivanih prirodnih spojeva nerolidola i farnesola, te sintetičkih antihelmintika abamektina i levamisola u tkivima *Anisakis* ličinki tretiranih u prisustvu/odsustvu ABC inhibitora MK571 i valspodara nakon 2 do 18 sati tretmana, analizirano metodom tekućinske kromatografije (UHPLC-UV-DAD).

ISPITIVANI SPOJ	2 h		6 h		12 h		18 h	
	$\mu\text{mol/g}$	r %	$\mu\text{mol/g}$	r %	$\mu\text{mol/g}$	r %	$\mu\text{mol/g}$	r %
Farnesol	1,064	1,467	1,145	1,494	1,685	1,494	0,977	1,956
Farnesol+MK571	0,948	1,875	1,560	1,908	2,102	1,886	1,302	2,365
Farnesol+valspodar	1,046	1,831	1,431	1,840	1,380	1,829	1,673	2,134
Nerolidol	1,944	3,570	2,005	3,680	2,027	3,250	3,814	6,150
Nerolidol+MK571	2,356	2,536	2,005	4,140	2,863	2,830	3,520	6,290
Nerolidol+valspodar	1,285	2,880	1,643	3,190	2,331	3,500	4,960	6,960
Abamektin	0,005	2,960	0,005	3,910	0,014	7,373	0,010	6,276
Abamektin+MK571	0,006	7,486	0,003	2,902	0,020	15,030	0,011	8,419
Abamektin+valspodar	0,003	2,778	0,004	3,898	0,016	7,325	0,011	9,022
Levamisol	0,010	6,900	0,033	12,562	0,038	11,594	0,027	25,731
Levamisol+MK571	0,002	2,703	0,001	18,160	0,017	17,147	0,045	33,826
Levamisol+valspodar	0,001	1,062	0,001	1,081	0,065	11,289	0,066	32,017

5.1.2.1. Ovisnost toksičnosti farnesola o vremenu izloženosti na *Anisakis* L3 ličinke

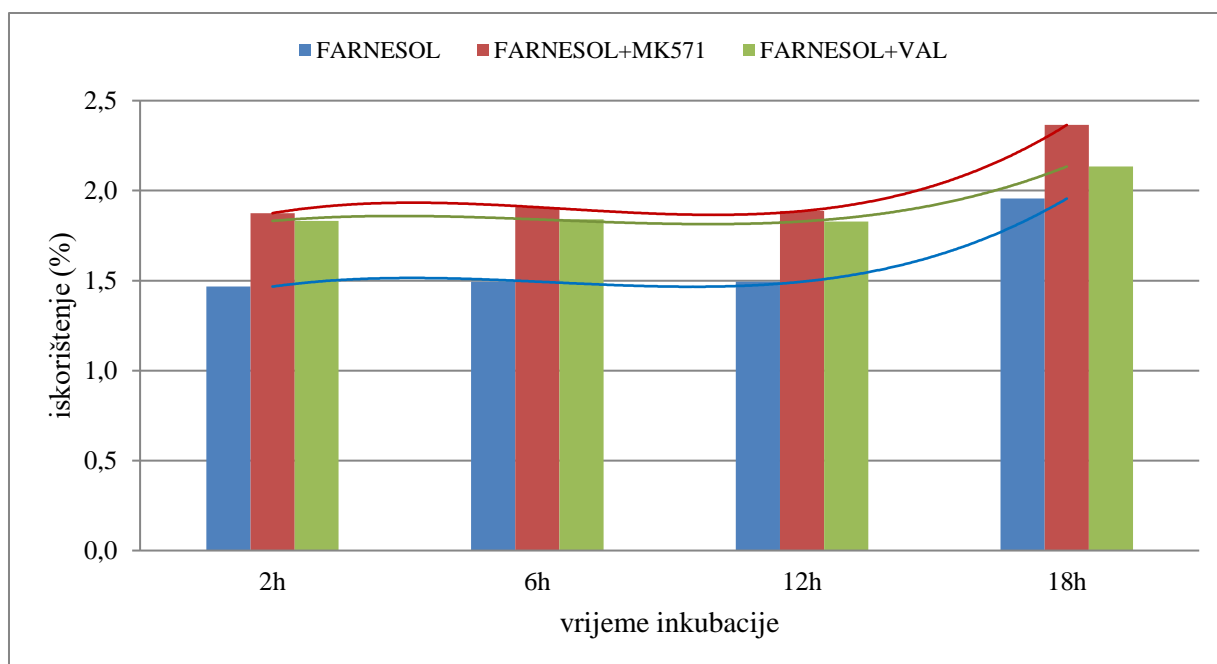
U ekstraktima farnesolom tretiranih *Anisakis* L3 ličinki, metodom tekućinske kromatografije (UHPLC-UV-DAD) izmjerene koncentracije (Tablica 11.) su pokazale porast vrijednosti (Slika 38.) kroz prve tri vremenske točke tretmana sa samim ispitivanim spojem, kao i u ekstraktima tretiranim farnesolom u kombinaciji s MK571, dok je u zadnjoj vremenskoj točki zabilježen značajan pad ovih vrijednosti. Uzorci u kojima je valspodar korišten kao

inhibitor su gledajući sve vremenske točke inkubacije pokazali slične srednje vrijednosti koncentracija (1,383 $\mu\text{mol/g}$; u rasponu od 1,046 do 1,637 $\mu\text{mol/g}$) u usporedbi s onima gdje je ispitivani spoj djelovao sam (1,218 $\mu\text{mol/g}$), dok uzorci tretirani s MK571 kao inhibitorom pokazali tek nešto više srednje vrijednosti koncentracija (1,478 $\mu\text{mol/g}$). Tijekom eksperimenta su koncentracije farnesola u kombinaciji s MK571 linearno rasle, te su najvišu srednju vrijednost dozele nakon 12 sati tretmana (2,102 $\mu\text{mol/g}$), da bi se nakon toga spustile na 1,302 $\mu\text{mol/g}$. Nakon 18 sati tretmana je bio vidljiv pad koncentracija u uzorcima tretiranim samim farnesolom (0,977 $\mu\text{mol/g}$) i u onima gdje je djelovao u kombinaciji s MK571 (1,302 $\mu\text{mol/g}$), dok taj izraženi pad koncentracije nije uočen u uzorcima farnesola s valspodarom.



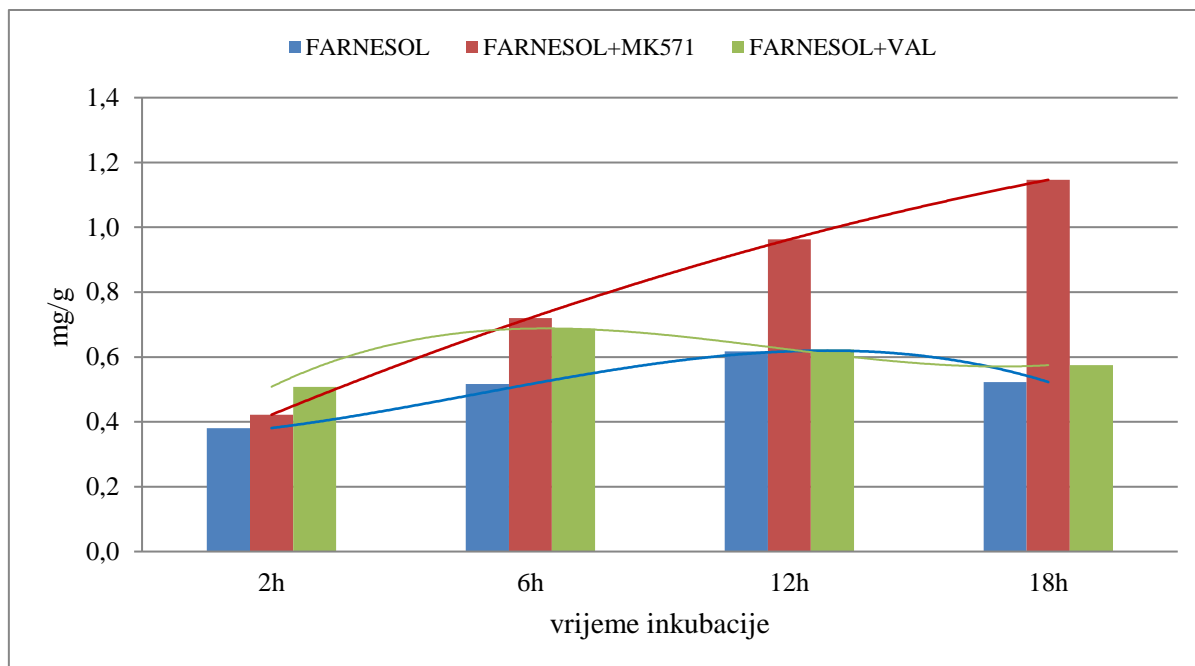
Slika 38. Koncentracije ($\mu\text{mol/g}$) prirodnog spoja farnesola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transporterata, MK571 i valspodara.

Srednja vrijednost iskorištenja (engl. *recovery*, r; %) farnesola je varirala oko 1,840 % u svim ekstrahiranim uzorcima i u svim vremenskim točkama inkubacije uzimajući u obzir samo ovaj ispitivani spoj (Slika 39.), dok je pri sve tri kombinacije tretmana dosegla najviše vrijednosti nakon 18 sati tretmana: sam farnesol 1,956 %, farnesol s MK571 2,365 % i farnesol s valspodarom 2,134 %.



Slika 39. Iskorištenje (r; %) prirodnog spoja farnesola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

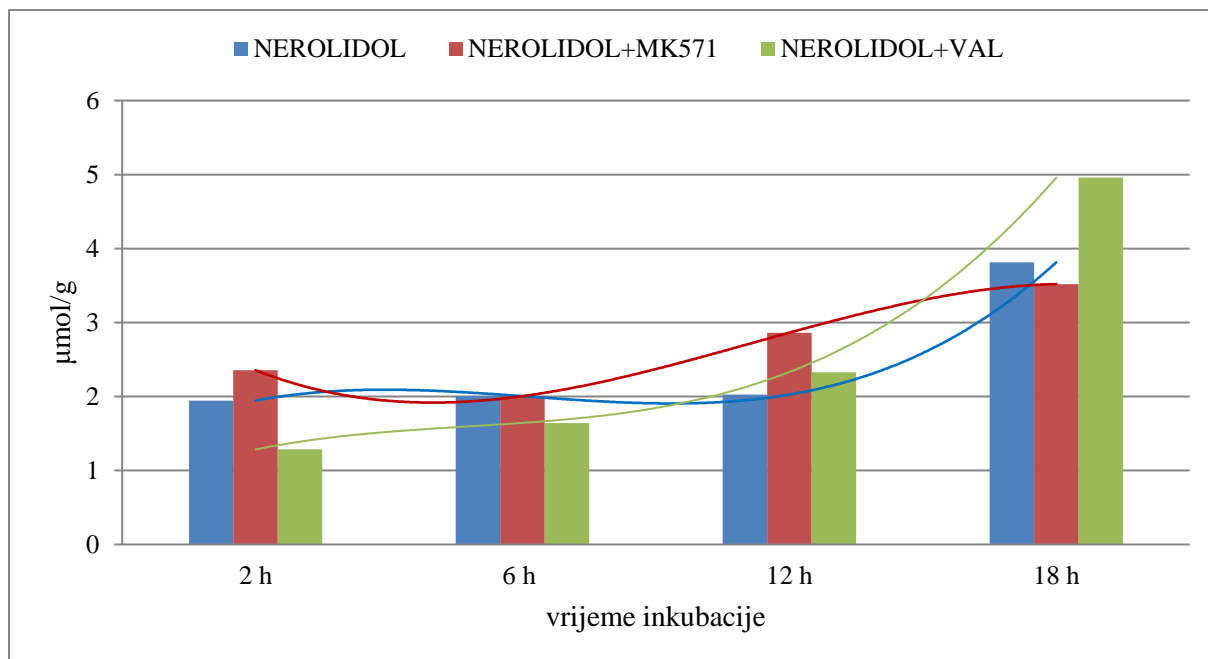
Na svim vremenskim točkama inkubacije su uzorci tretirani samo s farnesolom i oni tretirani s farnesolom u kombinaciji s valspodarom pokazali relativno učestale vrijednosti masenih udjela (mg farnesola na g tkiva ličinki; Slika 40.) koje su varirale oko srednje vrijednosti od 0,510 mg/g u uzorcima tretiranim samim farnesolom i 0,599 mg/g u uzorcima tretiranim u kombinaciji s valspodarom. Uzorci tretirani ovim spojem uz dodatak inhibitora MK571 su pokazali kontinuirani porast vrijednosti masenih udjela kroz sve vremenske točke inkubacije, u rasponu od 0,422 mg/g do 1,146 mg/g na kraju tretmana, što je dvostruko više od vrijednosti dobivenih za uzorke tretirane samo farnesolom i onih tretiranih kombinacijom farnesola i valspodara u ovoj vremenskoj točki.



Slika 40. Maseni udjeli (mg/g) prirodnog spoja farnesola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

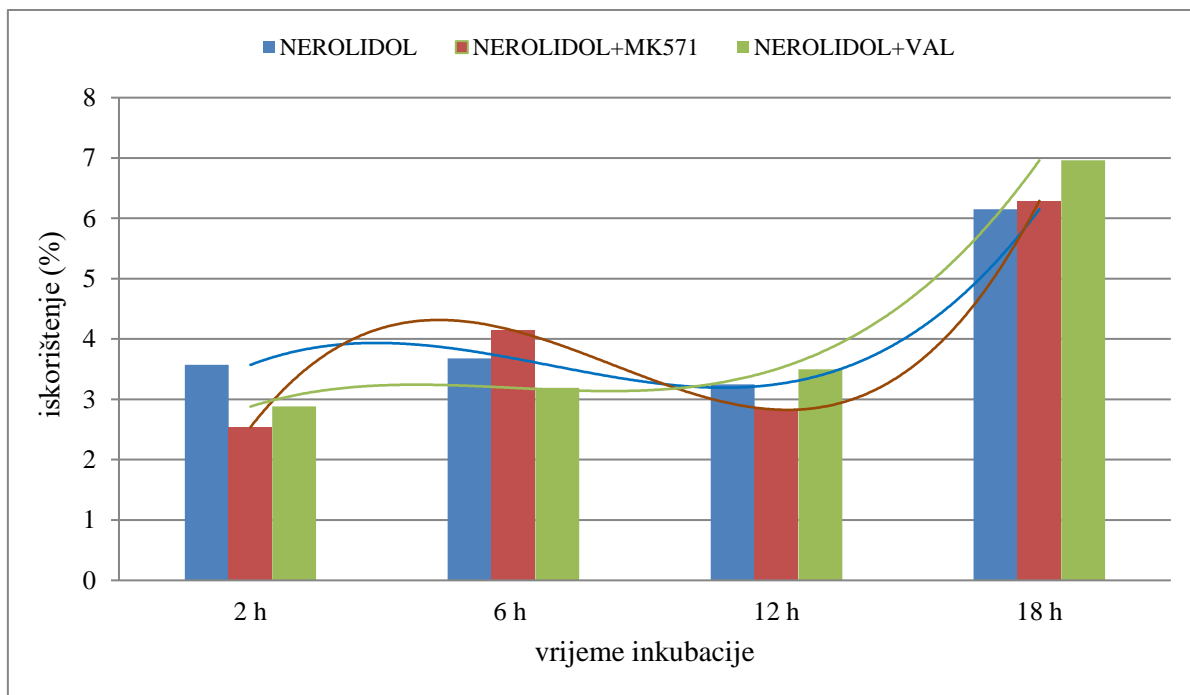
5.1.2.2. Ovisnost toksičnosti nerolidola o vremenu izloženosti na *Anisakis* L3 ličinke

Analiza tekućinskom kromatografijom je pokazala da su tijekom prvih 12 sati inkubacije samo nerolidolom (Slika 41.), uzorci tkiva tretiranih *Anisakis* ličinki pokazali blagi porast razine koncentracija ovog ispitivanog spoja do 12 sati tretmana (srednja vrijednost prve tri vremenske točke 1,992 $\mu\text{mol/g}$), slično kao i uzorci tretirani s dodatkom inhibitora (MK571 ili valspodara), ali s nešto povišenim srednjim vrijednostima u uzorcima tretiranim s dodatkom MK571 (2,408 $\mu\text{mol/g}$). Utvrđeno je da je nerolidol prisutan u svim uzorcima u povišenim koncentracijama nakon 18 sati izloženosti, ali s najvišom srednjom vrijednosti od 4,960 $\mu\text{mol/g}$ u uzorcima s djelovanjem valspodara.



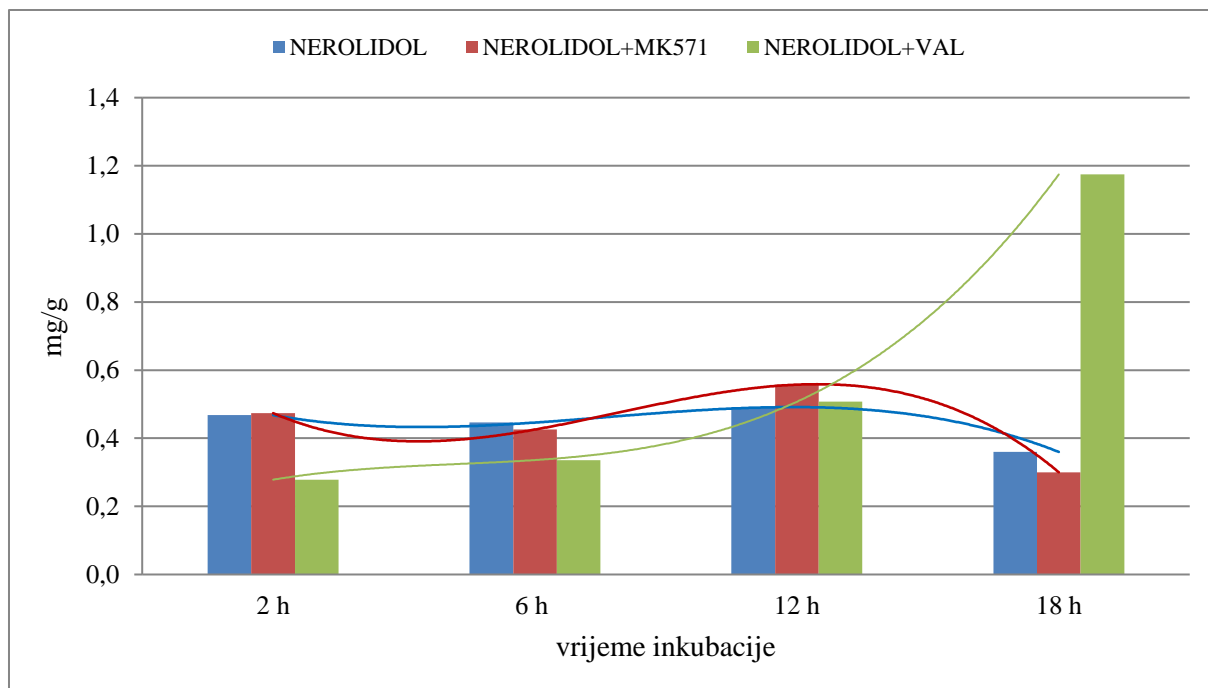
Slika 41. Koncentracije ($\mu\text{mol/g}$) prirodnog spoja nerolidola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

Tijekom 12 sati *in vitro* tretmana *Anisakis* ličinki, kod uzoraka tretiranih samim nerolidolom u njegovoj karakterističnoj LC_{50} koncentraciji i onih koji su tretirani tim ispitivanim spojem u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC membranskih transportera, MK571 ili valspodara, nisu primijećene značajne razlike u iskorištenju (r) ispitivanih spojeva u tkivima ličinki (Tablica 11., Slika 42.). Srednja vrijednost iskorištenja nerolidola u sve tri kombinacije i u svim vremenskim točkama do 12 sati inkubacije je bila 3,286 %, da bi dosegla dvostruko višu srednju vrijednost 18 sati nakon izlaganja nerolidolu u kombinaciji s valspodarom (6,47 %).



Slika 42. Iskorištenje (r; %) prirodnog spoja nerolidola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

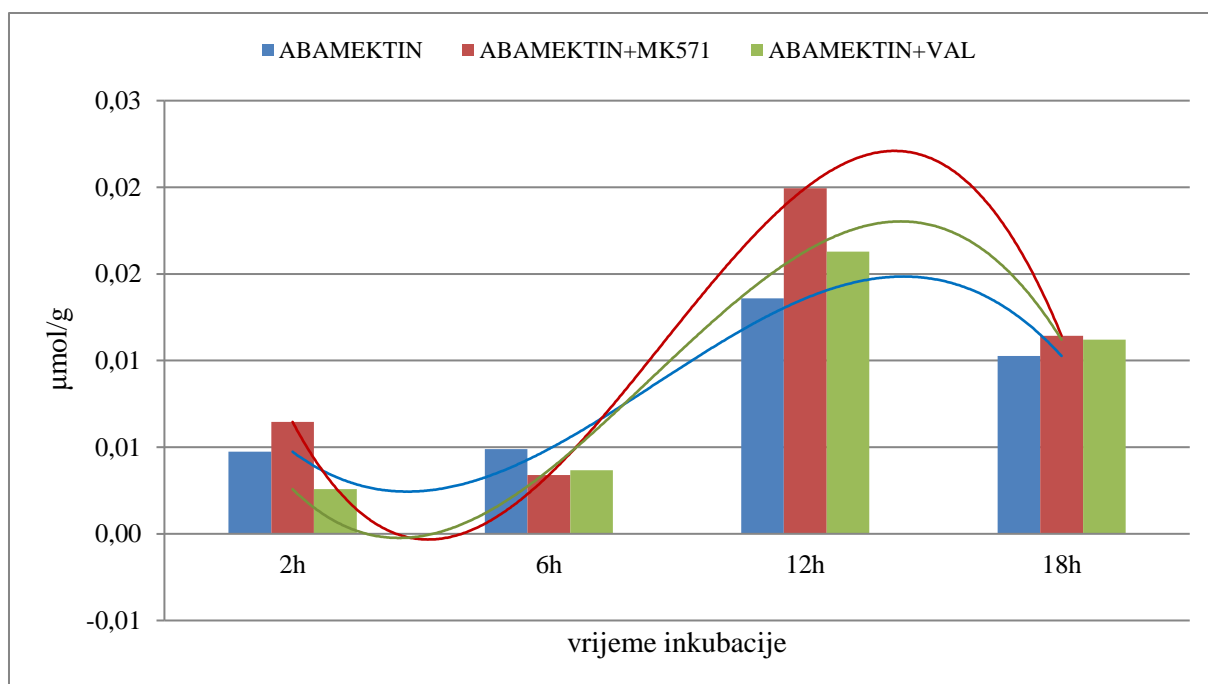
Računajući u masenim udjelima (Slika 43.), u mg nerolidola po g tkiva *Anisakis* ličinke, ličinke tretirane nerolidolom u kombinaciji s valspodarom nakon relativno malih promjena vrijednosti tijekom prve tri točke tretmana su u 18-om satu pokazale četverostruko više vrijednosti (srednja vrijednost 1,175 mg/g) ovog ispitivanog spoja od uzoraka tretiranih samim nerolidolom (srednja vrijednost 0,360 mg/g) ili u kombinaciji s MK571 (srednja vrijednost 0,300 mg/g).



Slika 43. Maseni udjeli (mg/g) prirodnog spoja nerolidola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valsopodara.

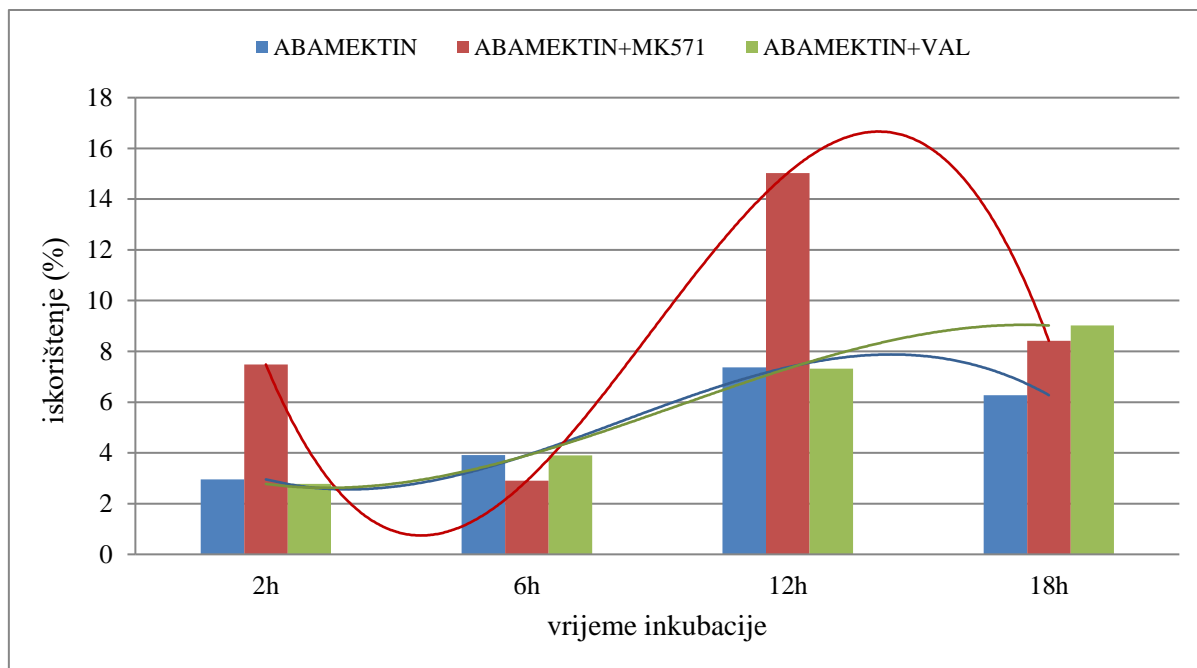
5.1.2.3. Ovisnost toksičnosti abamektina o vremenu izloženosti na *Anisakis* L3 ličinke

Analizirani uzorci tkiva *Anisakis* L3 ličinki tretirani s abamektinom u odsustvu inhibitora ABC transportera su pokazali niže vrijednosti koncentracija do 6 sati tretmana ($0,005 \mu\text{mol/g}$; Slika 44.), dok su najvišu vrijednost dosegli u 12.-om satu, sa srednjom vrijednosti od $0,014 \mu\text{mol/g}$. Uzorci tretirani abamektinom u kombinaciji s inhibitorom valsopodarom su pokazali najniže vrijednosti u prve dvije vremenske točke, da bi nakon 12 sati tretmana dosegli najvišu vrijednost od $0,016 \mu\text{mol/g}$, ali ipak, u ovoj vremenskoj točki su uzorci tretirani ovim ispitivanim spojem u kombinaciji s MK571 pokazali najvišu vrijednost $0,020 \mu\text{mol/g}$ uzimajući u obzir cijeli tretman. Nakon 18 sati inkubacije su svi uzorci pokazali pad koncentracija u odnosu na prethodnu vremensku točku, u prosjeku 35 %.



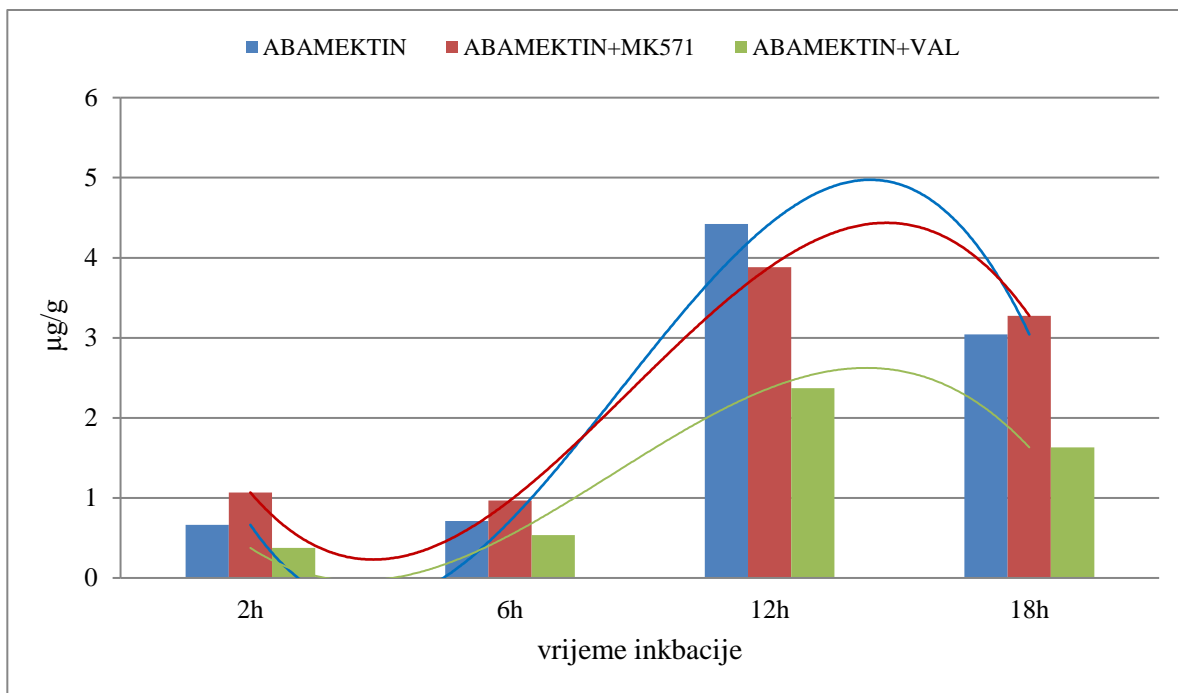
Slika 44. Koncentracije ($\mu\text{mol/g}$) abamektina u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

Linearno povećanje srednjih vrijednosti iskorištenja (r) se pokazalo u uzorcima *Anisakis* ličinki (Slika 45.) nakon tretmana abamektinom u kombinaciji s valspodarom kroz sve vremenske točke tretmana, što je vidljivo iz raspona 2,778 – 9,022 %. Slična situacija je bila i kod uzoraka tretiranih samo s abamektinom koji su pokazali raspon 2,96 – 6,276 %, dok su uzorci tretirani abamektinom u kombinaciji s MK571 pokazali dvostruko više vrijednosti iskorištenja s najvišom izmjerenom srednjom vrijednosti ovog tretmana 15,030 % nakon 12 sati izloženosti.



Slika 45. Iskorištenje (r; %) abamektina u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valsopodara.

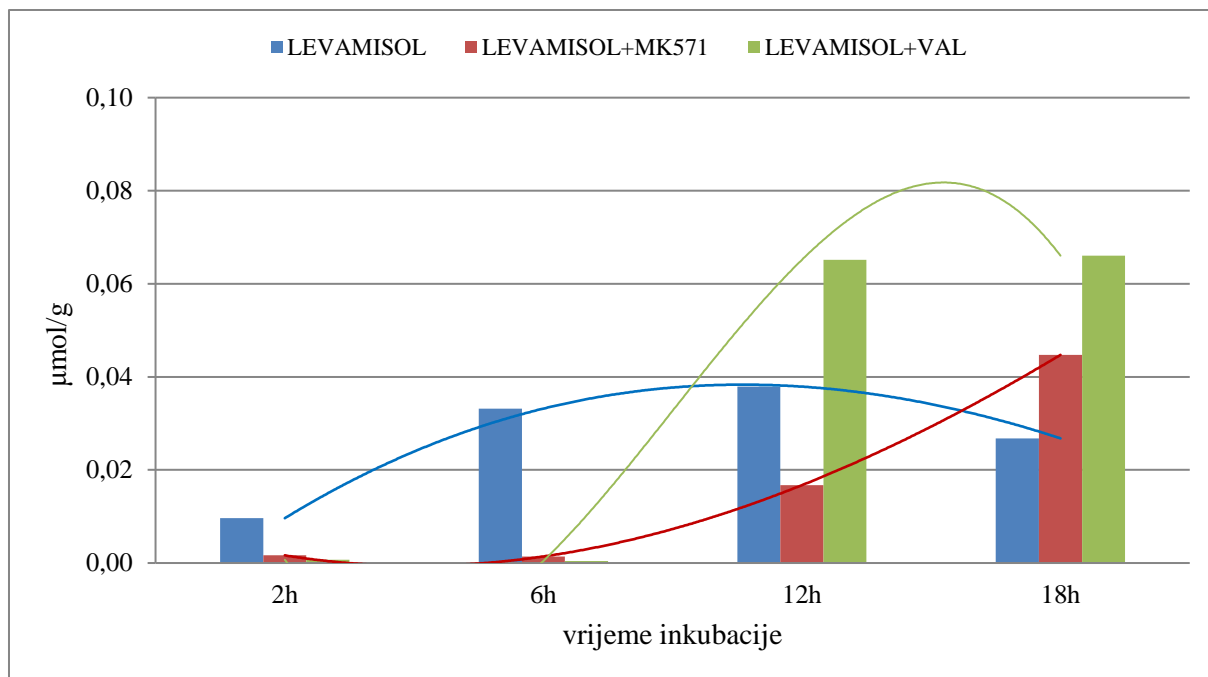
Do 6 sati izloženosti su u svim uzorcima izmjerene relativno niske vrijednosti (u odnosu ostale vremenske točke) masenih udjela (Slika 46.), izražene u μg abamektina na g tkiva ličinki, gdje je najviša srednja vrijednost uzorka dosegla $1,068 \mu\text{g/g}$. Najviše srednje vrijednosti, uzimajući u obzir sve vremenske točke, su izmjerene nakon 12 h izloženosti i iznosile $4,424 \mu\text{g/g}$ u tretmanu samo s abamektinom, $3,882 \mu\text{g/g}$ abamektinom s MK571, te $2,371 \mu\text{g/g}$ u tretmanu abamektinom u kombinaciji s valsopodarom.



Slika 46. Maseni udjeli ($\mu\text{g/g}$) abamektina u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

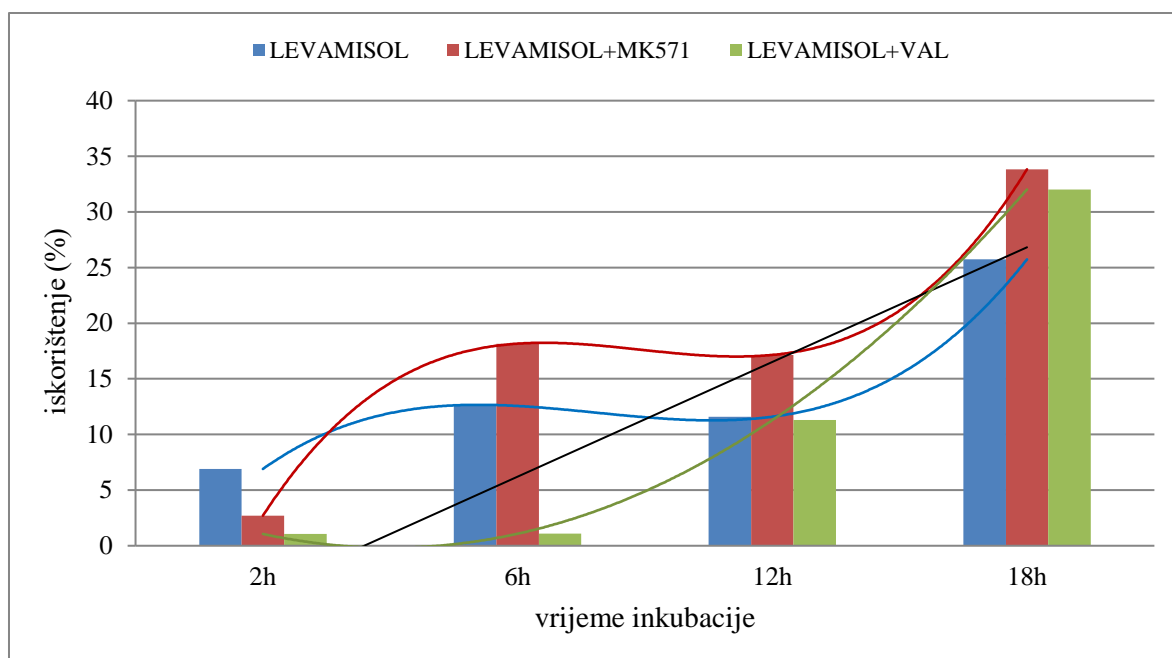
5.1.2.4. Ovisnost toksičnosti levamisola o vremenu izloženosti na *Anisakis* L3 ličinke

Ekstrakti *Anisakis* ličinki tretirani samo levamisolom su pokazali porast koncentracija kroz prve tri vremenske točke (Slika 47.) unutar raspona srednjih vrijednosti od 0,010 do 0,038 $\mu\text{mol/g}$, da bi u zadnjem satu tretmana srednja vrijednost koncentracija pala za 29 %. Kromatografska analiza je pokazala da su tijekom prvih 6 sati izlaganja uzorci *Anisakis* ličinki tretirani levamisolom s MK571, odnosno s valspodarom imali izuzetno niske koncentracije koje nisu prešle 0,002 $\mu\text{mol/g}$, ali su do 18.-og sata izlaganja porasle do 0,045 $\mu\text{mol/g}$ srednje vrijednosti u slučaju kombinacije s MK571, odnosno 0,066 $\mu\text{mol/g}$ u kombinaciji s valspodarom. Druga najviša vrijednost koncentracije tijekom tretmana je zabilježena također nakon djelovanja ovim ispitivanim spojem u kombinaciji s valspodarom nakon 12 sati tretmana, s vrijednosti jako sličnoj onoj u prethodnoj vremenskoj točki, 0,065 $\mu\text{mol/g}$.



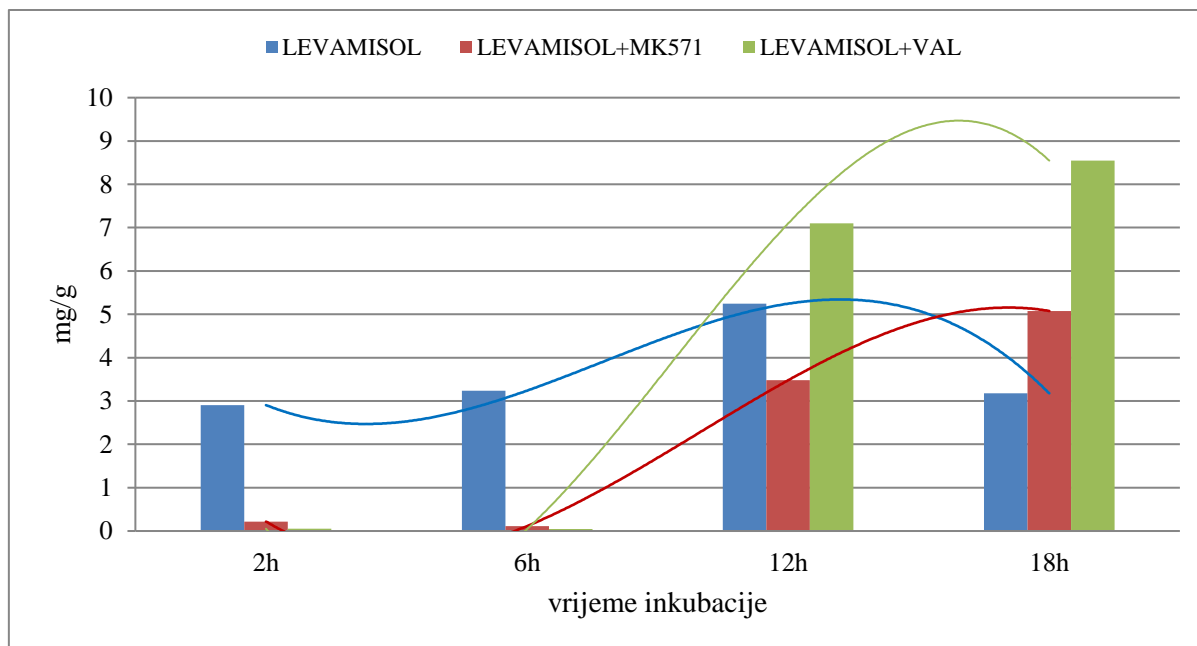
Slika 47. Koncentracije ($\mu\text{mol/g}$) levamisola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

Prema dobivenim rezultatima analiza tekućinskom kromatografijom (Slika 48.), srednje vrijednosti iskorištenja levamisola (r) su bile u rasponu od 1,062 do 18,160 % za prve tri vremenske točke i od 25,731 do 33,826 % u 18.-om satu izloženosti gdje su uzorci tretirani levamisolom u kombinaciji s MK571 dosegli navedenu najvišu vrijednost.



Slika 48. Iskorištenje (r; %) levamisola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valspodara.

Kromatografskom analizom određene srednje vrijednosti masenih udjela levamisola u tkivima *Anisakis* ličinki (Slika 49.), u mg levamisola na g tkiva *Anisakis* ličinki, u tretmanu gdje je ovaj ispitivani spoj djelovao u kombinaciji s MK571 su pokazale relativno pravilan linearan porast vrijednosti kroz sve vremenske točke od najniže 0,114 do najviše 5,077 $\mu\text{g/g}$. U tretmanu gdje je levamisol na ličinke djelovao sam je srednja vrijednost svih vremenskih točaka bila 3,642 $\mu\text{g/g}$, dok je najvišu vrijednost dosegla nakon 12 sati tretmana 5,246 $\mu\text{g/g}$. Nakon tretmana gdje su levamisol i valspodar djelovali zajedno tijekom 18 sati izloženosti su određene gotovo dvostruko više srednje vrijednosti masenih udjela u ličinkama (8,547 $\mu\text{g/g}$) nego nakon tretmana u kojima je levamisol djelovao sam (3,175 $\mu\text{g/g}$) ili u kombinaciji s inhibitorom MK571 (5,077 $\mu\text{g/g}$).

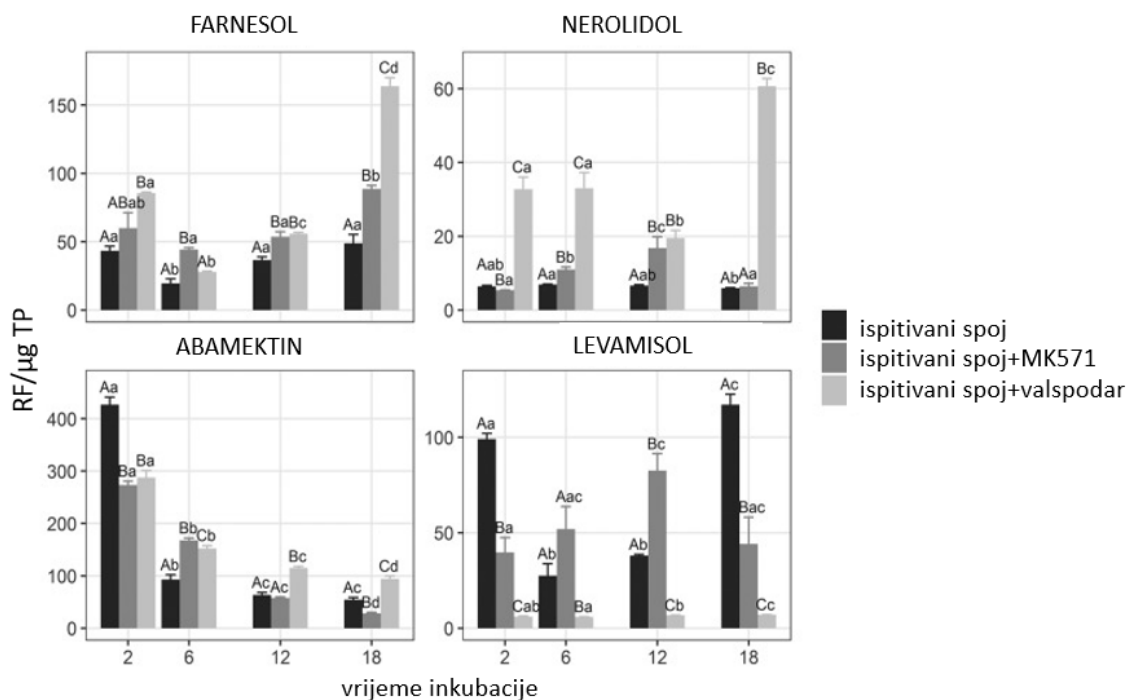


Slika 49. Maseni udjeli (mg/g) levamisola u tkivima *Anisakis* ličinki tijekom 18 sati tretmana samim ispitivanim spojem i u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC transportera, MK571 i valsopodara.

5.2. Procjena unutarstanične proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u *Anisakis* ličinkama

Razine proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) su izmjerene testom s 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetatom (H₂DCF-DA) u *Anisakis* L3 ličinkama (Slika 50.) tretiranim samo farnesolom, nerolidolom, abamektinom i levamisolom, ili u kombinaciji s inhibitorima ABC transportera, MK571 (MRP inhibitor) ili valsopodara (P-gp inhibitor). Najviše razine proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica su izmjerene u ličinkama uzorkovanih 2 sata nakon izlaganja samom abamektinu, 410 jedinica relativne fluorescencije na μg ukupnih proteina (RF/ μg TP; engl. *total protein*, TP). U tretmanu ovim ispitivanim spojem je izražena ovisnost o vremenu izlaganja, odnosno, opadanje vrijednosti relativne fluorescencije izmjerenih u ličinkama uzorkovanih od 2. do 18. sata tretmana ($p < 0,05$) djelovanja samog ispitivanog spoja ili u kombinaciji s jednim od ABC inhibitora. U tretmanu farnesolom u kombinaciji s valsopodarom ova vrijednost izmjerena u ličinkama nakon 18 sati tretmana je bila viša od 160 RF/ μg TP. Vrijednost nešto viša od 110 RF/ μg TP je izmjerena u ličinkama nakon tretmana

samim levamisolom u istoj vremenskoj točki uzorkovanja, dok je tek nešto niža vrijednost od 100 RF/ μ g TP zabilježena u istom tretmanu ali nakon 2 sata izloženosti. Uzimajući u obzir cjelokupni tretman ovim ispitivanim spojem, više vrijednosti proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica su izmjerene u ličinkama nakon izlaganja samom levamisolu i u kombinaciji s MK571, dok je u ličinkama nakon izlaganja levamisolom u kombinaciji s valsopodarom zabilježeno značajno opadanje ovih vrijednosti ($p < 0,05$). S obzirom na izmjerene vrijednosti proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica nakon tretmana sa svim ispitivanim spojevima u svim vremenskim točkama, nerolidol je pokazao najniže vrijednosti, osim u slučaju tretmana u kombinaciji s valsopodarom kada je ova vrijednost tek prešla 60 RF/ μ g TP ($p < 0,05$). Najviša izmjerena srednja vrijednost proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica u kontrolnim tretmanima (fosfatno puferirana fiziološka otopina, PBS), tretmanima s otapalima (etanolom, metanolom i dimetil sulfoksidom), ili onima s otopinama inhibitora i navedenim otapalima (s etanolom, metanolom, PBS, DMSO i njihovim kombinacijama) je bila 5,02 RF/ μ g TP.

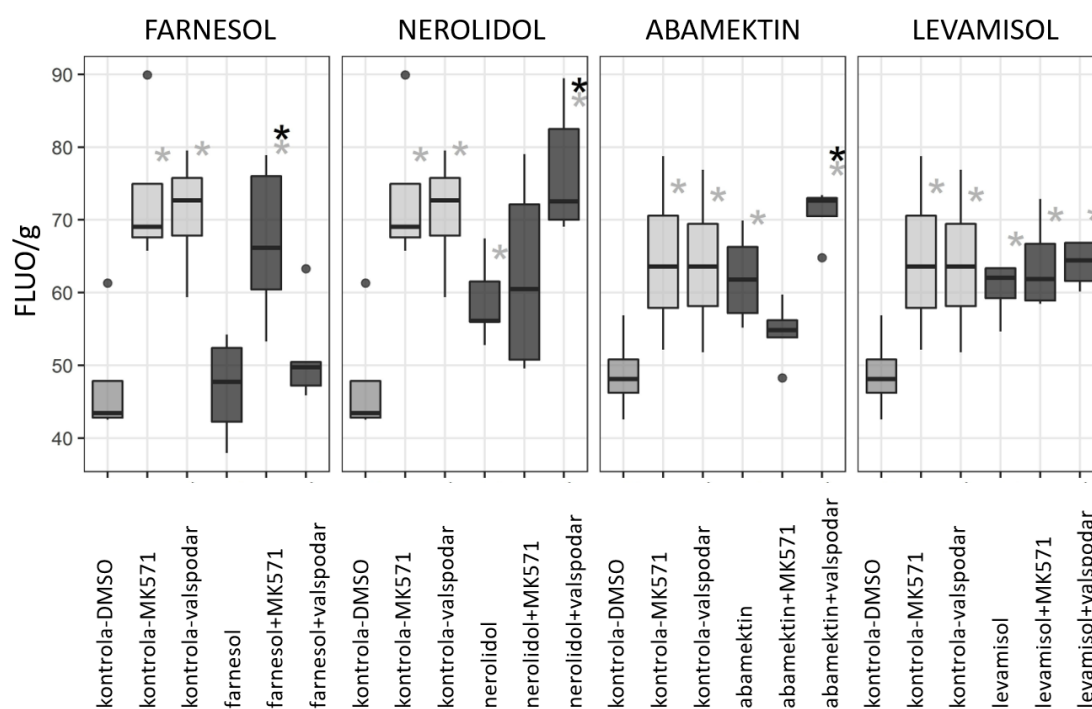


Slika 50. Proizvodnja reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u stanicama *Anisakis* L3 ličinki nakon tretmana s prirodnim spojevima farnesolom i nerolidolom, te sintetičkim antihelminthicima abamektinom i levamisolom s/bez inhibitora MK571 ili valsopodara. Podaci podvrgnuti

Cochranovom testu i analizi varijance (ANOVA), te Student-Newman-Keuls-ovom (SNK) testu (STATISTICA; v8.0). Rezultati su izraženi kao relativna fluorescencija (RF)/ μg TP (ukupnih proteina). Različita slova označavaju statistički značajnu razliku, $p < 0,05$, između tretmana (velika slova) i između sati za jedan tretman (mala slova).

5.3. Rezultati kalcein (C-AM) testa

Rezultati kalcein-AM testa *Anisakis* L3 ličinki prethodno tretiranih samo s farnesolom, nerolidolom, abamektinom i levamisolom ili u kombinaciji s jednim od inhibitora ABC membranskih transportera, MK571 (MRP inhibitor) i valspodarom (P-gp inhibitor) su prikazani na Slici 51., gdje su fluorescentni signali različitih jačina izraženi u jedinicama fluorescencije po gramu tiva ličinke (FLUO/g). Testovi statistički značajnih razlika provedeni pomoću PERMANOVE bili su dvostruki: svi rezultati tretmana uspoređeni su s onima kontrolnih tretmana (DMSO; sive zvjezdice na Slici 51.), a tretmani u kojima su primijenjeni inhibitori zajedno s ispitivanim spojevima uspoređeni su s onima u kojima se na ličinke djelovalo samim ispitivanim spojevima (crne zvjezdice na Slici 51.). Statistički značajno povećanje fluorescencije je izmjereno u ličinkama koje su prethodno bile tretirane abamektinom u kombinaciji s valspodarom u odnosu na one tretirane samim abamektinom. Ličinke tretirane farnesolom u kombinaciji s MK571 i one tretirane nerolidolom u kombinaciji s valspodarom su također imale izraženu fluorescenciju, dok nije primijećena razlika u rezultatima fluorescencije nakon tretmana levamisolom kada je djelovao sam ili kada je djelovao u kombinaciji s inhibitorima.



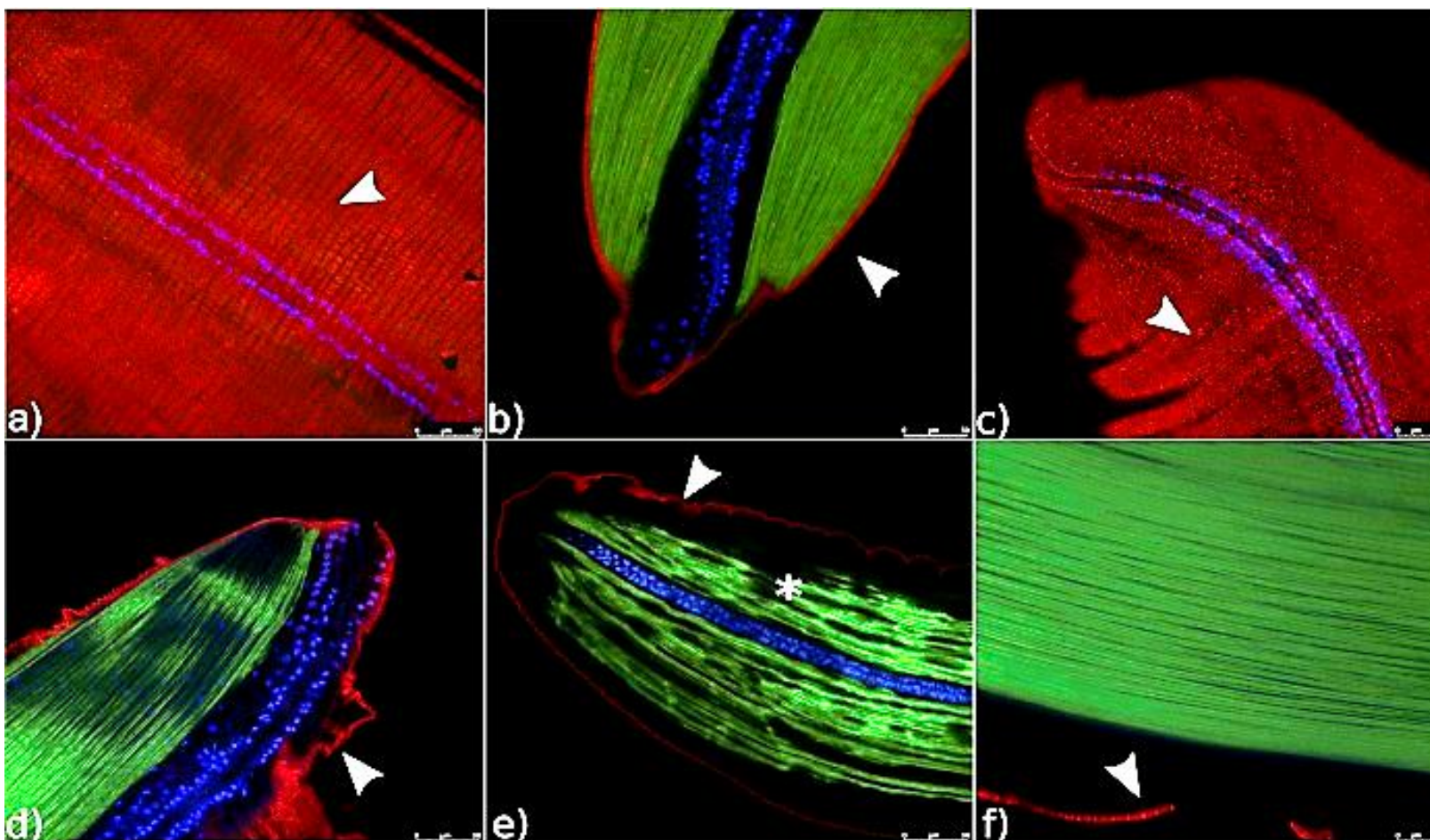
Slika 51. Rezultati kalcein-AM testa na *Anisakis* L3 ličinkama tretiranim prirodnim spojevima farnesolom i nerolidolom, te sintetičkim antihelminticima abamektinom i levamisolom, samima ili u kombinaciji s inhibitorom MK571 ili valsopodarom, izraženi kao fluorescencija po masi ličinke (FLUO/g). Statistički značajne razlike određene su PERMANOVA testom: sive zvjezdice označavaju ($p < 0,05$) sve tretmane uspoređene s negativnim kontrolama; crne zvjezdice označavaju ($p < 0,05$) tretmane ispitivanim spojevima u kombinaciji s inhibitorima uspoređene s onima u kojima su ispitivani spojevi djelovali sami.

5.4. Rezultati imunohistokemijske analize citoskeleta tretiranih *Anisakis* ličinki

Nakon 18 sati tretmana farnesolom, nerolidolom, abamektinom i levamisolom u prisutnosti/odsutnosti jednog od dva inhibitora ABC membranskih transportera, MK571 i valsopodara, procijenjen je učinak ispitivanih spojeva na citoskeletne proteine, aktin i tubulin, *Anisakis* ličinki koje su u tu svrhu bile naknadno izložene monoklonskom antitijelu antitubulin-Cy3 za detekciju tubulina, boji Atto 488 Phalloidin za detekciju aktina, te boji 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) za detekciju stanične jezgre. Neoštećena struktura staničnih proteina

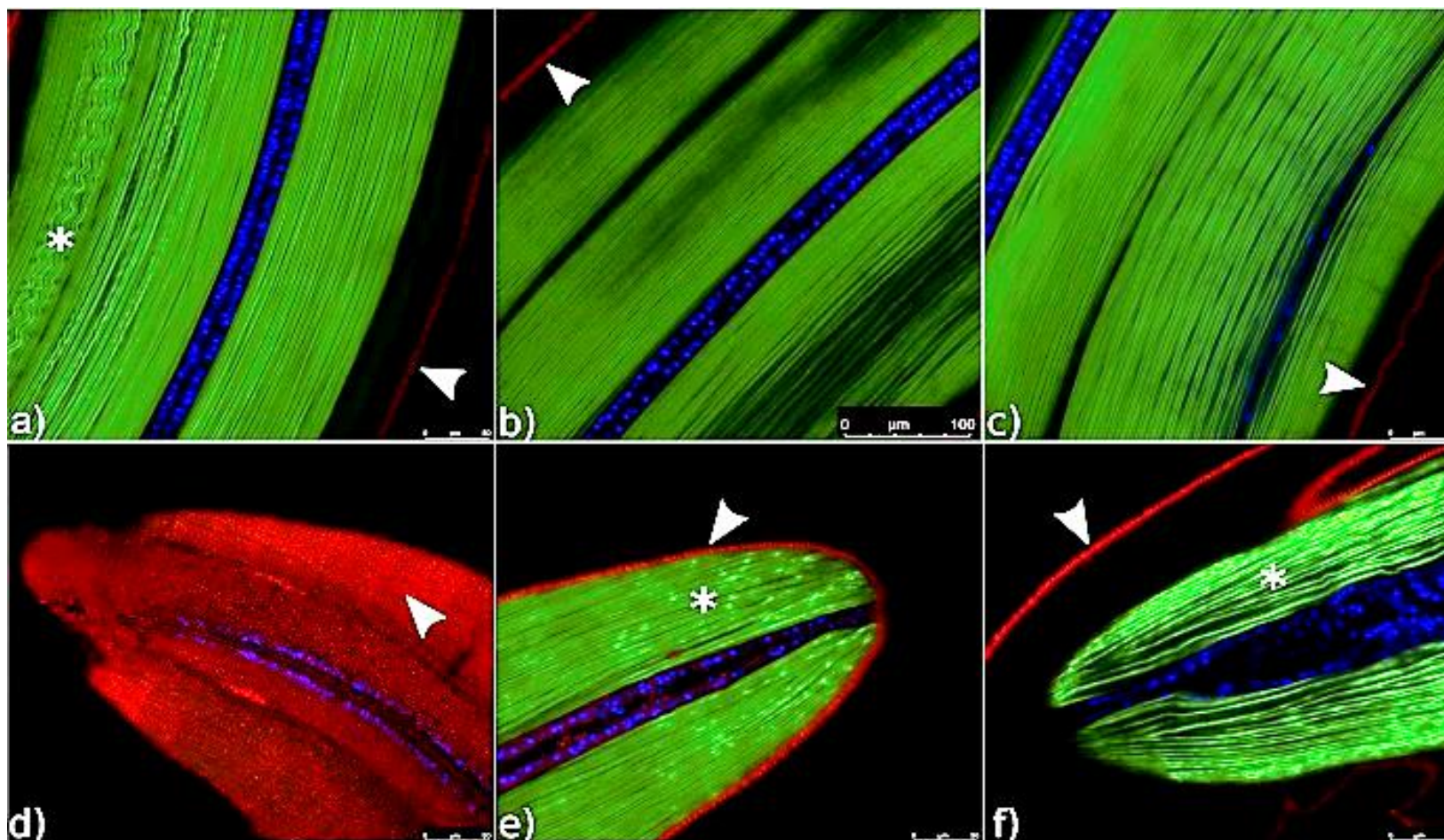
netretiranih *Anisakis* ličinki 18 sati nakon inkubacije u samom etanolu ili metanolu i u kombinaciji s inhibitorima MK571 ili valsopodarom je prikazana na Slici 54.

Nakon 18 sati tretmana *Anisakis* ličinki samim nerolidolom u uzorcima je bila vidljiva depolimerizacija β -tubulina u poprečnim prugama vanjske kutikule, ali nije uočeno djelovanje na aktin u sloju uzdužnog mišića (Slika 52. a). Ličinke tretirane nerolidolom u kombinaciji s inhibitorom MK571 su pokazale povećanu depolimerizaciju tubulina i poremećen razmještaj aktinskih vlakana (Slika 52. b). U *Anisakis* ličinkama prethodno tretiranim nerolidolom u kombinaciji s inhibitorom valsopodarom je uočeno odvajanje izraženo granulirane kutikule i gubitak povezanosti aktinskih vlakana (Slika 52. c). Tretman samim farnesolom je u *Anisakis* ličinke izazvao odvajanje kutikule (Slika 52. d), dok je istodobna primjena ovog ispitivanog spoja s valsopodarom uzrokovala izraženu depolimerizaciju β -tubulina (Slika 52. f). Djelovanje farnesola u kombinaciji s MK571 na ličinke je izazvalo odvajanje kutikule, ali i izražene promjene u razmještaju aktinskih vlakana (Slika 52. e).

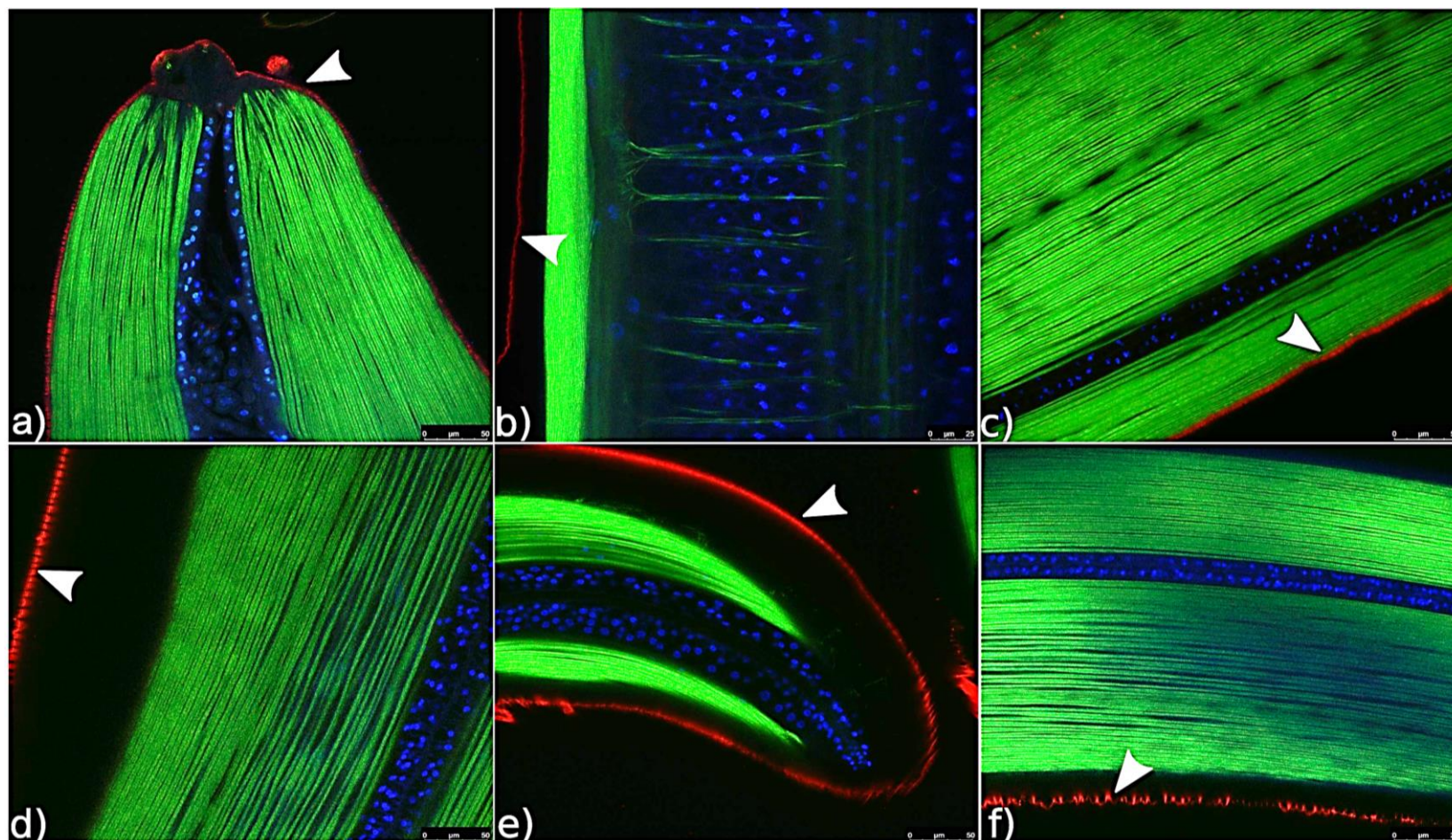


Slika 52. Imunohistokemijska lokalizacija β -tubulina (crveno, obilježeno monoklonskim antitubulin-Cy3 antitijelom), aktina (zeleno, označeno Atto 488 Phalloidinom) i stanične jezgre (plavo, označeno 4,6-diamidino-2-fenilindolom, DAPI) u *Anisakis* ličinkama 18 h nakon izlaganja: a) nerolidolu; b) nerolidolu s MK571; c) nerolidolu s valsopodarom; d) farnesolu; e) farnesolu s MK571 i f) farnesolu s valsopodarom. Bijele strelice označavaju promjene u kutikuli ličinke; zvjezdica označava mjesto gubitka preklapanja aktinskih vlakana; mjerne oznake 100 μ m, osim f) 50 μ m.

U tretmanu abamektinom aktinska vlakna u *Anisakis* ličinkama su poprimila nepravilan oblik, ali su se još uvijek preklapala (Slika 53. a). Bilo je vidljivo i potpuno odvajanje kutikule, iako nisu uočene promjene u prugama kutikule bogatim β -tubulinom. Istodobna primjena inhibitora (MK571 i valspodara) u kombinaciji s ovim ispitivanim spojem je utjecala na ličinke na sličan način (Slika 53. b i c), izazivajući blagu granulaciju β -tubulina, odvajanje kutikule i narušen integritet aktinskih vlakana. U ličinki tretiranih samo s levamisolom (Slika 53. d), utjecaj na aktinska vlakna nije bio vidljiv, ali je zabilježena izražena depolimerizaciju β -tubulina. Istodobna primjena inhibitora (MK571 i valspodara; Slika 53. e i f) s ovim ispitivanim spojem je izazvala gubitak preklapanja aktinskih vlakana i izraženu granulaciju tubulina, dok je samo u ličinkama na koje je djelovao levamisol u kombinaciji s valspodarom uočeno odvajanje kutikule i premećaj razmještaja jezgara. U kontrolnim tretmanima *Anisakis* L3 ličinke tretirane: etanolom (Slika 54. a), etanolom s MK571 (Slika 54. b), etanolom s valspodarom (Slika 54 c), metanolom (Slika 54. d), metanolom s MK571 (Slika 54. e) i metanolom s valspodarom (Slika 54. f) u prisutnosti/odsutnosti ABC inhibitora, MK571 ili valspodara, su pokazale istu strukturu i lokalizaciju ciljnih proteina kao i netretirane ličinke (Slika 54.).



Slika 53. Imunohistokemijska lokalizacija β -tubulina (crveno, obilježeno monoklonskim antitubulin-Cy3 antitijelom), aktina (zeleno, označeno Atto 488 Phalloidinom) i stanične jezgre (plavo, označeno 4,6-diamidino-2-fenilindolom, DAPI) u *Anisakis* ličinkama 18 h nakon izlaganja: a) abamektinu; b) abamektinu s MK571; c) abamektinu s valsopodarom; d) levamisolu; e) levamisolu s MK571 i f) levamisolu s valsopodarom. Bijele strelice označavaju promjene u kutikuli ličinke; zvjezdice označavaju mjesta gubitka preklapanja aktinskih vlakana; mjerne oznake 100 μ m.



Slika 54. Imunohistokemijska lokalizacija β -tubulina (crveno, obilježeno monoklonskim antitubulin-Cy3 antitijelom), aktina (zeleno, označeno Atto 488 Phalloidinom) i stanične jezgre (plavo, označeno 4,6-diamidino-2-fenilindolom, DAPI) u netretiranim *Anisakis* ličinkama 18 sati nakon inkubacije u: a) etanolu; b) etanolu s MK571; c) etanolu s valsopodarom; d) metanolu; e) metanolu s MK571 i f) metanolu s valsopodarom. Bijele strelice označavaju kutikulu ličinke; mjerne oznake 50 μm , osim b) i f) 25 μm .

§ 6. RASPRAVA

Oblici su poznati nametnici ljudi i životinja već stotinama godina, ali je poznat tek mali broj terapeutika koji na njih djeluju. Ovaj ograničeni broj dostupnih terapeutika naglašava problem otpornosti na antihelmintike, jer njihova dugotrajna, redovita i pretjerana primjena dovodi do sve bržeg odgovora nametnika poput pojavljivanja rezistentnih sojeva, odnosno do sve češće pojave otpornosti nametnika na primjenjivani terapeutik (Keiser i Utzinger, 2010). Bitno je naglasiti da antihelmintici, kao posljedica primjenjivanih terapija, mogu biti vrlo toksični za ne ciljane kopnene (Verdú i sur., 2015), ali i vodene vrste životinja, pa je tako potvrđeno djelovanje ivermektina na zooplanktonske vrste, kopepodne račiće i velike beskralješnjake, a fenbendazola na rakove (Wagil i sur., 2015). Složenost infestacija oblicima se vidi u tome što ovi nametnici predstavljaju široku raznolikost u smislu evolucijskog razvoja koji je uvjetovao specifičnosti nametničkog načina života kao što je životni ciklus, prehrambene navike te raznolikost krajnjih domaćina. Ova raznolikost ukazuje na mogućnost različite učinkovitosti terapeutika na različite vrste oblića koje mogu istovremeno infestirati istog domaćina. Stoga je ključno razumijevanje načina djelovanja trenutno dostupnih terapeutika da bi se omogućila njihova dugotrajnija primjena. Istovremeno treba ići i u smjeru razvoja novih spojeva i istražiti adekvatne prirodne spojeve.

Metabolički procesi aktivirani u stanicama nametnika tijekom tretmana terapeutima još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Nakon unosa potencijalno toksičnih ksenobiotika/antihelmintika u tijelo nametnika, u njihovim stanicama se aktiviraju enzimi ili specifični transportni proteini s ciljem eliminiranja tog spoja iz tijela. U svim vrstama oblića su se razvili sofisticirani sustavi detoksikacije koja predstavlja korisnu obrambenu strategiju nametnika, ali pogoduje razvoju rezistencije na terapeutike kao osnovne strategije njihove kontrole. Metabolizam ksenobiotika obuhvaća njihovu biotransformaciju i transport u organizmu. Biotransformacija ksenobiotika odvija se u dvije faze. Prva faza biotransformacije su oksidacija, redukcija i hidroliza ksenobiotika, kada se ksenobiotici metaboliziraju u hidrofilne spojeve (umetanjem ili otkrivanjem reaktivnih hidrofilnih dijelova u strukturama ksenobiotika) koji se lakše izlučuju. U drugoj fazi ksenobiotici ili metaboliti ksenobiotika iz prve faze prolaze kroz reakcije konjugacije s endogenim spojevima (npr. glutationom i saharidima). Aktivni transport supstrata, metabolita ili konjugata kroz membrane posredovan

specifičnim transporterima danas se smatra trećom fazom metabolizma ksenobiotika (Cvilink i sur., 2009). Prvi identificirani eukariotski ABC transportni protein nazvan P-glikoprotein (poznat kao P-gp, ABCB1 protein ili protein otpornosti na više lijekova 1; engl. *multidrug resistance protein*, MDR1) pripada ABCB potporodici transportnih proteina, a osnovna uloga mu je obrana stanice od različitih organskih ksenobiotika na način da ih nepromijenjene direktno izbacuje iz stanice (Ambudakar i sur., 1999; Leprohon i sur., 2011). Druga potporodica su ABCC transporteri koji se nazivaju i MRP proteini (engl. *multidrug resistance– associated proteins*), kojoj pripada ABCC1 (MRP1) protein. Proteini koji pripadaju ovoj potporodici izbacuju nepromijenjene ili prethodno modificirane ksenobiotike izvan stanice. Poznata je i treća, ABCG potporodica, kojoj pripada BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*), koji se naziva i ABCG2 protein (Schninkel i Jonker, 2003; Cole i Deeley, 2006). ABC transportni proteini su evolucijski očuvani, te se nalaze u membranama živih stanica svih organizama (Dassa i Bouige, 2001), a imaju ulogu održavanja stanične homeostaze jer unose važne nutrijente i izbacuju ksenobiotike i endotoksine nastale metabolizmom u stanici (Jones i George, 2004). Oni vežu ATP molekulu i koriste energiju oslobođenu njenom hidrolizom za prijenos određenog spoja kroz staničnu membranu protivno koncentracijskom gradijentu. Prema smjeru transporta se ovi transporteri dijele na *importere* koji obavljaju unos hranjivih tvari i *eksportere* koji obavljaju izbacivanje štetnih tvari iz stanice. Rad ovih membranskih proteina koji štite organizam od toksičnih tvari se naziva mehanizam multiksenobiotičke otpornosti (engl. *multixenobiotic resistance mechanism*) ili MXR mehanizam, a najčešće istraživana porodica transportnih proteina uključenih u ovaj detoksifikacijski mehanizam su ABC (engl. *ATP-binding cassette*) transportni proteini. MXR, odnosno, MDR mehanizam je prvobitno opažen u kemoterapijom tretiranim tumorima koji su bili karakterizirani visokom aktivnošću P-gp i MRP proteina koji su aktivno izbacivali primijenjene terapeutike i na taj način inducirali otpornost tumorskih stanica (Szakács i sur., 2006). U stanicama oblića su upravo ovi transporteri odgovorni za aktivno izbacivanje antihelmintika što dovodi do rezistencije na makrocikličke laktone kao najvažniju skupinu antihelmintika (Lespine i sur., 2012). Makrociklički laktoni (abamektin, ivermektin i dr.) djeluju na ionske kanale povezane glutamatom i γ -aminomaslačnom kiselinom (GABA) u živčanim i mišićnim stanicama, pa time povećavaju propusnost stanične membrane za kloridne ione što dovodi do njene hiperpolarizacije i posljedične paralize nametnika. Iako svaka skupina antihelmintika ima svoje specifične mehanizme djelovanja, njihova učinkovitost se razlikuje od vrste do vrste nametničkih oblića (kao što se razlikuje i metabolizam terapeutika unutar iste vrste), a oni su

skupina nametnika kod koje je najbolje razvijen sustav metabolizma ksenobiotika (Polak, 2022). U svrhu onemogućavanja mehanizma detoksifikacije u nametničkim stanicama primjenjuju se spojevi koji inhibiraju rad MXR transportera. Primjenom tih inhibitora aktivnosti ABC transportera istovremeno s terapeutcima, stanica nametnika postaje podložnija terapiji jer se zaustavlja njihovo aktivno izbacivanje što dovodi do nakupljanja terapeutika unutar stanice (Krishna i Mayer, 2000). Polak i sur. (2022) navode da u postojećoj literaturi postoji jako malo informacija o receptorima i njihovim podjedinicama, razlikama u ekspresiji gena pojedinih receptora, oksidativnom metabolizmu i transportnim proteinima koji upravljaju detoksifikacijom stanice, a iako su Lespine i sur. još 2012. upozoravali na neistraženost rezistencije oblića na primjenjivane antihelmintike i važnost proučavanja povezanih transportnih mehanizama, do danas su ta pitanja ostala neodgovorena.

Na tom tragu, ovo istraživanje svojim informacijama doprinosi znanju o letalnim koncentracijama, uzrocima akumulacije i istraženim učincima ispitivanih spojeva na *Anisakis* L3 ličinke nakon *in vitro* tretmana, te djelovanju inhibitora ABC transportera na aktivnost transmembranskih proteina u stanicama ovih ličinki. U tretmanima, smanjenje letalne koncentracije ispitivanog spoja kada na ličinku djeluje u kombinaciji s jednim od inhibitora ukazuje da je detoksifikacijski mehanizam u stanicama ličinki uspješno deaktiviran, ili djelomično inhibiran s primijenjenim inhibitorom, odnosno da je onemogućeno ili usporeno aktivno izbacivanje ispitivanog spoja preko ciljanih transmembranskih proteina izvan stanice nametnika. Nakon 24-satnog tretmana s ispitivanim spojevima u šest koncentracija i u odsustvu/prisustvu ABC inhibitora, zabilježeno je da su MRP transporteri dominirali u izbacivanju farnesola, P-gp transporteri su bili odgovorni za izbacivanje nerolidola, dok je iz dobivenih rezultata vidljivo da i P-gp i MRP transporteri sudjeluju u izbacivanju levamisola iz stanica ličinki. Iznimka je bio abamektin, u čijim tretmanima nije uočena razlika između toksičnosti ovog ispitivanog spoja kada djeluje sam ili u kombinaciji s jednim od primijenjenih inhibitora ABC transportera, što sugerira da bi drugi putevi ili drugi transportni proteini, mogli biti relevantni za njegovo izbacivanje iz stanice ovih oblića, odnosno da on kao makrociklički lakton i sam ima ulogu P-gp inhibitora (Didier i Loor, 1996). Naime, dokazano je da su avermektini, pa tako i abamektin, supstrati za MDR1 (ABCB; Lespine i sur., 2007), a prema Lespine i sur. (2006) i za MRP (ABCC) transportere. Značajno smanjenje vrijednosti letalne koncentracije ispitivanog spoja u prisutnosti inhibitora sugerira da se spoj izbacuje putem onog transportera na koji djeluje specifični inhibitor. Rezultati ove doktorske disertacije prvi put dokazuju da P-gp i MRP transporteri u *Anisakis* ličinkama sudjeluju u izbacivanju (efluksu)

svih ispitivanih spojeva na određenoj razini nakon određenog vremena trajanja izloženosti, kao što su Dalzell i sur. (2015) pokazali da različite stanice izložene istom toksikantu pokazuju afinitet za određeni transporter.

Metodom tekućinske kromatografije s detekcijom u ultraljubičastom spektru (UHPLC-UV-DAD) su određene količine akumuliranih ispitivanih spojeva u tkivima L3 *Anisakis* ličinki nakon 24-satnog *in vitro* tretmana s abamektinom, levamisolom, farnesolom i nerolidolom u šest radnih koncentracija za svaki ispitivani spoj bez prisustva inhibitora ABC transportera i u prisustvu inhibitora valspodara ili MK571. Rezultati akumulacije ispitivanih spojeva u prisutnosti/odsutnosti jednog od inhibitora u L3 *Anisakis* ličinkama mjereni metodom tekućinske kromatografije su u skladu s kalcein-AM testom aktivnosti transportera, što dodatno dokazuje da se aktivacija i funkcija izbacivanja transporterima mijenja tijekom vremena izloženosti određenom toksikantu. Ispitivanjem toksičnosti ciljanih spojeva na *Anisakis* L3 ličinke nakon 24 sata *in vitro* tretmana sa šest koncentracija farnesola (u prisustvu/odsustvu inhibitora MK571 ili valspodara), dobivene su letalne koncentracije pri kojima je ovaj ispitivani spoj uzrokovao smrtnost 10, 50 i 90 % od ukupnog broja testiranih jedinki, pri čemu je farnesol pokazao značajno jače larvicidno djelovanje pri sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora MK571 ($LC_{50} = 91,02 \mu\text{mol/L}$), dok primjena inhibitora valspodara uz ovaj ispitivani spoj nije izazvala značajnije promjene njegove toksičnosti (Tablica 9.). Najviše vrijednosti akumulacije (srednja vrijednost 2,09 mg/g) su zabilježene pri djelovanju samog farnesola u najvišoj koncentraciji (Slika 33.). Nakon 24 sata tretmana *Anisakis* L3 ličinki, nerolidol je pokazao značajno jače larvicidno djelovanje pri sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora valspodara ($LC_{50} = 88,92 \mu\text{mol/L}$) dok primjena MK571 uz ovaj ispitivani spoj nije izazvala značajnije promjene njegove toksičnosti. U tretmanu ličinki s abamektinom nije primijećena značajna razlika u toksičnosti pri tretmanima samim ispitivanim spojem i u prisustvu po jednog od dva inhibitora, što je vidljivo iz blago izraženijeg larvicidnog djelovanja kroz sve tri letalne koncentracije uz istovremenu primjenu inhibitora, valspodara ($LC_{50} = 0,19 \mu\text{mol/L}$), odnosno MK571 ($LC_{50} = 0,22 \mu\text{mol/L}$), nego kada je djelovao sam ($LC_{50} = 0,30 \mu\text{mol/L}$). Nakon tretmana levamisolom u kombinaciji s inhibitorima vidio se sličan larvicidni učinak, valspodar ($LC_{50} = 0,35 \mu\text{mol/L}$) i MK571 ($LC_{50} = 0,43 \mu\text{mol/L}$), koji je bio značajno veći od onog u tretmanu samim ispitivanim spojem.

Za svaki ispitivani spoj je određena njegova karakteristična koncentracija pri kojoj je bila najvidljivija razlika u toksičnosti na *Anisakis* ličinke u tretmanima s inhibitorom i onima kada je ispitivani spoj djelovao sam (LC_d ; Slika 37.). Ona predstavlja koncentraciju pri kojoj

ispitivani spoj postiže značajno veće toksične učinke na *Anisakis* ličinke u tretmanima kada ispitivani spoj djeluje u kombinaciji s jednim inhibitorom u odnosu na tretmane u kojima djeluje sam ili s drugim inhibitorom, iz čega se može zaključiti da je taj ispitivani spoj najvećim dijelom izbacivan izvan stanice transporterom na koji taj određeni inhibitor djeluje. Primjenjujući ovu koncentraciju specifičnu za svaki ispitivani spoj, ispitana je aktivnost P-gp i MRP transportera u stanicama *Anisakis* ličinki tako da su određene razine akumulacije ispitivanih spojeva u tkivima ličinki, proveden kalcein-AM test, određeni učinci ispitivanih spojeva na citoskeletne proteine, aktin i β -tubulin, te je određena i proizvodnja reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u tretiranim *Anisakis* ličinkama. Rezultati tretiranja *Anisakis* ličinki sa ispitivanim spojevima u njihovim specifičnim LC_d koncentracijama su pokazali da u tretmanima nerolidolom u prisutnosti/odsutnosti inhibitora su u *Anisakis* ličinkama izmjerene slične koncentracije tijekom prvih 12 sati izloženosti, dok su najviše koncentracije izmjerene nakon 18 sati tretmana kada je aktivnost P-gp transmembranskog transportera bila inhibirana valspodarom. U tretmanima farnesolom su najviše koncentracije u ličinkama izmjerene nakon 18 sati tretmana kada je na njih djelovao i kombinaciji s za njega dominantnim inhibitorom ABC transportera, MK571. U tretmanima abamektinom i levamisolom taj utjecaj nije tako jednoznačan. Levamisol učinkovito izbacuju oba transportera nakon 24 sata tretmana, ali do 18 sati tretmana se može zaključiti da je njegov dominantni transporter MRP. Nasuprot tome, nakon 24 sata izlaganja abamektinu nije uočena razlika između aktivnosti ova dva transportera, ali prema podacima dobivenim za akumulaciju i analizom kalcein-AM testa čini se da je MRP transporter pojačano izbacivao ovaj spoj nakon 12 sati tretmana, nakon čega je izbacivanje možda nastavljeno posredstvom drugog mehanizma i/ili transportnog proteina. To bi također moglo značiti da enzimski mehanizmi u *Anisakis* ličinkama preuzimaju ulogu u metaboliziranju abamektina koji preveden u drugi oblik prestaje biti supstrat za ispitivane transportere. Usprkos tome, njegova dokazana najviša toksičnost na *Anisakis* ličinke u odnosu na ostala tri ispitivana spoja opravdava njegovu primjenu kao antihelmintika čak i bez dodatka specifičnog inhibitora ABC transportera, još i više budući da primjena inhibitora ABC transportera nametnika, ali i onih od domaćina, može povećati toksičnost terapeutika prema samom domaćinu, što može dovesti do potencijalno štetnih nuspojava (Lespine i sur., 2012).

Inhibitori ABC transportera pri istodobnoj primjeni s terapeutikom povećavaju osjetljivost stanica na terapiju onemogućujući aktivno izbacivanje lijeka (Ozben, 2006), ali znanje o mehanizmima ABC transportera u oblicima i njihovoj inhibiciji još uvijek je nije dovoljno (Lespine i sur., 2012). Abamektin se veže na P-gp transporter, i tako blokira

dostupnost ovog transportera za druge spojeve, jačinom nekog od najučinkovitijih P-gp liganda, ciklosporina A i PSC833 (valspodara). Ipak, analiza kalcein-AM testom (Slika 51.) je pokazala povećanje fluorescencije u tretmanu s abamektinom u kombinaciji s valspodarom u usporedbi kada je abamektin djelovao sam, što sugerira da je primijenjena koncentracija abamektina ($LC_d = 0,41 \mu\text{mol/L}$) ostavila neka mjesta vezanja na P-gp transporteru aktivnim. Važno je napomenuti da su koncentracije dvaju inhibitora bile 12 (valspodar) i 24 (MK571) puta veće u usporedbi s LC_d abamektina, ali je on još uvijek učinkovito inhibirao P-gp aktivnost. Afinitet P-gp transportera za abamektin je primijećen i kod oblića *Haemonchus contortus* otpornih na makrocikličke laktone (Prichard i Roulet, 2007). U skladu s dobivenim LC_{50} podacima, zabilježena je veća fluorescencija u tretmanima s farnesolom s MK571 i nerolidolom s valspodarom, a u tretmanima levamisola u prisutnosti/odsutnosti inhibitora je bila jednakog intenziteta, iako rezultati akumulacije ukazuju na to da levamisol ima veći afinitet za P-gp, nego za MRP transportere. Urbatsch i sur. (2003) objašnjavaju da takva sklonost aktivaciji različitih prijenosnika može biti uzrokovana njihovim različitim energetskim zahtjevima.

Unutarstanična proizvodnja reaktivnih kisikovih čestica (ROS) u *Anisakis* L3 ličinkama nakon tretmana s nerolidolom, farnesolom, abamektinom i levamisolom u prisustvu/odsustvu inhibitora ABC transportera, MK571 ili valspodara, je testirana diklorodihidrofluorescein-diacetatnom (DCF-DA) metodom, pri čemu DCF-DA oksidira u diklorodihidrofluorescein (DCF) pomoću nastalih reaktivnih kisikovih čestica. Najviše razine proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica su izmjerene u ličinkama uzorkovanih 2 sata nakon izlaganja samom abamektinu (410 RF/ μg TP), dok su 2,5 puta niže vrijedosti zabilježene u ličinkama nakon tretmana farnesolom u kombinaciji s valspodarom, odnosno 3,7 puta niže vrijednosti su izmjerene u ličinkama nakon tretmana samim levamisolom, dok su uzorci tretirani nerolidolom pokazali najniže izmjerene vrijednosti reaktivnih kisikovih čestica (Slika 50.). Ovaj zabilježeni izostanak obrambenih mehanizama u *Anisakis* ličinkama protiv oksidativnog stresa izazvanog abamektinom i farnesolom potvrđuje njihovu osjetljivost na ove terapeutike i korisnost u terapiji ove vrste infestacije. Osim što su visoko toksične, reaktivne kisikove čestice izazivaju apoptozu (programiranu smrt stanice) u ovim ličinkama (Messina i sur., 2016). Poznato je da farnesol kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izaziva značajnu proizvodnju ovih čestica, te 30 minuta poslije inkubacije neizravno inhibira mitohondrijski transportni lanac elektrona (Machida i sur., 1998). Aktivacija sličnog biokemijskog odgovora je zabilježena u radu Ma i sur. (2014) nakon izlaganja slatkovodnog puža *Physa acuta* djelovanju abamektina. Samo u monoflagelatu *Leishmania mexicana* se pokazalo da seskviterpeni smanjuju endogeni glutation,

što posljedično omogućuje 2,7 do 5,4 puta veću proizvodnju reaktivnih kisikovih čestica (Barrera i sur., 2013). Također, ovi spojevi izazivaju oksidativni stres kroz izbacivanje glutaciona, glavnog staničnog antioksidansa, neizravno povećavajući unutarstanično nakupljanje reaktivnih kisikovih čestica, dok istovremeno stanični transport povećava količinu reaktivnih kisikovih čestica zbog veće potrebe za ATP-om i njegove pojačane sinteze (Lespine i sur., 2012). Kao što je vidljivo iz rezultata tretiranih *Anisakis* ličinki u ovom radu, najveći oksidativni stres je zabilježen kod ličinki tretiranih abamektinom, a zatim farnesolom, levamisolom i nerolidolom, a autori Peres i sur. (2009) navode da nerolidol i levamisol inhibiraju proizvodnju reaktivnih kisikovih čestica djelujući kao antioksidansi i sprječavajući toksičnost izazvanu promotorima njihove proizvodnje. Iako prema Yeh i sur. (2015) istodobna primjena inhibitora MK571 smanjuje upalu i peroksidaciju lipida, što dovodi do smanjenja oksidativnog stresa, ovdje (u tretmanima uz ispitivane spojeve) nije imala učinka na proizvodnju reaktivnih kisikovih čestica.

U ovom disertacijskom radu je imunohistokemijskom metodom potvrđen učinak ispitivanih spojeva na cjelovitost tubulina u kutikuli *Anisakis* ličinki. Tjelesna stijenka oblića se sastoji od vanjske kutikule, epiderme i somatskih mišića, štiteći jedinku od okoline, omogućujući kretanje i potporu. Kao što je tipično za sve oblice kutikula se sastoji od poprečnih pruga koje tvore prstenove, a u stadijima ličinke između njih postoji i specifična okomita pruga (Cox i sur., 1981). U ovom radu je kod *Anisakis* ličinki uočena ista organizacija kutikule, ali pozitivan signal tubulina u kutikuli nije bio ranije zabilježen. Naime, vanjsku troslojnu epikutikulu tvore glikoproteini i lipidi, dok se kortikalna, središnja i bazalna zona sastoje od kolagenih vlakana, (netopljivih) nekolagenih kutiklina i topljivih proteina poput enzima i strukturnih proteina (Fujimoto i Kanaya, 1973). U mikrofilarijskim oblicima tubulin je dokazan u somatskim tkivima (Helm i sur., 1989), hipodermalnom sloju i unutar staničnih jezgri u ličinkama mikrofilarija i mišićnim blokovima (Buglio i sur., 1991). Samo su Howell i Chen (1981) koristeći *immunogold* bojenje, otkrili prisutnost β -tubulina u srednjem i bazalnom sloju kutikule, hipodermalnom sloju, somatskim mišićnim stanicama ženke *Brugia pahangi* i mikrofilarijama u razvoju. U ovom disertacijskom radu je imunohistokemijskom metodom potvrđeno da ispitivani spojevi utječu na cjelovitost tubulina u kutikuli *Anisakis* ličinki, ali s manje izraženim učinkom na aktin u mišićima. Nakon 18 sati tretmana *Anisakis* ličinki ispitivanim spojevima, najizraženije histološke promjene su bile vidljive u uzorcima tretiranim abamektinom, koji je djelovao i na razmještaj i izgled aktinskih vlakana, i na β -tubulin izazivajući granulaciju, depolimerizaciju i potpuno odvajanje kutikule od tijela ličinke, dok su

slične promjene, samo s blago smanjenim djelovanjem na aktinska vlakna, uočene i u ličinkama tretiranim nerolidolom, farnesolom i levamisolom (Slike 52. i 53.). Može se reći da su ovo prve informacije o β -tubulinu u oblića, iako su Howell i Chen još 1981. otkrili njegovu prisutnost u kutikuli filarije *B. pahangi*, pretpostavljajući njezinu uključenost u transkutikularnom unosu hranjivih tvari. Naime, zbog nefunkcionalnog crijeva, kutikula filarije služi kao apsorpcijska površina koja kroz mikrotubule pronađene u kutikuli i mišiću stijenke tijela *B. pahangi* mogu imati morfološku funkciju, ulogu u hranjenju ili u unutarstaničnom transportu, jer omogućuje prijenos hranjivih tvari unutar stanice. Takav je mehanizam na primjer opisan u mikrotubulima funkcionalnih crijeva u vrsta *Ascaris suum* i *A. galli* (Atkinson i sur., 1980). Infektivne *Anisakis* ličinke također imaju nefunkcionalno crijevo prije presvlačenja, stoga uloga tubulina potencijalno može biti ista kao što je pretpostavljena u mikrofilarijskim vrstama, pa bi tubulin mogao biti struktura na koju bi se usmjerili terapeutici u budućim istraživanjima. Agensi koji djeluju na mikrotubule intenzivno se koriste u terapiji raka (Banerjee i sur., 2016), dok među anthelminticima benzimidazoli imaju visok afinitet za vezanje tubulina, inhibirajući stvaranje i stabilnost mikrotubula (Saunders i sur., 2013). Međutim, dok su takvi agensi antimitotici, jer inhibiraju staničnu proliferaciju djelujući na dinamiku polimerizacije vretenastih mikrotubula, u slučaju *Anisakis* ličinki, depolimerizacija tubulina u kutikuli je nakon *in vitro* tretmana abamektinom bila najizraženija.

§ 7. ZAKLJUČCI

Iz provedenog istraživanja o učinkovitosti mehanizama samozaštite L3 ličinki nametničke vrste oblića *Anisakis pegreffii* u interakciji sa sintetičkim antihelminthicima, abamektinom i levamisolom, te prirodnim seskviterpenskim spojevima, farnesolom i nerolidolom, došlo se do sljedećih zaključaka:

- sintetički antihelmitici abamektin i levamisol, te prirodni spojevi farnesol i nerolidol djeluju toksično na *Anisakis* L3 ličinke nakon 24-satnog *in vitro* tretmana: povišenje koncentracije ispitivanih spojeva utječe na njihovu toksičnost, zatim i dodatak inhibitora ABC transmembranskih proteina (valspodara ili MK571) utječe na toksičnost ispitivanih spojeva, te najnižu toksičnost pokazuje nerolidol, neznatno višu farnesol, zatim levamisol, a abamektin pokazuje najvišu toksičnost za *Anisakis* ličinke
- vrijednosti letalnih koncentracija (LC₁₀, LC₅₀, LC₉₀) prirodnih spojeva su preko stotinu puta više u odnosu na one sintetičkih antihelminatika, što ipak ostavlja mogućnost njihove upotrebe u antihelmintičkim tretmanima i upućuje na njihova daljnja istraživanja
- inhibitori ABC transportera pri istodobnoj primjeni s terapeutikom povećavaju osjetljivost stanica na terapiju onemogućujući aktivno izbacivanje lijeka, ali znanje o mehanizmima ABC transmembranskih proteina (ABC transportnih proteina ili ABC transportera) u oblicima i njihovoj inhibiciji još uvijek nije dovoljno. Rezultati ovoga rada pokazuju da inhibitor MK571 značajno utječe na toksičnost farnesola, valspodar na toksičnost nerolidola, dok je aktivnost oba inhibitora evidentna u promjeni toksičnosti levamisola, što ukazuje na to da MRP transmembranski proteini dominiraju u izbacivanju farnesola iz stanica ličinki, P-gp transportni proteini dominiraju u izbacivanju nerolidola, te P-gp i MRP transporteri sudjeluju u izbacivanju levamisola, dok P-gp i MRP transporteri neznatno sudjeluju u izbacivanju abamektina iz stanica *Anisakis* ličinki što sugerira da bi drugi putevi ili drugi transportni proteini mogli biti relevantni za njegovo izbacivanje iz stanica oblića, odnosno da on kao makrociklički lakton i sam ima ulogu P-gp inhibitora

Utvrđene su razlike u aktivnosti ABC transmembranskih proteina (transportera) uključenih u MXR (višestruku rezistenciju na ksenobiotike) mehanizme L3 ličinki *Anisakis pegreffii* tijekom *in vitro* tretmana nakon 2, 6, 12 i 18 h izloženosti LC_d koncentraciji:

– u prvim satima tretmana dominantni ABC transporter levamisola je Pg-p, a nakon 24 sata tretmana su učinkovita oba transportera (MRP i P-gp). Izražena inhibicija ABC transportera u stanicama ličinki je zabilježena nakon 18 sati tretmana kada su farnesol/nerolidol djelovali u kombinaciji s njihovim dominantnim inhibitorima ABC transportera (MK571/valspodar). Tretman abamektinom ne pokazuje razliku između aktivnosti MRP i P-gp transportera, ali zbog akumulacije u tkivu ličinki i analizom kalcein-AM testa vidljivo je da MRP transporter pojačano izbacuje ovaj ispitivani spoj 12 sati nakon tretmana, a nakon toga je izbacivanje nastavljeno drugim putem ili drugim transportnim proteinom.

– abamektin pokazuje najvišu toksičnost za *Anisakis* ličinke, u odnosu na ostale ispitivane spojeve, kada djeluje sam i u prisutnosti inhibitora ABC transportera. Njegova dokazana najviša toksičnost na *Anisakis* ličinke opravdava njegovu primjenu kao antihelmintika čak i bez dodatka specifičnog inhibitora ABC transportera, budući da primjena ovih inhibitora može povećati toksičnost terapeutika i prema samom domaćinu što može dovesti do potencijalno štetnih nuspojava.

– rezultati akumulacije ispitivanih spojeva u prisutnosti/odsutnosti jednog od inhibitora mjereni metodom tekućinske kromatografije su u skladu s rezultatima kalcein-AM testa aktivnosti transportera, što dodatno dokazuje da se aktivacija i funkcija izbacivanja transporterima mijenja tijekom vremena izloženosti određenom toksikantu

– najviše razine proizvodnje reaktivnih kisikovih čestica (ROS) su izmjerene u *Anisakis* ličinkama dva sata nakon izlaganja samom abamektinu; 2,5 puta niže vrijednosti su izmjerene u ličinkama nakon tretmana farnesolom u kombinaciji s valspodarom; 3,7 puta niže vrijednosti su izmjerene u ličinkama nakon tretmana samim levamisolom, a najniže vrijednosti su izmjerene u ličinkama nakon tretmana nerolidolom; ovi rezultati ukazuju na antioksidativno djelovanje nerolidola i levamisola, za razliku od djelovanja abamektina i farnesola koji promoviraju nastanak reaktivnih kisikovih čestica što potvrđuje osjetljivost nametnika na ove ispitivane spojeve i njihovu potencijalnu korisnost u antihelmintičkim tretmanima

– imunohistokemijskom metodom je potvrđeno da ispitivani spojevi utječu na cjelovitost β -tubulina u kutikuli *Anisakis* ličinki te je prvi put zabilježen pozitivan signal tubulina u kutikuli *Anisakis* ličinki. Najizraženije histološke promjene su vidljive u uzorcima ličinki tretiranih abamektinom koji je djelovao na β -tubulin, ali i na razmještaj i izgled aktinskih vlakana. Tubulin je ključni element u kutikuli *Anisakis* ličinke i predstavlja važno mjesto djelovanja ispitivanih spojeva, ali su potrebna dodatna istraživanja da se potvrdi njegova potencijalna osjetljivost na terapeutike.

– postoji relativno mali broj istraživanja koje pružaju usporedne dokaze o toksičnosti sintetičkih antihelmintika i aktivnih sastojaka esencijalnih ulja i utjecaju inhibitora ABC transportnih proteina na mehanizme aktivnog eliminiranja štetnih spojeva iz organizma nametničkih *Anisakis* ličinki. Iako postoje brojni radovi koji govore o *in vitro* procjenama djelovanja antihelmintika, teško se mogu naći su oni koji uključuju detaljan opis kemijskog djelovanja biljnih ekstrakata na citoskelet *Anisakis* ličinki, na što bi se trebala usmjeriti daljnja ispitivanja, dok bi kombiniranje (prirodnih/sintetičkih) terapeutika i određenog inhibitora transmembranskog proteina koji je odgovoran za njegovo aktivno eliminiranje iz stanica nametnika moglo predstavljati drugačiji pristup tretmanu nametničkih infestacija u odnosu na klasičnu terapiju samim antihelmintikom.

§ 8. LITERATURNI IZVORI

Abdel-Rahman, F. H., Alaniz, N. M. i Saleh, M. A. (2013): Nematicidal activity of terpenoids. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*, 48, 16–22.

Abongwa, M., Martin, R. J. i Robertson, A. P. (2017): A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*, 67, 137–152.

Aibinu, I. E., Smooker, P. M. i Lopata, A. L. (2019): *Anisakis* Nematodes in Fish and Shellfish- from infection to allergies. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 384–393.

Alonso-Gomez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M. C., Suarez de Parga, J. M., Daschner, A., Caballero, M. T., Barranco, P. i Cabañas., R. (2004): *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, 93, 378–384.

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. i Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter 1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39 (1), 361–398.

Anastasio, A., Smaldone, G., Cacace, D., Marrone, R., Lo Voi, A., Santoro, M., Cringoli, G. i Pozio, E. (2016): Inactivation of *Anisakis pegreffii* larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by salting and quality assessment of finished product. *Food Control*, 64, 115–9.

Arcos, S. C., Ciordia, S., Roberston, L., Zapico, I., Jiménez-Ruiz, Y., Gonzalez-Muñoz, M., Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., Rodriguez-Mahillo, A., Albar, J. P. i Navas, A. (2014): Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *A. pegreffii*. *Proteomics*, 14 (12), 1547–1568.

Armentia, A., Martín-Gil, F. J., Pascual, C., Martín-Esteban, M., Callejo, A. i Martínez, C. (2006): *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16, 258–63.

Atkinson, C., Newsam, R. J. i Gull, K. (1980): Influence of the antimicrotubule agent, mebendazole, on the secretory activity of intestinal cells of *Ascaridia galli*. *Protoplasma*, 105, 69–76.

Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., Fernandez de Corres, L. i Kennedy, M. W. (2002): *Anisakis simplex*: dangerous- dead and alive? *Trends in Parasitology*, 18, 20–25.

Audicana, M. T. i Kennedy, M. W. (2008): *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 360–379.

Baird, F. J., Gasser, R. B., Jabbar, A. i Lopata, A. L. (2014): Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes*, 28, 167–174.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. i Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446 – 475.

Bao, M., Pierce, G. J., Pascual, P., González-Muñoz, M., Mattiucci, S. Mladineo, I., Cipriani, P., Bušelić, I. i Strachan, N. J. (2017): Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Scientific Reports*, 7, 43699.

Barbuzza, O., Guarneri, F., Galtieri, G., Gangemi, S. i Vaccaro, M. (2009): Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis*, 60, 239–240.

Barrera, P., Sulsen, V. P., Lozano, E., Rivera, M., Beer, M. F., Tonn, C., Martino, V. S. i Sosa, M. A. (2013): Natural sesquiterpene lactones induce oxidative stress in *Leishmania mexicana*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 163404.

Bartikova, H., Hanusova, V., Skalova, L., Ambroz, M. i Bousova, I. (2014): Antioxidant, Pro-Oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14, 2478–2494.

Bello, E., Paoletti, M., Webb, S. C., Nascetti, G. i Mattiucci, S. (2020): Cross-species utility of microsatellite loci for the genetic characterisation of *Anisakis berlandi* (Nematoda: Anisakidae). *Parasite*, 27, 9.

Berland, B. (1961): Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2, 1–50.

Blažeković, K., Lepen Pleić, I., Đuras, M., Gomerčić, T. i Mladineo, I. (2015): *Anisakis* spp. isolated from toothed whales stranded along the eastern Adriatic Sea coast. *International Journal for Parasitology*, 45, 17–31.

Bourguinat, C., Keller, K., Xia, J., Lepage, P., McTier, T. L., Woods, D. J. i Prichard, R. K. (2017): Genetic profiles of ten *Dirofilaria immitis* isolates susceptible or resistant to macrocyclic lactone heartworm preventives. *Parasites & Vectors*, 10, 504.

Broglia, A. i Kapel, C. (2011): Changing dietary habits in a changing world: emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 182, 2–13.

Buchmann, K. i Mehrdana, F. (2016): Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology*. 4, 13–22.

Bughio, N. I., Faubert, G. M. i Prichard R. K. (1991): Identification of tubulin isoforms in different tissues of *Ascaris suum* using anti-tubulin monoclonal antibodies. *International Journal for Parasitology*, 21, 913–918.

Cipriani, P., Sbaraglia, G. L., Paoletti, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Bušelić, I., Mladineo, I., Cheleschi, R., Nascetti, G. i Mattiucci, S. (2018): *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy *Engraulis encrasicolus* from the Mediterranean Sea: Fishing ground as a predictor of parasite distribution. *Fisheries Research*, 202, 59–68.

Cole, S. P. i Deeley, R. G. (1998): Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays*, 20 (11), 931–940.

Cole, S. P. i Deeley, R. G. (2006): Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27 (8), 438–446.

Coles, G. C. (2006): Drug resistance and drug tolerance in parasites. *Trends in Parasitology*, 22, 348.

Cotoras, M., Castro, P., Vivanco, H., Melo, R. i Mendoza, L. (2013): Farnesol induces apoptosis-like phenotype in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 105, 28–33.

Cox, G. N., Kusch, M. i Edgar, R. S. (1981): Cuticle of *C. elegans*: Its isolation and partial characterization. *Journal of Cell Biology*, 90, 7–17.

Crellen, T., Walker, M., Lamberton, P. H. L., Kabatereine, N. B., Tukahebwa, E. M., Cotton, J. A. i Webster, J. P. (2016): Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration. *Clinical Infectious Diseases*, 63, 1151–1159.

Cvilink, V., Lamka, J. i Skálová, L. (2009): Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*, 41, 1, 8–26.

Dalzell, A. M., Mistry, P., Wright, J., Williams, F. M. i Brown, C. D. A. (2015): Characterization of multidrug transporter-mediated efflux of avermectins in human and mouse neuroblastoma cell lines. *Toxicological Letters*, 235, 189–198.

Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J. M. i López-Serrano, M. C. (2000): Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 105, 176–181.

Daschner, A., Cuéllar, C. i Rodero, M. (2012): The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*, 28, 9–15.

Dassa, E. i Bouige, P. (2001): The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in microbiology*, 152(3), 211–229.

Davey, J. T. (1971): A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridida). *Journal of Helminthology*, 45, 51–72.

Deardorff, T. L., Kayes, S. G. i Fukumura, T. (1991): Human anisakiasis transmitted by marine food products. *Hawaii Medical Journal*, 50, 9–16.

Didier, A. i Loor, F. (1996) The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs*, 7, 745–751.

Diez, G., Chust, G., Andonegi, E., Santurtún, M., Abaroa, C., Bilbao, E., Maceira, A. i Mendibil, I. (2022): Analysis of potential drivers of spatial and temporal changes in anisakid larvae infection levels in European hake, *Merluccius merluccius* (L.), from the North-East Atlantic fishing grounds. *Parasitology Research*, 121 (7), 1903–1920.

Dziekońska-Rynko, J., Rokicki, J. i Jabłonowski, Z. (2002): Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex* *in vitro* and in guinea pigs. *Journal of Parasitology*, 88, 395–398.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2010): Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8, 1543.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2014): Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiological Risk Assessment Series*, Series No. 23, Rome, Italy, 324.

Ferreira, F. M., Palmeira, C. M., Oliveira, M. M., Santos, D., Simões, A. M., Rocha, S. M., Coimbra, M. A. i Peixoto F. (2012): Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology In Vitro*, 26, 189–196.

Finney, M. i Ruvkun, G. (1990): The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*. *Cell*, 63, 895–905.

Fujimoto, D. i Kanaya, S. (1973): Cuticlin: A noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 157 (1), 1–6.

Furtado, L. F. V., Medeiros, C. d S., Zuccherato, L. W., Alves, W. P., de Oliveira, V. N. G. M., da Silva, V. J., Miranda, G. S., Fujiwara, R. T. i Rabelo, É. M. L. (2019): First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. *PLoS ONE*, 14, e0224108.

Garcia, S. M., Kolding, J., Rice, J., Rochet, M.-J., Zhou, S., Arimoto, T., Beyer, J. E., Borges, L., Bundy, A. i Dunn, D. (2012): Reconsidering the consequences of selective fisheries. *Science*, 335, 1045-1047.

Garcia-Bustos, J. F., Sleebs, B. E. i Gasser, R. B. (2019): An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. *Parasites & Vectors*, 12, 306–306.

Geary, T. G. (2016): Chemotherapy of Parasitic Infections and Infestations. Reference Module in Biomedical Sciences.

Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., di Regalbono, A. F., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Vanimisetti, H. B., Bartram, D. J. i Denwood, M. J. (2015): Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5, 163–171.

Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A. i Panebianco, A. (2014): Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Experimental Parasitology*, 142, 7–10.

Gomes, K. M., Quiazon, M., Kotake, Y., Fujise, H., Ohizumi, N., Itoh, T. i Yoshinaga., T. (2021): *Anisakis* spp. in toothed and baleen whales from Japanese waters with notes on their potential role as biological tags. *Parasitology International*, 80, 102228.

Guardone, L., Armani, A., Nucera, D., Costanzo, F., Mattiucci, S. i Bruschi, F. (2018): Human anisakiasis in Italy: a retrospective epidemiological study over two decades. *Parasite*, 25, 41.

Gutiérrez-Galindo, J. F., Osanz-Mur, A. C. i Mora-Ventura, M. T. (2010): Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from Tarragona (NE Spain). *Food Control*, 21, 1550–1555.

Hada, T., Shiraishi, A., Furuse, S., Inoue, Y., Hamashima, H., Matsumoto, Y., Masuda, K., Shiojima, K. i Shimada, J. (2003): Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Nature Medicine*, 57, 64–67.

Hamdoun, A. M., Cherr, G. N., Roepke, T. A. i Epel, D. (2004): Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Developmental Biology*, 276, 452–462.

Helm, R., Selkrik, M. E., Bradley, J. E., Burns, R. G., Hamilton, A. J., Croft, S. i Maizels, R. M. (1989): Localization and immunogenicity of tubulin in the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Parasite Immunology*, 11, 479–502.

Herrador, Z., Daschner, A., Perteguer, M. J. i Benito, A. (2018): Epidemiological scenario of anisakidosis in Spain based on associated hospitalizations: the tipping point of the iceberg. *Clinical Infectious Diseases*, 853.

Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P. i Navarro, M. C. (2004): *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine*, 11, 77–82.

Hochberg, N. S. i Hamer, D. H. (2010): Anisakidosis: perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases*, 51 (7), 806–812.

Hoet, S., Stevigny, C., Hérent, M.-F. i Quetin-Leclercq, J. (2006): Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, 72.

Holden-Dye, L. i Walker, R. J. (2014): Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. U WormBook (ur.), The *C. elegans* Research Community. WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.2, dostpno na <http://www.wormbook.org>.

Horbowy, J., Podolska, M. i Nadolna-Altyn, K. (2016): Increasing occurrence of anisakid nematodes in the liver cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea: Does infection affect the condition and mortality of fish? *Fisheries Research*, 179, 98–103.

Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J. i Jacobson, J. (2008): Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118 (4) 1311–21.

Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. i Shimada, J. (2004): The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 325–331.

Isman, M. B. i Grieneisen, M. L. (2013): Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science*, 19, 1–6.

James, C. E., Hudson, A. L. i Davey, M. W. (2007): Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*, 25: 328–335.

Jimenez Castro, P. D., Howell, S. B., Schaefer, J. J., Avramenko, R. W., Gilleard, J. S. i Kaplan R. M. (2019): Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: An emerging threat? *Parasites & Vectors*, 12, 576.

Jones, P. M. i George A. M. (2004): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 682–699.

Kampkötter, A., Pielarski, T., Rohrig, R., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W. i Kahl, R. (2007): The *Ginkgo biloba* extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research*, 55 (2), 139–47.

Kassai, T., Cordero del Campillo, M., Euzeby, J., Gaafar, S., Hiepe, T. i Himonas, C. A. (1988): Standardized nomenclature of animal parasite diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*, 29, 299–326.

Keiser, J., i Utzinger, J. (2010): The drugs we have and the drugs we need against major helminth infections. *Advances in Parasitology*, 73, 197–230.

Knopp, S., Steinmann, P., Keiser, J. i Utzinger, J. (2012): Nematode infections: soil-transmitted helminths and *Trichinella*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 341–358.

Köhler, P. (2001): The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal of Parasitology*, 31, 336–345.

Krishna, R. i Mayer, L. D. (2000): Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (4), 265–283.

Krücken, J., Fraundorfer, K., Mugisha, J. C., Ramünke, S., Sit, K. C., Geus, D., Habarugira, F., Ndoli, J., Sendegeya, A. i Mukampunga, C. (2017): Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7, 262–271.

Kurelec, B. (1992): The Multixenobiotic Resistance Mechanism in Aquatic Organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 22, 23–43.

Kurelec, B. (1997): A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 105 (4), 855–860.

Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S. i Api, A. M. (2008): Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food And Chemical Toxicology*, 46, 247–250.

Lara, D. (2003): Anthelmintic resistance: Origin, development and control. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 4 (1), 55–71.

Leathwick, D. M. (2012): Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination. *Veterinary Parasitology*, 186: 93–100.

Leprohon, P., Légaré, D. i Ouellette, M. (2011): ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. *Essays in Biochemistry*, 50, 121–144.

Lespine, A., Dupuy, J., Orlowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P. i Alvinerie, M. (2006): Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chemico-Biological Interactions*, 159, 169–179.

Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orlowski, S. i Alvinerie, M. (2007): Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure- affinity relationship. *European Journal of Pharmacological Science*, 30, 84–94.

Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C. i Prichard, R. K. (2012): P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 58–75.

Li, S. W., Shiao, S. H., Weng, S. C., Liu, T. H., Su, K. E. i Chen, C. C. (2015): A case of human infection with *Anisakis simplex* in Taiwan. *Gastrointestinal Endoscopy*, 82 (4), 757–758.

- Lin, M., Chen, C. Y., Lee, J. D., Lu, C. M., Chung, L. Y. i Yen, C. M. (2010): Larvicidal Constituents of *Zingiber officinale* (Ginger) against *Anisakis simplex*. *Planta Medica*, 76, 1852–1858.
- Lin, R.-J., Yen, C.-M., Chou, T.-Z., Chiang, F.-Y., Wang, G.-H., Tseng, Y-P., Wang, L., Huang, T.-W., Wang, H.-C., Chan, L.-P., Ding, H.-Y. i Liang, C.-H. (2013): Antioxidant, anti-adipocyte differentiation, antitumor activity and anthelmintic activities against *Anisakis simplex* and *Hymenolepis nana* of yakuchinone A from *Alpinia oxyphylla*. *BMC complementary and Alternative Medicine*, 13, 237.
- Liu, P., Deng, B., Long, C.-A. i Min, X. (2009): Effect of farnesol on morphogenesis in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Annals of Microbiology*, 59, 33–38.
- Liu, S. S., Liu, G. H., Zhu, X. Q. i Weng, Y. B. (2015): The complete mitochondrial genome of *Pseudoterranova azarasi* and comparative analysis with other anisakid nematodes. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 293–298.
- Liu, M., Panda, S. K. i Luyten, W. (2020): Plant-based natural products for the discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules*, 10, 426.
- López, V., Cascella, M., Benelli, G., Maggi, F. i Gómez-Rincón, C. (2018): Green drugs in the fight against *Anisakis simplex*—larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. *Parasitology Research*, 117, 861–867.
- Lunneryd, S. G., Boström, M. K. i Aspholm, P. E. (2015): Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in grey seals (*Halichoerus grypus*), cod (*Gadus morhua*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) in the Baltic Sea. *Parasitology Research*, 14 (1), 257–264.
- Ma, J., Zhou, C., Li, Y. i Li, X. (2014): Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 31–35.

Machida, K., Tanaka, T., Fujita, K. i Taniguchi M. (1998): Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180, 4460–4465.

Martin-Carrillo, N., García-Livia, K., Baz-González, E., Abreu-Acosta, N., Dorta-Guerra, R., Valladares, B. i Foronda, P. (2022): Morphological and Molecular Identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Commercial Fish from the Canary Islands Coast (Spain): Epidemiological Data. *Animals*, 12 (19), 2634.

Mattiucci, S., Abaunza, P., Ramadori, L. i Nascetti, G. (2004): Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *Journal of Fish Biology*, 65, 495–510.

Mattiucci, S., Paoletti, M. i Webb, S. C. (2009): *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, 74, 199–217.

Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., Paoletti, M., Salomone Megna, A., Glielmo, A., De Angelis, M., Costa, A., Meucci, C., Calvaruso, V., Sorrentini, I., Palma, G., Bruschi, F. i Nascetti, G. (2013): Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 496–499.

Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B. (2014): Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 100, 199–214.

Mattiucci, S., Cipriani, P., Paoletti, M., Levsen, A. i Nascetti, G. (2017): Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the north-East Atlantic Ocean. *Journal of Helminthology*, 91(4), 422–439.

Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M. i Nascetti, G. (2018): Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: an ecological and evolutionary road map. *Advances in Parasitology*, 99, 93–263.

Mattiucci, S., Bello, E., Paoletti, M., Webb, S. C., Timi, J. T., Levsen, A., Cipriani, P. i Nascetti, G. (2019): Novel polymorphic microsatellite loci in *Anisakis pegreffii* and *A. simplex* (s.s.) (Nematoda: Anisakidae): Implications for species recognition and population genetic analysis. *Parasitology*, 146, 1387–1403.

Mazzucco, W., Raia, D. D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F. i Casuccio, A. (2018): *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. *PLoS ONE*, 13 (9), e0203671.

Mehrdana, F., Bahlool, Q. Z., Skov, J., Marana, M. H., Sindberg, D., Mundeling, M., Overgaard, B. C., Korbut, R., Strøm, S. B., Kania, P. W. i Buchmann, K. (2014): Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Veterinary Parasitology*, 205, 581–587.

Messina, C. M., Pizzo, F., Santulli, A., Bušelić, I., Boban, M., Orhanović, S. i Mladineo, I. (2016): *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. *Parasites & Vectors*, 9, 1–10.

Mladineo, I., Šimat, V., Miletić, J., Beck, R. i Poljak, V. (2012): Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea, *International Journal of Food Microbiology*, 157, 224–229.

Mladineo, I. i Poljak, V., (2014): Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. From Adriatic commercial fish species. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1281-1290.

Mladineo, I., Poljak, V., Martínez-Sernández, V. i Ubeira, M. F. (2014): Anti-*Anisakis* IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2673.

Mladineo, I., Popovic, M., Drmic-Hofman, I. i Poljak, V. (2016): A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. *BMC Infectious Diseases*, 16, 42.

Mladineo, I., Bušelić, I., Hrabar, J., Vrbatović, A. i Radonić, I. (2017): Population parameters and mito-nuclear mosaicism of *Anisakis* spp. in the Adriatic Sea. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 212, 46–54.

Molyneux, D. H., Hopkins, D. R. i Zagaria, N. (2004): Disease eradication, elimination and control: the need for accurate and consistent usage. *Trends in Parasitology*, 20, 347–351.

Moneo, I., Caballero, M. L., Gonzalez-Munoz, M., Rodriguez-Mahillo, A. I., Rodriguez-Lopez, R. i Silva, A. (2005): Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*, 96, 285–289.

Montalto, M., Miele, L., Marcheggiano, A., Santoro, L., Curigliano, V., Vastola, M. i Gasbarrini, G. (2005): *Anisakis* infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis. *Digestive and Liver Disease*, 37 (1), 62–64.

Moore, D. A., Girdwood, R. W. i Chiodini, P. L. (2002): Treatment of anisakiasis with albendazole. *Lancet*, 360, 9326, 54.

Moschella, C. M., Mattiucci, S., Mingazzini, P., De Angelis, G., Assenza, M., Lombardo, F., Monaco, S., Paggi, L., Modini, C. (2004): Intestinal anisakiasis in Italy: case report. *Journal of Helminthology*, 78 (3), 271–273.

Navarro-Moll, M. C., Romero, M. C., Montilla, M. P. i Valero, A. (2011): *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. *Experimental Parasitology*, 127, 405–408.

Newell, D., Koopmans, M., Verhoef, L. (2010): Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persists while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (145), 493.

Nieuwenhuizen, N. E. i Lopata, A. L. (2013): *Anisakis* – a food-borne parasite that triggers allergic host defences. *International Journal for Parasitology*, 43, 1047-1057.

Nixon, S. A., Welz, C., Woods, D., Costa-Junior, L., Zamanian, M. i Martin, R. (2020): Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 762.

Orphanet (2016): Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data. Orphanet Report Series, 1. Available at: http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf

Osei-Atweneboana, M. Y., Awadzi, K., Attah, S. K., Boakye, D. A., Gyapong, J. O. i Prichard, R. K. (2011): Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e998.

Ozben, T. (2006): Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters*, 580 (12), 2903–2909.

Papadopoulos, E., Gallidis, E. i Ptochos, S. (2012): Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A 509 selected review. *Veterinary Parasitology*, 189 (1), 85–88.

Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W. i Choi I. G. (2009): Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*. 80, 290–296.

Parreira, N. A., Magalhaes, L. G., Morais, D. R., Caixeta, S. C., de Sousa, J. P., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Silva, M. L., Nanayakkara, N. P., Rodrigues, V. i da Silva Filho, A. A. (2010): Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 993–1001.

Pascual, S., Rodríguez, H., Pierce, G. J., Hastie L. C. i González, A. F. (2018): The NE Atlantic European hake: a neglected high exposure risk for zoonotic parasites in European fish markets. *Fisheries Research*, 202, 69–78.

Peres, V. F., Moura, D. J., Sperotto, A. R. M., Damasceno, F. C., Caramao, E. B., Zini, C. A. i Saffi, J. (2009): Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 9.

Pérez, M. G. M., Moll, C. N., Espinosa, G. M. i López, A. V. (2016): Evaluation of different Mediterranean essential oils as prophylactic agents in anisakidosis. *Pharmaceutical Biology*, 55, 456–461.

Pessoa-Pureur, R., Heimfarth, L. i Rocha, J. B. (2014): Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 458601.

Polak, I., Stryński, R., Podolska, M., Pawlak, J., Bittner, M. W., Wiśniewski, G., Sienkiewicz-Szłapka, E. i Łopieńska-Biernat, E. (2022): Drug efficacy on zoonotic nematodes of the Anisakidae family: new metabolic data. *Parasitology*, 149, 1065–1077.

Pozio, E. (2013): Integrating animal health surveillance and food safety: the example of *Anisakis*. *Revue scientifique et technique*, 32, 487–496.

Pravettoni, V., Primavesi, L. i Piantanida, M. (2012): *Anisakis simplex*: current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 44, 150–156.

Preston, S., Jiao, Y., Baell, J. B., Keiser, J., Crawford, S., Koehler, A. V., Wang, T., Simpson, M. M., Kaplan, R. M. i Cowley, K. J. (2017): Screening of the ‘Open Scaffolds’ collection from compounds Australia identifies a new chemical entity with anthelmintic activities against different developmental stages of the barber’s pole worm and other parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7, 286–294.

Prichard, R. K. (2007): Ivermectin resistance and overview of the Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 2: 41–52.

Prichard, R. K., Hall, C. A., Kelly, J. D., Martin, I. C. i Donlad, A. D. (1980): The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56 (5): 239–51.

Prichard, R. K. i Roulet, A. (2007): ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134, 1123–32.

Ramilo, H., Rodríguez, S., Pascual, Á. F., González, E. i Abollo, E. (2023): Population genetic structure of *Anisakis simplex* infecting the european hake from north east Atlantic fishing grounds. *Animals*, 13 (2), 197.

Repiso, O. A., Alcántara, T. M., González, F. C., de Artaza, V. T., Rodríguez, M. R., Valle Muñoz, J. i Martínez Potenciano, J. L. (2003): Gastrointestinal anisakiasis. Study of a series of 25 patients. *Gastroenterology & Hepatology*, 26 (6), 341–346.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. i Gerhard, D. (2015): Dose-response analysis using R. *PLoS One*, 10 (12).

Rodríguez, H., González, Á. F., Abollo, E. i Pascual, S. (2018): Re-evaluation of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) as an important risk factor for sensitization to zoonotic nematodes in Spain. *Fisheries Research*, 202, 49–58.

Silva, M. P., Oliveira, G. L., de Carvalho, R. B., de Sousa, D. P., Freitas, R. M., Pinto, P. L. i de Moraes J. (2014): Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*, 19, 3793–3803.

Sánchez-Monsalvez, I., de Armas-Serra, C., Martínez, J., Dorado, M., Sánchez, A. i Rodríguez-Caabeiro, F. (2005): A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. *Journal of Food Protection*, 68, 1066–1072.

Saunders, G. I., Wasmuth, J. D., Beech, R., Laing, R., Hunt, M., Naghra, H., Cotton, J. A., Berriman, M., Britton, C. i Gilleard, J. C. (2013): Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* beta-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. *International Journal for Parasitology*, 43, 465–75.

Schulz, J. D., Moser, W., Hürlimann, E. i Keiser, J. (2018): Preventive chemotherapy in the fight against soil-transmitted helminthiasis: achievements and limitations. *Trends in Parasitology*, 34, 590–602.

Shalaby, H. A. (2013): Anthelmintics resistance; how to overcome it? *Iranian Journal of Parasitology*, 8, 18–32.

Shamsi, S. i Sheorey, H. (2018): Seafood-borne parasitic diseases in Australia: are they rare or underdiagnosed? *Internal Medicine Journal*, 48, 591–596.

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A. i Iriti, M. (2017): Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22, 70.

Sharma, H., Sehgal, R., Shekhar, N., Kaur, U. i Medhi, B. (2022): Antiparasitic effect of Farnesol against *Leishmania major*: a rationale from *in vitro* and *in silico* investigations. *Preprints 2022*, 2022120458.

Shimamura, Y., Muwanwella, N., Chandran, S., Kandel, G. i Marcon, N. (2016): Common symptoms from an uncommon infection: gastrointestinal anisakiasis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1–8.

Sukswai, N. i Khoury, J. D. (2019): Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 14 (5), 368–375.

Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. i Gottesman, M. M. (2006): Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5 (3), 219–234.

Špičáková, A., Szotáková, B., Dimunová, D., Myslivečková, Z., Kubíček, V., Ambrož, M., Lněničková, K., Krasulová, K., Anzenbacher, P. i Skálová L. (2017): Nerolidol and farnesol

inhibit some cytochrome p450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules*, 22 (4), 509.

Takabayashi, T., Mochizuki, T., Otani, N., Nishiyama, K. i Ishimatsu, S. (2014): Anisakiasis presenting to the ED: clinical manifestations, time course, hematologic tests, computed tomographic findings, and treatment. *American Journal of Emergency Medicine*, 32 (12), 1485–9.

Tao, R., Wang C.-Z., Kong Z.-W. (2013): Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyprenols and other lipids isolated from *Ginkgo biloba* L. leaves. *Molecules*, 18, 2166–2182.

Togashi, N., Hamashima, H., Shiraishi, A., Inoue, Y. i Takano, A. (2010): Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. *Journal of Essential Oil Research*, 22, 263–269.

Urbatsch, I. L., Tyndall, G. A., Tomblin, G. i Senior, A. E. (2003): P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23171–23179.

Valero, A., Romero, M. C., Gómez-Mateos, M., Hierro, I. i Navarro, M. C. (2015): Natural products: perspectives in the pharmacological treatment of gastrointestinal anisakiasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 612–617.

Valls, A., Pascual, C. Y. i Esteban, M. M. (2005): Anisakis allergy: an update. *La Revue Française d'Allergologie*, 45, 108–113.

Van den Bossche, H., Rochette, F. i Horig, C. (1982): Mebendazole and related anthelmintics. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, 19: 67–128.

Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C. i Vellema, P. (2015): *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209, 278–280.

Van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. i Roskam, R. T. (1960): A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Tropical and Geographical Medicine*, 12, 97–113.

Van Thiel, P. H. (1962): Anisakiasis. *Parasitology*, 52, 16–17.

Vercruysse, J., Albonico, M., Behnke, J. M., Kotze, A. C., Prichard, R. K., McCarthy, J. S., Montresor, A. i Levecke, B. (2011): Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 1, 14–27.

Verdú, J. R., Cortez, V., Ortiz, A. J., González-Rodríguez, E., Martínez-Pinna, J., Lumaret, J. P., Lobo, J. M., Numa, C. i Sánchez-Piñero, F. (2015): Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Scientific Reports*, 5, 13912.

Villazanakretzer, D. L., Napolitano, P. G., Cummings, K. F. i Magann E., F. (2016): Fish parasites: a growing concern during pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 71, 253–259.

Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Rhodes, A. P., Lawrence, K. E., Jackson, R., Pomroy, W. E., West, D. M. i Moffat, J. R. (2006): Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54, 271–277.

Wagil, M., Białk-Bielińska, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Mulkiewicz, E., Kumirska, J., Stepnowski, P. i Stolte, S. (2015.): Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2566–2573.

Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y. i Wei, X. (2014): Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 106 (5), 881–888.

Wickham, H. (2009): *Ggplot2—elegant graphics for data analysis*. Springer, New York, NY.

Wilke, C. (2017): Cowplot: Streamlined plot theme and plot annotations for “ggplot2.” R package version 0.8.0.

Wilkinson, R., Law, C. J., Hoey, E. M., Fairweather, I., Brennan, G. P. i Trudgett, A. (2012): An amino acid substitution in *Fasciola hepatica* P-glycoprotein from triclabendazole-resistant and triclabendazole-susceptible populations. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 186 (1), 69–72.

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. i Sangster, N. C. (2004): Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20, 469–476.

Wolstenholme, A. J., Evans, C. C., Jimenez, P. D. i Moorhead, A. R. (2015): The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, 142, 1249–1259.

World Health Organization (2008): Soil-transmitted helminths. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/intestinal_worms/en.

World Health Organization (2012): Soil-transmitted helminths. World Health Organization.

World Health Organization (2017): The selection and use of essential medicines. WHO Technical Report Series, 1006:1–604.

World Health Organization. (2019): PCT databank: Soil-transmitted helminthiases: WHO; https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html.

Yeh, D. Y. W., Yang, Y. C. i Wangm J. J. (2015): Hepatic warm ischemia-reperfusion-induced increase in pulmonary capillary filtration is ameliorated by administration of a multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor and leukotriene D4 antagonist (MK-571) through reducing neutrophil infiltration. *Transplantation Proceedings*, 47, 1087–1091.

Yorimitsu, N., Hiraoka, A., Utsunomiya, H., Imai, Y., Tatsukawa, H., Tazuya, H., Yamago, Y., Shimizu, S., Hidaka, T., Tanihira, A., Hasebe, Y., Miyamoto, T., Ninomiya, M., Abe, Y., Hiasa,

B., Matsuura, M., Onji, K. i Michitaka, I. (2013): Colonic intussusception caused by anisakiasis: a case report and review of the literature. *Internal Medicine*, 52, 223–226.

Zuo, S., Al-Jubury, A., Korbut, R., Christensen, N. H., Kania, P. W. i Buchmann, K. (2016): Host size dependent infection dynamics of *Contracaecum osculatum* (Nematoda, anisakidae) in Baltic cod (*Gadus morhua*) associated with differential food preferences. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120, 69–75.

Zurgil, N., Solodeev, I., Gilburd, B., Shafran, Y., Afrimzon, E., Avtalion, R., Shoenfeld, Y. i Deutsch, M. (2004): Monitoring the apoptotic process induced by oxidized low-density lipoprotein in jurkat T-lymphoblast and U937 monocytic human cell lines. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 40, 97–113.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Romana Roje Busatto (18. veljače 1976., Split)

Radno mjesto, poslovi i odgovornosti:

- Analitičar u Nacionalnom referentnom laboratoriju za morske biotoksine, akreditiranom prema ISO 17025, Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša pri Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu (2012. –):
Aktivno sudjelovanje u implementaciji, validaciji i akreditaciji referentne HPLC-FLD metode Europske Unije za određivanje morskih biotoksina (AOAC 2005.06); Kvalitativno i kvantitativno određivanje morskih biotoksina metodama HPLC-DAD-UV-FLD i LC-MS/MS: tetradotoksini, gimnodimini i spirolidi, lipofilni toksini, paralitički toksini, domoična kiselina, te i bisfenol A, PAH-ovi, pigmenti u ribljim tkivima i antihelmintici u *Anisakis* ličinkama; pisanje znanstvenih radova, sudjelovanje u znanstvenim i stručnim projektima i službenim programima praćenja morskih biotoksina; aktivno godišnje sudjelovanje u *Proficiency* testovima Europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine.

- Službeni izvjestitelj za Okvirnu direktivu o morskoj strategiji Europske komisije (MSFD, 2008/56/EC), Europske unije, pri Referentnom centru za more Hrvatske agencije za okoliš i prirodu kroz radne skupine DIKE (Data, Information and Knowledge Exchange) i GES (Good Environmental Status), (2012. – 2018.):
Prikupljanje, objedinjavanje, upravljanje bazama podataka i kontrola kvalitete podataka o stanju ribarstva, marikulture i morskog okoliša, te ažuriranje okolišnih, bioloških, fizičkih i kemijskih pokazatelja; priprema službenih izvješća u skladu s obvezama iz nacionalnih i EU zakonodavstava za Europsku agenciju za zaštitu okoliša (EEA); aktivno sudjelovanje na sastancima u Briselu u aktivnostima Radne skupine DIKE pri Europskoj komisiji za potrebe izvještavanja prema Europskoj informacijskoj i promatračkoj mreži za okoliš (EIONET, 2017/848 EU) vezano za procjenu i utvrđivanje dobrog stanja okoliša (čl. 8. i 9.), pripadajuće ciljeve i pokazatelje (čl. 10.), te uz obveze monitoring programa (čl. 11.) ODMS-a (MSFD, 2008/56/EC i 2017/845/EU);

Zvanje:

Master of Science in Marine Biodiversity and Conservation

(hrv. *Magistar znanosti bioraznolikosti i zaštite mora*)

Združena diploma (priznata od hrvatske Agencije za znanost i visoko obrazovanje): Ghent University (Belgium), University of Bremen (Germany), University of the Algarve (Portugal), University of Oviedo (Spain), University of Klaipėda (Lithuania) and Sorbonne University (ex. University Pierre and Marie Curie - Paris 6; France)

Obrazovanje:

➤ 2010 Erasmus Mundus

Master of Science in Marine Biodiversity and Conservation

Magistrirala na **Universiteit Gent, Belgija** (vrlo dobar uspjeh)

Predavanja pohađala na:

- 1. i 2. semestar na Centro de Ciências do Mar (CCMAR); Faculdade de Ciências e Tecnologia, **Universidade do Algarve, Portugal**
 - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR, Universidade do Porto
- 3. semestar na Faculté des Sciences et Ingénierie, **Sorbonne Université, Pariz, Francuska** (ex Université Pierre et Marie Curie Paris-VI)
 - Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, CNRS/UPMC, Villefranche-sur-mer, Francuska
 - Observatoire océanologique de Banyuls sur Mer, Laboratoire ARAGO, Banyuls-sur-Mer, Francuska
- Ljetna škola pri Hel Island Marine Station, Poland Institute of Oceanography, **University of Gdańsk, Poljska** (dr. Herman Hummel, MarBEF)
- 4. semestar i magistarski rad: obranjen na **Universiteit Gent, Belgija**, a odrađen u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša pri Institutu za oceanografiju i ribarstvo, Split, Hrvatska

Magistarski rad pod nazivom "PSP toxins profile along the Croatian Adriatic coast", izrađen pod mentorstvom dr. Ivana Ujević (Institute of Oceanography and Fisheries, Split, Croatia), dr. Marleene De Troch (University of Ghent, Belgium) i prof. dr. Jean-Marc Guarini (Sorbonne Université, Pariz, Francuska).

- 2007. godine završila (bez ponavljanja godine, s prosjekom ocjena 4,405) **studij Biologije i ekologije mora** na Sveučilišnom studijskom centru za studije mora Sveučilišta u Splitu, te stekla **stručnu spremu sedmog (VII/1) stupnja** i stručni naziv **diplomiranog inženjera Biologije i ekologije mora**. Diplomski rad na temu "Histopatološki utjecaj kupke malahit zelenila na organe i tkiva lubina (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758)" izradila u Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu (mentor: dr. sc. Ivona Mladineo).

Nagrade i priznanja:

- 2016. ISSHA travel award for ICHA 17
- 2008. – 2010. Erasmus Mundus M.Sc. scholarship (EMBC), Stipendija Europske komisije (45.000 eura)
- 2000. – 2004. Stipendija Ministarstva znanosti i tehnologije za nadarene studente na diplomskom studiju

Medunarodni znanstveni radovi, registrirani u Current Contents-u:

- Abrogueña, Jeff Bogart R.; Tanita, Iwao; Anton, Andrea; Maquirang, Jean Rose H.; Duarte, Carlos; Woo, Sau Pinn; Berković, Buga; Roje-Busatto, Romana; Yacoubi, Lamia; Doyle, Anthony; Konji, Hatem; Al-Johani, Thamer; Chen, Jia-Lun; Rabaoui, Lotfi J. Influence of environmental variables on the abundance of *Synapta maculata* (Holothuroidea: Synaptidae) in a multi-species seagrass meadow in the southern Red Sea of Saudi Arabia. // Regional Studies in Marine Science. (2023); 103133 (if: **2.100**).

- El Rahman Hassoun, Abed; Ujević, Ivana; Mahfouz, Céline; Fakhri, Milad; Roje-Busatto, Romana; Jemaa, Sharif; Nazlić, Nikša. Occurrence of domoic acid and cyclic imines in marine biota from Lebanon– Eastern Mediterranean Sea. // *Science of the Total Environment* (2021); 755 (1) 142542 (if= **10.754**).

- Anđelić, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Ujević, Ivana; Vuletić, Nenad; Matijević, Slavica. Distribution of Bisphenol A in sediment and suspended matter and its possible impact on marine life in Kaštela Bay, Adriatic Sea, Croatia. // *Journal of Marine Science and Engineering*. 8 (2020); 480 (if= **2.033**).

- Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana (dopisni autor); Ezgeta-Balić, Daria. Comparison of amnesic, paralytic and lipophilic toxins profiles in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and smooth clam (*Callista chione*) from the central Adriatic Sea (Croatia). // *Toxicon*. 159 (2019); 32-37 (if= **2.276**).

- Mladineo, Ivona; Trumbić, Željka; Hrabar, Jerko; Vrbatović, Anamarija; Bušelić, Ivana; Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Babić, Ivana; Messina, Concetta. Efficiency of target larvicides is conditioned by ABC-mediated transport in the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii*.// *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2018) AAC.00916-18, (if= **4.715**).

- Bošnjak, Ivana; Borra, Marco; Iamunno, Franco; Benvenuto, Giovanna; Ujević, Ivana; Bušelić, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Mladineo, Ivona. Effect of bisphenol A on P-glycoprotein-mediated efflux and ultrastructure of the sea urchin embryo.// *Aquatic toxicology*. 156 (2014); 21-29 (if= **3.451**).

- Roje-Busatto, Romana; Ujević Ivana. PSP toxins profile in ascidian *Microcosmus vulgaris* (Heller, 1877) after human poisoning in Croatia (Adriatic Sea).// *Toxicon*. 79 (2014); 28-36 (if= **2.492**).

- Ujević, Ivana; Roje, Romana (dopisni autor); Ninčević-Gladan, Živana; Marasović, Ivona. First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia).// *Food Control*. 25 (2012); 285-291 (if= **2.738**).

- Ujević, Ivana; Ninčević-Gladan, Živana; Roje, Romana; Skejić, Sanda; Arapov, Jasna; Marasović, Ivona. Domoic acid– a new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile.// *Molecules*. 15 (2010), 10; 6835-6849; (if= **1.988**).

Međunarodni znanstveni radovi, registrirani u WoS-u:

- El Rahman Hassoun, Abed; Ujević, Ivana; Jemaa, Sharif; Roje-Busatto, Romana; Mahgouz, Celine; Fakhiri, Milad; Nazlić, Nikša.
Concentrations of tetrodotoxin (TTX) and its analogue 4,9-anhydro TTX in different tissues of the silver-cheeked pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*, Gmelin, 1789) Caught in the South-Eastern Mediterranean Sea, Lebanon // *Toxins*, 14 (2022), 123; 1-13. (if= **5.075**)

Poglavlja u knjizi:

- Abed El Rahman Hassoun (dopisni autor), Ivana Ujević, Milad Fakhri, Romana Roje-Busatto (dopisni autor), Céline Mahfouz, Sharif Jemaa; Nikša Nazlić.
Biotoxins in the Mediterranean Sea: Lebanon as a Case Study. U: *Environmental Pollutants in the Mediterranean Sea: Recent Trends and Remediation Approaches / Tamer El-Sayed Ali (ur.)*. Bentham Science Publisher (2023) pp 1–43 (43).
- Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana (dopisni autor); Dragičević, Branko; Dulčić, Jakov. Tetrodotoxin in Invasive Silver-cheeked Toadfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the Adriatic Sea. (2020) U: *The Handbook of Environmental Chemistry/ Joksimović, Danijela; Đurović, Mirko; Zonn, Igor S.; Kostianoy, Andrey G.; Semenov, Aleksander V. (ur.)*. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana. Prirodni toksini u Jadranu (2020)// U: Institut za oceanografiju i ribarstvo– 90 godina otkrivanja tajni Jadrana / Vidjak, Olja (ur.). Split: Institut za oceanografiju i ribarstvo, 129-134.

Poster i sažetci znanstvenih radova objavljenih u zbornicima s domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova: aktivno sudelovanje na znanstvenim skupovima

- Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Ezgeta- Balić, Daria. Lipophilic Toxins profiles in cockle and smooth clam from the central Adriatic Sea (Croatia)// The 18th International Conference on Harmful Algae. Nantes, France, 2018. str. 621 (poster, međunarodna recenzija, sažetak)
- Trumbić, Željka; Bušelić, Ivana; Hrabar, Jerko; Vrbatović, Anamarija; Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Babić, Ivana; Messina, Concetta Maria; Mladineo, Ivona. The role of ABC-mediated transport in biocidal activity of natural and synthetic compounds on *Anisakis pegreffii* larvae// Abstract Book of the 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish/ Mladineo, I. (ur.). Belfast, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2017., str. 39 (međunarodna recenzija, predavanje i sažetak).
- Ujević, Ivana; Roje-Busatto, Romana; Dulčić, Jakov; Pralija, Anka; Dragičević Branko. The concentration of tetrodotoxin (TTX) in invasive species *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the Adriatic Sea (Croatia)// 17th International Conference on Harmful Algae (ICHA), Abstract book, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, 2016. Brazil, str. 127–128 (međunarodna recenzija, poster i sažetak).
- Ujević, Ivana; Roje, Romana; Žure, Marina; Peharda, Melita; Ezgeta-Balić, Daria; Marasović, Ivona. ASP and PSP toxins in cockle (*Acanthocardia tuberculata*) and sweet clam (*Calista chione*) from the Central Adriatic Sea (Croatia)// 15th International Conference on Harmful Algae, Abstract Book, CECO, Gyeongnam, Korea, 2012./ Hak-Gyoon Kim (ur.). 2012. 163 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- Ujević, Ivana; Roje, Romana; Marasović, Ivona. PSP toxin profile along the Croatian Adriatic Sea// 14th International Conference on Harmful Algae (ICHA), Abstract Book, Hersonissos-Crete, Greece, 2010./ Athens (ur.). 235 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Recenzent radova u međunarodnim časopisima:

- Water
- Pharmaceuticals
- Toxins
- Toxicon
- Journal of Marine Science and Engineering
- Forensic Sciences and Digital Investigation
- The European Zoological Journal
- International Journal of Molecular Sciences...