

DOI 10.7251/VETJSR2401005M

UDK 547.48:616.995.132

Originalni naučni rad

EFEKTI MENTOLA I MONEPANTELA NA KONTRAKCIJE IZOLOVANOG NERVNOMIŠIĆNOG PREPARATA *ASCARIS SUUM*

Đorđe S. MARJANOVIĆ¹, Dragana MEDIĆ¹, Tihomir MARIĆ¹, Miodrag JOVANOVIĆ², Stevan MITKOVIĆ², Saša M. TRAILOVIĆ^{1*}

¹ Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

² Toplička akademija strukovnih studija, Prokuplje, Srbija

*Korespondentni autor: Saša M. Trailović, sasa@vet.bg.ac.rs

Sažetak

Parazitske nematode životinja dovode do ozbiljnih poremećaja zdravstvenog stanja, visokih ekonomskih gubitaka u stočarstvu a često su i zoonoze što predstavlja direktnu opasnost po zdravlje ljudi. Prevencija i lečenje parazitskih infekcija obavlja se primenom lekova ali je savremena antiparazitska farmakoterapija suočena sa nekoliko velikih izazova. Razvoj rezistencije parazita, ograničena mogućnost povećanja doza postojećih lekova zbog potencijalne toksičnosti, nedostatak novih antiparazitika i dugačka karenca su razlozi da se sve više istražuje mogućnost antiparazitske primene supstanci biljnog porekla. U ovom radu prikazujemo ispitivanje anthelmintičkog dejstva terpenoida mentola na modelu kontrakcija nervnomišićnog preparata parazitske nematode *Ascaris suum*. Svi lekovi holinergički agonisti (levamizol, pirantel, morantel i dr.), dovode do smrti parazita tako što izazivaju snažnu kontrakciju njihovih mišića. U našem istraživanju mentol sam po sebi nije izazvao promene tonusa nervnomišićnog preparata *Ascaris suum* ali je signifikantno potencirao kontrakcije izazvane acetilholinom i pirantelom, čime je ispoljio karakteristike alosteričnog modulatora nAChR i to posebno L tipa. Ovo povećanje kontraktilnosti je osetljivo na monepantel, antagonistu nAChR. Potencirajući efekt mentola na kontrakcije *Ascaris suum* mogao bi da se iskoristi u kombinovanoj terapiji sa holinergičkim agonistima pirantelom i levamizolom, čime bi im se povećala efikasnost bez povećanja doza a smanjila mogućnost razvoja rezistencije parazita.

Ključne reči: mentol, monepantel, *Ascaris suum*, nAChR.

UVOD

Sve veći zdravstveni problem u veterinarskoj i humanoj medicini su infekcije ljudi i životinja parazitskim nematodama. Valjkasti crvi ili nematode su najrazličitiji od svih vrsta životinja i do sada je opisano preko 80.000 vrsta, od kojih je više od 15.000 parazitskih (Hugot i sar., 2001). Na osnovu podataka Svetske zdravstvene organizacije iz 2018. godine, više od 1,5 milijarde ljudi, ili 24% svetske populacije, inficirano je

barem jednom vrstom crevnih parazita, koje uglavnom uključuju valjkaste crve (*Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura*) i pantljičare (*Necator americanus* i *Ancylostoma duodenale*). Parazitske nematode životinja dovode do ozbiljnih poremećaja zdravstvenog stanja, visokih ekonomskih gubitaka u stočarstvu, a neretko su i zoonoze, odnosno predstavljaju direktnu opasnost po zdravlje ljudi (Paterson i Barber, 2007). Glavni način prevencije i suzbijanja parazitskih infekcija je primena lekova-anthelmintika, ali je savremena antiparazitska farmakoterapija suočena sa nekoliko velikih izazova. Sve veći broj izveštaja odnosi se na rezistenciju parazitskih nematoda prema klasičnim antiparazitskim lekovima. Sa duge strane, za razliku od antimikrobnih lekova, čije su doze bezbedne čak i posle povećanja u cilju suzbijanja rezistencije, povećanje doza antiparazitika često ima za posledicu ispoljavanje toksičnosti. Posebno važna za veterinarsku medicinu je činjenica da većina antiparazitskih lekova zahteva dug period karence posle primene kod životinja čija su tkiva namenjena za ishranu ljudi (Martin i sar., 2004). Ovo su neki od najvažnijih razloga koji su farmakološka istraživanja usmerili prema potencijalnoj primeni biljnih proizvoda, umesto konvencionalnih sintetskih antiparazitskih lekova. Biljke stvaraju esencijalna ili etarska ulja kao organske produkte sekundarnog metabolizma. Esencijalna ulja (odnosno njihovi aktivni principi) su na osnovu farmakoloških karakteristika (antimikrobnih, antiparazitskih i dr.) potencijalno najozbiljniji alternativni lekovi i biocidi. Njihovi aktivni principi su sposobni da efikasno i bezbedno zamene klasične antiparazitske lekove ili da im značajno potenciraju dejstvo, bez potrebe za povećanjem njihove doze.

Mentol je dobro poznato jedinjenje, monoterpenoid, koji se u prirodi nalazi u visokom procentu u etarskom ulju nane (*Mentha piperita*), sa karakterističnim ukusom i mirisom. U literaturi su opisana svojstva mentola kao lokalnog anestetika ali i pozitivna analgetska dejstva na kožu i sluznice (Patel i sar., 2007). U našem ranijem istraživanju pokazali smo da je mentol pozitivni alosterični modulator nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) parazitskih nematoda (*Ascaris suum* i *Oesophagostomum dentatum*) (Choudhary i sar., 2019).

Prošlo je više od 35 godina od otkrića avermektina, poslednje velike grupe efikasnih antiparazitskih lekova. Svi ostali, kasnije otkriveni potencijalni lekovi, uglavnom nisu zadovoljili kriterijume za masovniju upotrebu. Monepantel je predstavnik grupe aminoacetonitrila (AAD), jedne od najnovijih klasa antihelmintika, za koje se smatra, na osnovu istraživanja proizvođača, da deluju kao alosterični modulatori nAChR. U studijama koje su objavljene kasnije, opisuje se da monepantel deluje kao antagonist nAChR (Abongwa i sar., 2018). Specifičan mehanizam dejstva ukazivao je da monepantel može da bude veoma značajan novi lek u farmakoterapiji parazitskih infekcija.

U ovom radu prikazujemo istraživanja dejstva mentola na kontrakcije izolovanog nervnomišićnog preparata *Ascaris suum* (*A. suum*), izazvane sa ACh ili pirantelom, kao i uticaj monepantela na efekat mentola.

MATERIJALI I METODE

Parazitska nematoda svinja *A. suum* je dopremana u termosima sa klanice u okolini Beograda (Ambar), neposredno после чишћења creva i prikupljanja u posebno припремљеном раствору (Lockes solution). Sastav Lockes solution je standardizovan (mM): NaCl 155, KCl 5, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 1.5 i glukoza 5. Nematode su u laboratoriji чуване u istom раствору, koji je одржаван na temperaturi 32-36°C u vodenom kupatilu. Lockes rastvor je менjan svakih 12 sati, tokom 5 dana.

U ispitivanjima su korišćene samo adultne ženke askarisa, jer su većih dimenzija i brojnije su u populaciji parazita. Nervnomišićni preparat za ispitivanje kontrakcija припреман je disekcijom prednjeg dela tela parazita 2 do 3 cm kaudalno od glave. Daljim odsecanjem tkiva između dve crvene linije longitudinalno, dobijan je preparat (segment) uvek istih dimenzija (1cm) koji je dalje korišćen.

Припремљени segmet askarisa постављан je u komoru (kupa tilce) zapremine 20 ml, koja je ispunjena sa Ascaris Perienteric Fluid Ringer/APF Ringer standardnog sastava (mM): NaCl 23, Na-acetat 110, KCl 24, CaCl₂ 6, MgCl₂ 5, glukoza 11, HEPES 5, sa vrednosti pH 7,6. Jedan kraj segmenta pričvršćen je za kukicu na dnu kupatilca, a drugi deo je koncem zakačen za izometrijski transdjuser koji je preko interfejsa i amplifajera povezan sa PC kompjuterom. Kontinuirano mešanje aplikovanih supstanci u kupatilcu obezbeđeno je stalnim ubrizgavanjem ambijentalnog vazduha električnom pumpom za vazduh, pri čemu kretanje mehurića nije uticalo na kontrakcije. Nakon поставljanja u kupatilce i povezivanja sa izometrijskim transdjuserom, preparat je mikrometarskim regulatorom na nosaču transdjusera izložen početnoj tenziji od 0,5-1,0g tokom 15-20 minuta. Kada se osnovni tonus stabilizovao na oko 0,5g, aplikovane su ispitivane supstance a zatim su praćene i merene kontrakcije u realnom vremenu. Kontrakcije su praćene i beležene softverom eLAB 44 (ElUnit, Beograd).

Korišćen je protokol aplikacije rastućih koncentracija ispitivanih supstanci, koje su poznate kao agonisti nikotinskog receptora (acetilholin i pirantel), i supstanci u određenim koncentracijama za koje smo pretpostavili da će efekte ovih supstanci modulisati (mentol i monepantel). После сваке максималне контракције препарат je ispiran.

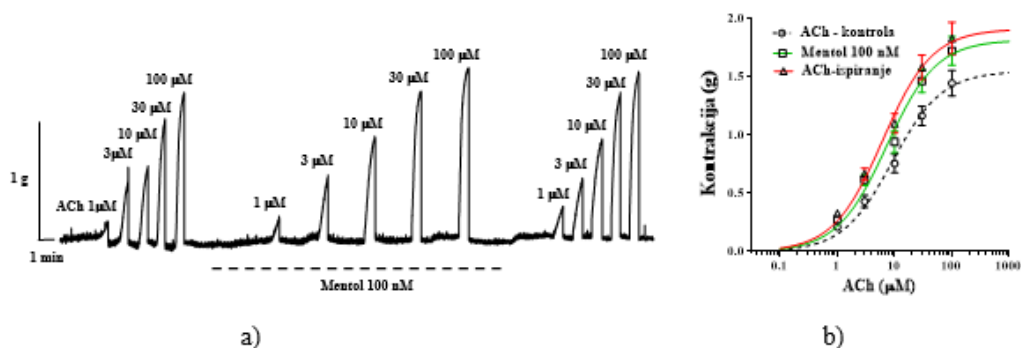
U ispitivanjima je korišćen acetilholin-hlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), monepantel (Zolvix®, Novartis, USA), pirantel-citrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i mentol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

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

REZULTATI

Na osnovu podataka iz naših prethodnih istraživanja (Choudhary i sar., 2019), testirali smo efekat 100nM mentola na kontrakcije нервномišићног препарата *A. suum*

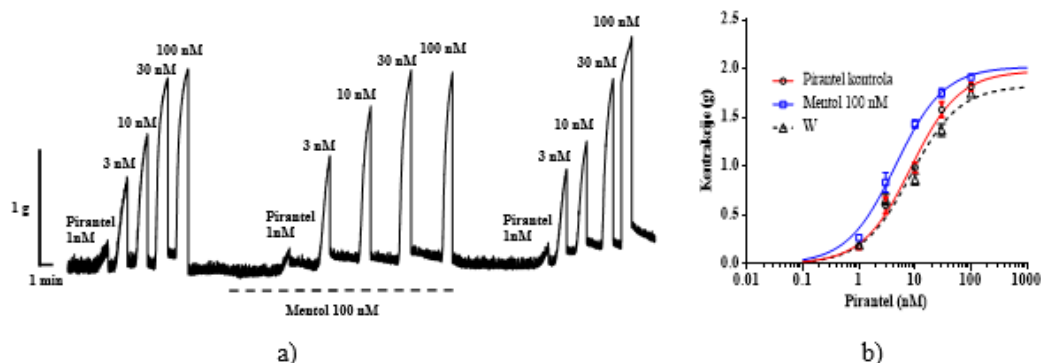
izazvanih rastućim koncentracijama ACh (1, 3, 10, 30 i 100mM). Na Slici 1a prikazan je originalni zapis kontrakcija bez i u prisustvu 100nM mentola. Dobijeni rezultati kontrakcija obrađeni su nelineranom regresijom, na osnovu kojih je određena vrednost srednje efektivne koncentracije (EC_{50}) ACh. Kontrolna vrednost je iznosila $9,15 \pm 1,22$ mM, u prisustvu mentola EC_{50} je bila smanjena na $7,29 \pm 1,21$ mM, dok je posle uklanjanja mentola iz medijuma bila još niža, $6,19 \pm 1,20$ mM. Istovremeno je rasla vrednost maksimalnog efekta (E_{max}). Kontrolna E_{max} je bila $1,55 \pm 0,09$ g, u prisustvu mentola porasla na $1,82 \pm 0,09$ g i nastavila je da raste i posle ispiranja do $1,91 \pm 0,09$ g (Slika 1b).



Slika 1

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina i dejstvo 100nM mentola na te kontrakcije
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktilnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100nM mentola (n=6)

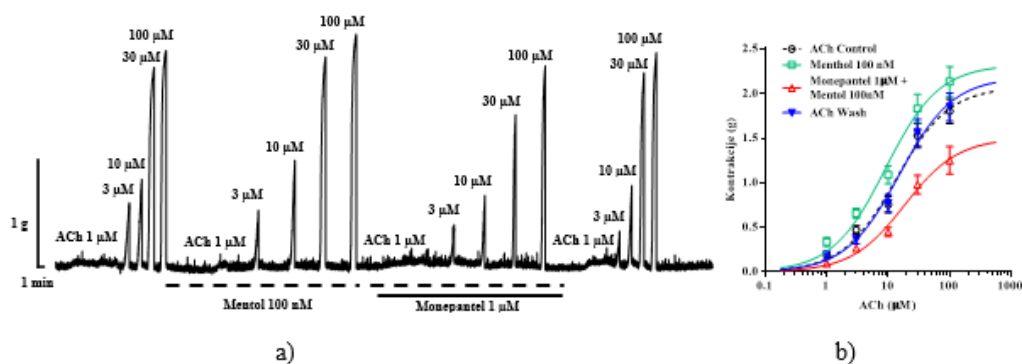
Ispitali smo i dejstvo mentola na kontrakcije *A. suum* izazvane pirantelom (Slika 2a i 2b). Kontrolna EC_{50} pirantela iznosila je $8,42 \pm 1,14$ nM, u prisustvu mentola, signifikantno je smanjena na $4,51 \pm 1,11$ nM ($p=0,0483$), dok se posle ispiranja ponovo vratila na kontrolni nivo ($8,42 \pm 1,18$ nM). Maksimalni efekat se vrlo malo menjao, sa $1,98 \pm 0,09$ g u kontroli na $2,02 \pm 0,05$ g u prisustvu mentola i $1,82 \pm 0,08$ g posle ispiranja.



Slika 2

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama pirantela i dejstvo 100nM mentola na te kontrakcije
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta pirantela bez i u prisustvu 100nM mentola (n=5)

U trećem delu ispitivanja testirali smo dejstvo monepantela na potencirajući efekat mentola u kontrakcijama izazvanim ACh (Slika 3a i 3b). Kontrolna vrednost EC_{50} za ACh bila je $13,30 \pm 1,25 \text{ mM}$, ali je inkubacija sa 100nM mentola imala za posledicu smanjenje EC_{50} na $9,04 \pm 1,24 \text{ mM}$. Međutim, posle dodavanja 1mM monepantela, vrednost EC_{50} ACh je u odnosu na kontrolu signifikantno ($p=0.0245$) porasla na $18,48 \pm 1,33 \text{ mM}$. Ova vrednost je bila signifikantno viša i od EC_{50} ACh u prisustvu mentola ($p<0,0001$), ali je posle uklanjanja monepantela iz medijuma porasla čak i nešto iznad kontrolne vrednosti ($15,30 \pm 1,27 \text{ mM}$). Inkubacija nervnomišićnog preparata *A. suum* sa 100nM mentola izazvala je povećanje maksimalnog efekta E_{max} sa $2,07 \pm 0,14 \text{ g}$ na $2,32 \pm 0,14 \text{ g}$, ali je inkubacija sa monepantelom (1mM) signifikantno smanjila ($p=0,0418$ u odnosu na kontrolu i $p=0,0011$ u odnosu na kontrakcije u prisustvu mentola) E_{max} na $1,50 \pm 0,15 \text{ g}$. Interesantno je da je posle ispiranja preparata, odnosno uklanjanja mentola i monepantela, vrednost E_{max} bila viša nego kontrolna i dostigla je $2,18 \pm 0,17 \text{ g}$.



Slika 3

- a) Reprezentativni zapis izometrijskih kontrakcija nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvanih rastućim koncentracijama acetilholina, stimulacija kontrakcija sa 100nM mentola i inhibicija sa 1μM monepantela (isprekidana linija: inkubacija sa 100nM mentola; puna linija: inkubacija sa 1μM monepantela)
- b) Dozno-zavisne sigmoidne krive kontraktalnog efekta acetilholina bez i u prisustvu 100nM mentola ili mentola i 1mM monepantela (n=6)

DISKUSIJA

Dobijeni rezultati su pokazali da mentol pojačava kontrakcije nervnomišićnog preparata *A. suum* izazvane ACh. Inkubacija sa 100nM mentola smanjuje vrednost EC_{50} ACh i povećava maksimalni kontraktalni efekat za oko 20%. Međutim, sam po sebi mentol nije izazivao promene tonusa. Ovakvi rezultati potvrđuju naše prethodno publikovano istraživanje, u kome smo dobili sličan efekat mentola na nAChR *A. suum* i *Oesophagostomum dentatum* i pokazali da je on najverovatnije alosterični modulator nAChR parazitskih nematoda (Choudhary i sar., 2019).

Na osnovu farmakoloških karakteristika, mišićni nAChR nematoda ima sličnosti na neuronskim tipom nAChR kičmenjaka, jer je relativno neosetljiv na blokadu alfa-bungarotoksinom (Tornøe i sar., 1995). Za razliku od kičmenjaka, međutim, nematode poseduju više od jednog tipa nAChR, koji se nalazi u nervno-mišićnim sinapsama odrasle nematode. *A. suum* ima najmanje tri tipa nAChR koji se razlikuju po osetljivosti na različite agoniste i karakteristikama jonskog kanala koji regulišu. Svaki od tri podtipa je imenovan na osnovu agoniste na koji je pretežno osetljiv: N tip (preferira nikotin i oksantel), L tip (preferira levamisol i pirantel) i B tip (preferira befenijum) (Martin i sar., 2004; Robertson i sar., 2002). U našem ranijem istraživanju sa mentolom pokazalo se da on pre svega stimuliše efekte ACh, što je razumljivo jer je mesto vezivanja ACh dobro konzervirano u svim tipovima nACh receptora. Međutim, mentol je dobro stimulatивно delovao na L tip, ali vrlo slabo na N tip nAChR. Upravo iz ovog razloga testirali smo dejstvo mentola na kontrakcije izazvane pirantelom. Mentol je potencirao dejstvo pirantela signifikantno smanjujući mu vrednost EC_{50} , uz minimalno povećanje E_{max} . S obzirom da je pirantel agonist, pre svega L tipa nAChR, ovi rezultati

su u saglasnosti sa prethodno publikovanim (Choudhary i sar., 2019). Posebno je bilo interesantno ispitati dejstvo monepantela, koji je negativni alosterični modulator nAChR nematoda (Abongwa i sar., 2018). U našem ispitivanju monepantel je potpuno neutralisao stimulativno dejstvo mentola i signifikantno inhibisao kontraktilni efekt ACh, povećavajući vrednost njegove EC_{50} i smanjujući E_{max} .

ZAKLJUČAK

Prezentovano istraživanje pokazuje da botanički antihelmintici mogu ublažiti pritisak na ograničenu grupu dostupnih antihelmintika. Pozitivna alosterična modulacija nAChR koju ispoljava mentol bila bi korisna u kombinovanoj terapiji sa holinergičkim antihelminticima kao što su pirantel ili levamizol, čime bi se povećala njihova efikasnost bez povećanja doze i smanjila mogućnost razvoja rezistencije parazita.

Zahvalnica

Istraživanje je podržano sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-136/2025-03/200143) i sredstvima Fonda za nauku Republike Srbije (#GRANT br. 7355 – FARMASCA).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Abongwa M., Marjanovic D. S., Tipton J. G., Zheng F., Martin R. J., Trailovic S. M., Robertson A. P. (2018): Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8(1):36-42.
- Choudhary S., Marjanović D. S., Wong C. R., Zhang X., Abongwa M., Coats J. R., Trailović S. M., Martin R. J., Robertson A. P. (2019): Menthol acts as a positive allosteric modulator on nematode levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 9:44-53.
- Hugot J. P., Baujard P., Morand S. (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3:199-208.
- Martin R. J., Clark C. L., Trailović S. M., Robertson A. P. (2004): Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *International Journal for Parasitology*, 34(9):1083-1090.
- Patel T., Ishiui Y., Yosipovitch G. (2007): Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(5):873-878.
- Paterson S., Barber R. (2007): Experimental evolution of parasite life history traits in *Strongyloides ratti* (Nematoda). *Proc Biol Sci*, 274:146-174.
- Robertson A. P., Clark C. L., Burns T. A., Thompson D. P., Geary T. G., Trailovic S. M., Martin R. J. (2002): Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide
-

distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302:853-60.

Tornøe C., Bai D., Holden-Dye L., Abramson S. N., Sattelle D. B. (1995): Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin, and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*, 33:411-24.
