

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Vladimir Z. Marjanović

**INTERAKCIJA IVERMEKTINA SA
LEKOVIMA MODULATORIMA AKTIVNOSTI
P-GLIKOPROTEINSKIH TRASPORTNIH
SISTEMA I ENZIMA CITOHROMA P450 KAO
UZROK ISPOLJAVANJA NJEGOVE
TOKSIČNOSTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Vladimir Z. Marjanović

**THE INTERACTION OF IVERMECTIN WITH
DRUGS MODULATORS OF THE ACTIVITY OF
P-GLYCOPROTEIN TRANSPORT SYSTEMS
AND CYTOCHROME P450 ENZYMES AS A
CAUSE OF ITS TOXICITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

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

Dr Nenad Andrić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Članovi komisije:

Dr Darko Marinković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Đorđe Marjanović, docent
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

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

Dr Miloš Petrović, docent
Univerzitet u Nišu, Poljoprivredni fakultet u Kruševcu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Iskazujem najdublju i najiskreniju zahvalnost svom mentoru, **dr Saši M. Trailoviću**, redovnom profesoru Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na izuzetnom naučnom vođstvu, neiscrpnom strpljenju i nesebičnom deljenju bogatog iskustva. Njegova posvećenost, inspirativni saveti i neumorna podrška oblikovali su svaki aspekt ovog istraživanja, pružajući neprocenjivu motivaciju za prevazilaženje izazova i postizanje rezultata.

Takođe, zahvaljujem drugom mentoru, **dr Nenadu Andriću**, vanrednom profesoru Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, čija su stručnost i pažljiva analiza doprineli preciznosti metodološkog pristupa i razjašnjenju važnih aspekata istraživanja.

Izražavam posebnu i duboku zahvalnost članu komisije, **dr Milošu Petroviću**, docentu Poljoprivrednog fakulteta u Kruševcu, Univerziteta u Nišu i direktoru Veterinarskog specijalističkog instituta „Niš“, na neizmernoj podršci od početka moje karijere, stručnim savetima i razumevanju svakodnevnih profesionalnih izazova. Njegova energija, ohrabrenje i primer profesionalizma služili su kao snažan oslonac tokom mog celog karijernog i istraživačkog razvoja.

Zahvaljujem se članu komisije, **dr Darku Marinkoviću**, redovnom profesoru Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na stručnom vođenju patohistoloških ispitivanja. Njegova ekspertiza u patologiji omogućila je dublje razumevanje histopatoloških promena i obogatila zaključke rada.

Zahvalnost pripada **dr Đorđu Marjanoviću**, docentu Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na pomoći u eksperimentalnom istraživanju.

Takođe, zahvalnost pripada **dr Zoranu Todoroviću**, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za detaljnu analizu disertacije i korisne sugestije koje su značajno unapredile konačnu verziju istraživanja.

Takođe, **dr Jeleni Francuski Andrić**, docentu Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, i **dr Mileni Radaković**, višem naučnom saradniku Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem se na podršci tokom obrade podataka hematoloških, biohemijskih, analiza oksidativnih strasa i koncentracije citohroma C450.

Želim da se zahvalim kolegini **Dragani Medić**, asistentu Katedre za farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na izuzetnoj podršci i saradnji tokom svih faza eksperimenta.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je finansiran sredstvima projekta TR 31087, Katedre za farmakologiju i toksikologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu i sredstvima iz budžeta Veterinarskog specijalističkog instituta „Niš“ na čemu se neizmerno zahvaljujem Katedri i najvišem rukovodstvu Instituta.

Svojim kolegama i prijateljima iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Niš“ zahvaljujem na timskoj igri i podršci u našoj kući.

Svojim prijateljima **Miladinu Živanoviću, Danilu Tomoviću, Mariji Milosavljević, Igoru Petkoviću, Milošu Tomoviću, Aleksandri Stamenković, Stevanu Đukiću, Milošu Arsiću, Mladenu Kociću, Nebojši Gligović, Mariu Stojanoviću, Ivani Pavlović, Ivani Simić, Ivani Stojanović, Mariji Marković, Stefanu Stajiću, Miodragu Stojanoviću, Jasmini Mitić i Predragu Trajkoviću** hvala na svemu.

Najveće hvala dugujem svojoj porodici na neizmernoj podršci, strpljenju i ljubavi koja me je pratila tokom svih faza ovog puta. Mojoj majci **Gorici** i ocu **Zoranu**, koji su svojim primerom, neiscrpnom podrškom i verom u mene uvek bili oslonac, inspiracija i naučili me pravim životnim vrednostima. Hvala mojoj sestri **Zorani**, čija nesebična pomoć i ljubav nikada nisu izostali, kao i mojim sestričinama **Uni** i **Hani**, koje su mi svakodnevno donosile radost i osmeh.

Posebnu zahvalnost dugujem **Kristini** na njenoj podršci, strpljenju i veri u mene.

Najposebniju ljubav i zahvalnost upućujem svojoj deci, **Ilini** i **Arseniju**, čija ljubav, osmeh i radost daju mom životu pravu smisao i motivaciju za dalji napredak. Njihovo prisustvo čini svaki izazov lakšim i svaku pobedu vrednijom.

Vladimir Z. Marjanović

Arsi, Lini, Uni i Hani

"Najveći neprijatelj znanja nije neznanje, već iluzija znanja."

Stephen Hawking

INTERAKCIJA IVERMEKTINA SA LEKOVIMA MODULATORIMA AKTIVNOSTI P-GLIKOPROTEINSKIH TRASPORTNIH SISTEMA I ENZIMA CITOHROMA P450 KAO UZROK ISPOLJAVANJA NJEGOVE TOKSIČNOSTI

Kratak sadržaj

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje toksičnosti ivermektina primenjenog u dozama višim od antiparazitske terapijske doze (primenjivanim kod ljudi tokom pandemije COVID 19) i utvrđivanje potencijalnih štetnih interakcija sa lekovima koji moduliraju P-glikoproteinske transportne sisteme i enzim citohrom P-450, u cilju razumevanja mehanizama koji mogu povećati njegovu toksičnost kod sisara. U ovom istraživanju, korišćeno je 90 odraslih mužjaka pacova Wistar soja koji su tretirani rastućim dozama ivermektina i kombinacijom ivermektina sa lekovima inhibitorima citohroma P-450 (verapamil, diltiazem), odnosno inhibitorima P-glikoproteinske pumpe (azitromicin, klaritromicin). Praćeni su efekti tretmana na opšte zdravstveno stanje, funkciju nervnog sistema, hematološke i biohemijske parametre, parametre oksidativnog stresa, koncentraciju enzima P-450 izoforme 3A4, koncentraciju ivermektina i primenjenih lekova u plazmi i tkivu mozga, kao i patomorfološke i histopatološke promene u organima. Ispitivanje je sprovedeno u tri faze u kojima su pacovi tretirani rastućim dozama ivermektina, zatim samo testiranim lekovima i na kraju kombinacijom jedne doze ivermektina (1,2 mg/kg) sa lekovima. Svakodnevno su pacovi testirani na rota rod aparatu, ispitivan je refleks uspravljanja i test pritiska na rep. Nakon petodnevne primene ivermektina, odnosno desetodnevne primene testiranih terapijskih doza lekova ili desetodnevne primene lekova sa davanjem jedne doze ivermektina tokom 5 dana zajedno sa lekovima, uzeti su uzorci krvi, a posle žrtvovanja uzorci tkiva za histopatološke preglede. Koncentracija ivermektina i lekova u plazmi i mozgu određivana je tačnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), dok je nivo oksidativnog stresa analiziran merenjem referentnih parametara. Istraživanje je pokazalo da visoke doze ivermektina (0,6-4,8 mg/kg) izazivaju dozno-zavisne i dozno-nezavisne promene u hematološkim i biohemijskim parametrima kod pacova, povećanje oksidativnog stresa i histopatološke promene u jetri i bubrezima. Neurotoksični efekti nisu detektovani. Inhibitori P-glikoproteina i enzima citohroma P-450 pojedinačno nisu izazvali značajne kliničke simptome niti značajnija neželjena dejstva, ali je kombinacija sa ivermektinom intezivirala promene u biohemijskim parametrima, uticala na koncentraciju enzima P-450, povećala koncentraciju ivermektina u tkivu mozga i intezivirala histopatološke promene. Naša istraživanja pokazuju da visoke doze ivermektina korišćene u vreme pandemije COVID-19 kod ljudi, mogu izazvati ozbiljna oštećenja u organizmu pacova, a da interakcija ivermektina sa kalcijumskim antagonistima i makrolidnim antibioticima takva oštećenja potencira. Takođe, naši rezultati ukazuju da visoke doze ivermektina primenjivane 5 dana ne obezbeđuju njegove efikasne antivirusne koncentracije, čime se postavlja pitanje opravdanosti ovakve primene.

Ključne reči: ivermektin, toksičnost, inhibitori P-gp, inhibitori citohroma P-450, azitromicin, klaritromicin, diltiazem, verapamil

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija i toksikologija

UDK broj:

THE INTERACTION OF IVERMECTIN WITH DRUGS MODULATORS OF THE ACTIVITY OF P-GLYCOPROTEIN TRANSPORT SYSTEMS AND CYTOCHROME P450 ENZYMES AS A CAUSE OF ITS TOXICITY

Abstract

This doctoral dissertation aimed to investigate the toxicity of ivermectin administered in doses higher than the antiparasitic therapeutic dose (used in humans during the COVID-19 pandemic) and to determine potential harmful interactions with drugs that modulate P-glycoprotein transport systems and the cytochrome P-450 enzyme, to understand the mechanisms that may increase its toxicity in mammals. This study used 90 adult male Wistar rats, which were treated with increasing doses of ivermectin and combinations of ivermectin with cytochrome P-450 inhibitors (verapamil, diltiazem) and P-glycoprotein pump inhibitors (azithromycin, clarithromycin). The effects of treatment on general health, nervous system function, hematological and biochemical parameters, oxidative stress parameters, P-450 isoform 3A4 enzyme concentration, ivermectin and drug concentrations in plasma and brain tissue, as well as pathomorphological and histopathological changes in organs, were monitored. The study was conducted in three phases in which rats were treated with increasing doses of ivermectin, then with the tested drugs alone, and finally with a combination of a single dose of ivermectin (1,2 mg/kg) and the drugs. Rats were tested daily on the rota rod apparatus, the righting reflex and tail pressure test were conducted. After five days of ivermectin administration, ten days of tested therapeutic drug doses, or ten days of drug administration with one dose of ivermectin for 5 days along with the drugs, blood samples were collected, and tissue samples were taken after sacrifice for histopathological examinations. The concentrations of ivermectin and drugs in plasma and brain tissue were determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). At the same time, oxidative stress levels were analyzed by measuring reference parameters. The study showed that high doses of ivermectin (0,6-4,8 mg/kg) caused dose-dependent and dose-independent changes in hematological and biochemical parameters in rats, increased oxidative stress, and histopathological changes in the liver and kidneys. Neurotoxic effects were not detected. P-glycoprotein and cytochrome P-450 enzyme inhibitors alone did not cause significant clinical symptoms or significant adverse effects. Still, their combination with ivermectin intensified changes in biochemical parameters, affected P-450 enzyme concentration, increased ivermectin concentration in brain tissue, and intensified histopathological changes. Our research shows that high doses of ivermectin used during the COVID-19 pandemic in humans can cause serious damage to the rats' bodies and that interactions between ivermectin and calcium antagonists and macrolide antibiotics potentiate this damage. Additionally, our results indicate that high doses of ivermectin administered for 5 days do not achieve effective antiviral concentrations, raising questions about the justification of such use.

Keywords: ivermectin, toxicity, P-gp inhibitors, cytochrome P-450 inhibitors, azithromycin, clarithromycin, diltiazem, verapamil

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Pharmacology and toxicology

UDC number:

SKRAĆENICE

3CLpro/Mpro	3-himotripsinu slična proteaza, poznata i kao glavna proteaza SARS-CoV-2; ključni enzim koronavirusa koji učestvuje u procesiranju poliproteina i neophodan je za replikaciju virusa.
ABC transporteri	Velika porodica membranskih proteina koji koriste energiju iz ATP hidrolize za aktivni transport različitih molekula preko ćelijskih membrana.
ACTIV-6	Adaptivna platforma sprovedena među ambulantnim pacijentima sa blagim do umerenim COVID-19 u Sjedinjenim Američkim Državama.
ALP	Alkalna fosfataza
ALT	Alanin aminotransferaza
AST	Aspartat aminotransferaza
AUC	Površina ispod krive
A-V čvor	Atrioventrikularni čvor je ključna struktura u srcu koja se nalazi između atrija (gornjih komora) i ventrikula (donjih komora).
AVR-14	Selektivni antagonist glutatom aktiviranog hloridnog kanala (GluCl ⁻), koji je prisutan u nervnim sistemima beskičmenjaka. Blokiranjem ovog kanala, AVR-14 može uticati na inhibiciju neurotransmisije, što može dovesti do paralisanja ili inhibicije kontrakcije mišića.
BCRP1	ATP-vezujući transporter koji igra ključnu ulogu u izbacivanju toksičnih supstanci, lekova i drugih molekula iz ćelija. BCRP1 je član ABC (ATP-Binding Cassette) transportera i pomaže u zaštiti ćelija od štetnih materija, kao i u smanjenju koncentracije lekova unutar ćelija, što može doprineti rezistenciji na lekove.
C _{max}	Maksimalna koncentracija u plazmi
CNS	Centralni nervni sistem
COVID-19	Bolest izazvana virusom SARS-Co-2
CREA	Kreatinin
CV	Preciznost
CYP	Enzim citohroma P450
Cys-loop	Strukturni motiv u ligand-zavisnim jonskim kanalima, koji sadrži dve cisteinske aminokiseline povezane disulfidnim mostom, ključan za funkciju neurotransmiterskih receptora poput GABA A i nikotinskih acetilholinskih receptora.
DDT	Dihlordifeniltrihloretan
DEC	Dietilkarbamazin citrat
DRESS	Lekovima izazvan sindrom eozinofilije i sistemskih simptoma.

ED50	Statistički parametar koji se koristi u farmakologiji i toksikologiji, a označava dozu supstance koja izaziva efekat u 50% populacije ispitanika.
EDTA	Etilendiamin tetrasirćetna kiselina
ELISA	Laboratorijska tehnika koja se koristi za detekciju i kvantifikaciju specifičnih proteina, antitela, hormona ili drugih biomolekula u uzorcima. Ova tehnika koristi enzime kao markere za detekciju i kvantifikaciju analita u uzorcima.
ES	Ekskretorni-sekretorni aparat
FDA	Američka agencija za hranu i lekove
GABA	γ -amino-buterna kiselina
GluCl ⁻	Glutamat-zavisni hloridni kanali
GSH	Glutation
HCT	Vrednost hematokrita
HGB	Hemoglobin
HPLC-MS/MS	Tečna hromatografija visokih performansi sa masenom detekcijom
HTLV-1	humani T-ćelijski limfotropnim virus tipa 1
I.v.	intravenska
IC50	Koncentracija supstance koja inhibira određeni biološki proces ili funkciju za 50% u odnosu na kontrolne vrednosti.
Ig	imunoglobulin
IL	Interleukin
I-TECH	Otvoreno kliničko ispitivanje sprovedeno u Maleziji.
Ka	Konstanta resorpcije
kb	Kilobaza
KMB	krvno-moždana barijera
LC-MS/MS	Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom
LD50	Doza supstance koja izaziva smrt u 50% ispitanika u određenoj populaciji
LOQ	Limit kvantifikacije
m/z	Odnos masa i naelektrisanja
MCH	Srednji korpuskularni hemoglobin
MCHC	Srednja korpuskularna koncentracija hemoglobina
MCV	Srednji korpuskularni volumen
MDA	Malondialdehid
MDR1	ATP-vezujući transporter kodiran genom je protein koji se nalazi na ćelijskim membranama i ima ključnu ulogu u izbacivanju različitih toksičnih materija, uključujući lekove, iz ćelija. MDR1 je poznat po tome što omogućava otpornost ćelija na višestruke lekove, što se često viđa kod karcinogenih ćelija koje postaju otporne na terapiju.

MES-SA	Ljudska tumorske ćelije koje se koriste u istraživanjima u oblasti onkologije, naročito za proučavanje mehanizama tumorske proliferacije i metastaziranja. MES-SA ćelije potiču od sarkoma mezenhimalnog porekla i koriste se kao model za testiranje lekova koji ciljaju na tumorske ćelije, posebno u vezi sa terapijskim strategijama za sarkome.
MESSA/Dx5	Podvrsta MES-SA ćelija koja je selektovana za otpornost na lekove. Ove ćelije su postale otporne na terapiju doksorubicinom (lek koji se često koristi u lečenju kancera), a naziv Dx5 označava njihovu otpornost na ovaj lek. Korišćenje MESSA/Dx5 ćelija omogućava istraživačima da proučavaju mehanizme lek-rezistencije u tumorima, uključujući istraživanje uloge transportnih sistema kao što je P-gp koje utiču na rezistenciju na lekove.
MIC	Metabolički inertni kompleks
MRP1	ATP-vezujući transporter koji igra ključnu ulogu u izbacivanju lekova, toksičnih supstanci i metabolita iz ćelija
MRP2	ATP-vezujući transporter koji se nalazi na apikalnim membranama hepatocita, enterocita i drugih epitelskih ćelija. MRP2 transportuje različite anionske supstance, uključujući toksične materije, lekove, bilirubin i njihove konjugate sa glutationom, iz ćelija u izlučujuće kompartmente kao što su žuč ili urinarni sistem.
MRP3	ATP-vezujući transporter koji se uglavnom nalazi na bazolateralnim membranama hepatocita i drugih ćelija. MRP3 ima ključnu ulogu u transportu različitih anionskih molekula, uključujući toksične supstance, lekove, bilirubin i njihove konjugate, iz ćelija u krvotok ili druge kompartmente.
MRT	Srednje vreme zadržavanja
Nsp	Nestrukturni protein
OATP1B1	Membranski transporter koji se nalazi na sinusoidalnim membranama hepatocita, a njegova glavna funkcija je transport organskih anjona, uključujući lekove, žučne kiseline i njihove konjugate, u jetru.
OATP1B3	Membranski transporter koji se nalazi na sinusoidalnim membranama hepatocita i ima sličnu funkciju kao OATP1B1, ali je specifičan za transport drugih organskih anjona, uključujući lekove, žučne kiseline, bilirubin i njihove konjugate, u jetru.
OCP	Program za kontrolu onhocerkoze
ORF	Otvoreni okvir za čitanje; deo genetskog koda koji može biti preveden u protein, započinje start-kodonom i završava se stop-kodonom.
OSI	Indeks oksidativnog stresa
P.o.	per os
P-gp	P glikoprotein

Pour-on	Topikalni proizvodi u veterini, obično u formi tečnosti, koji se nanose direktno na kožu životinje, obično na leđima ili vratu. Ovi proizvodi se koriste za kontrolu parazita poput buva, krpelja, unutrašnjih parazita (npr. crva) i drugih infestacija kod stoke, konja ili drugih životinja
R	Linearnost
RBC	broj eritrocita
RdRp	RNK-zavisna RNK polimeraza
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivne vrste kiseonika
s.c.	Subkutano
SAD	Sjedinjene Američke Države
SARS-CoV-2	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2
SCARs	Ozbiljne kožne neželjene reakcije na lekove
SJS	Stevens-Johnsonov sindrom
SLC transporteri	Velika grupa membranskih proteina koji transportuju razne molekule, uključujući jone, nutrijente, lekove, toksine kroz ćelijske membrane.
$T_{1/2}$	Poluvreme eliminacije
TAS	Ukupni antioksidativni status
TEN	Toksična epidermalna nekroliza
TG	Trigliceridi
Th2	Podtip CD4 ⁺ T-ćelija koje igraju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru, posebno u borbi protiv parazitskih infekcija i alergijskih reakcija
TM	Transmembranski domeni
Tmax	Vreme do postizanja Cmax tj. vreme koje je potrebno da lek dostigne svoju maksimalnu koncentraciju u plazmi nakon primene. Tmax daje uvid u brzinu apsorpcije leka. Kratko Tmax može ukazivati na brzu apsorpciju leka, dok duže Tmax može ukazivati na sporiju apsorpciju.
TOS	Ukupni oksidativni status
TP	Ukupni proteini
UREA	Urea
UV/VIS spektrofotometrija	Analitička tehnika koja se koristi za merenje apsorpcije svetlosti u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (VIS) delu elektromagnetnog spektra
Vc	Volumen distribucije u centralnom kompartmentu
Vd	Volumen distribucije
Vero/hSLAM	Ćelijska linija Vero ćelija modifikovana da eksprimira humani SLAM receptor, koristi se za proučavanje virusa koji koriste ovaj receptor za ulazak u ćelije.
WBC	Ukupan broj leukocita
γ -GT	Gama-glutamil transferaza

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Otkriće i razvoj	2
2.2. Terapijske indikacije u veterinarskoj i humanoj medicini	4
2.3. Primena ivermektina u vreme COVID-19	7
2.4. Mehanizmi dejstva ivermektina.....	10
2.5. Farmakokinetika ivermektina	12
2.5.1. Apsorpcija.....	12
2.5.2. Distribucija	13
2.5.3. Biotransformacija	14
2.5.4. Eliminacija	14
2.6. Toksičnost i neželjena dejstva.....	15
2.7. Krvno-moždana barijera i povezanost sa toksičnošću ivermektina.....	16
2.8. Mikrozomalni enzimi jetre i biotransformacija ivermektina	17
2.9. Inhibitori p-glikoproteinskih sistema i enzima citohrom P450	18
2.9.1. Verapamil.....	18
2.9.2. Diltiazem.....	19
2.9.3. Klaritromicin.....	21
2.9.4. Azitromicin	23
3. CILJEVI I ZADACI	25
4. MATERIJAL I METODE.....	26
4.1. Smeštaj pacova i dizajn studije.....	26
4.2. Prva faza ispitivanja.....	26
4.2.1. Procena koordinacije i ravnoteže prve faze ispitivanja	26
4.3. Druga faza ispitivanja	27
4.3.1. Procena koordinacije i ravnoteže druge faze ispitivanja	27
4.4. Treća faza ispitivanja	28
4.4.1. Procena koordinacije i ravnoteže treće faze ispitivanja.....	28
4.5. Dozvola za istraživanje.....	28
4.6. Hematološke i biohemijske analize	28
4.7. LC-MS/MS za određivanje ivermektina u serumu i tkivu mozga pacova.....	29
4.8. LC-MS/MS za određivanje azitromicina, klaritromicina, verapamila i diltiazema u serumu i tkivu mozga pacova.....	29
4.9. Ispitivanje nivoa oksidativnog stresa.....	31
4.10. Makroskopski i histopatološki pregled tkiva pacova.....	31
4.11. Supstance i lekovi	31
4.12. Statistička analiza	31

5. REZULTATI	32
5.1. Prva faza	32
5.1.1. Klinički pregled i telesna masa	32
5.1.2. Procena koordinacije i ravnoteže	32
5.1.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih ivermektinom	32
5.1.4. LC-MS/MS za ispitivanje koncentracije ivermektina u serumu i moždanom tkivu pacova	35
5.1.5. Oksidativni stres	36
5.1.6. Makroskopski i histopatološki nalaz	37
5.2. Druga faza	38
5.2.1. Klinički pregled i telesna masa	38
5.2.2. Procena koordinacije i ravnoteže	38
5.2.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom	39
5.2.4. LC-MS/MS za ispitivanje koncentracije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u plazmi i moždanom tkivu pacova	41
5.2.5. Oksidativni stres	41
5.2.6. Makroskopski i histopatološki nalaz	43
5.3. Treća faza	44
5.3.1. Klinički pregled i telesna masa	44
5.3.2. Procena koordinacije i ravnoteže	44
5.3.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih ivermektinom	44
5.3.4. LC-MS/MS za ispitivanje koncentracije verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicin u kombinaciji sa ivermektinom u serumu i moždanom tkivu pacova	47
5.3.5. LC-MS/MS za ispitivanje koncentracije koncentracije ivermektina davanog u kombinaciji sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, u plazmi i moždanom tkivu pacova	48
5.3.6. Oksidativni stres	49
5.3.7. Makroskopska i histopatološka analiza tkiva pacova	50
6. DISKUSIJA	51
7. ZAKLJUČCI	65
8. LITERATURA	68

1. UVOD

Ivermektin je ranije pokazao antivirusni potencijal protiv različitih virusa uključujući Zika virus (Barrows i sar., 2016) i virus Zapadnog Nila (Nguyen i sar., 2015). Antivirusni efekti zabeleženi su uglavnom *in vitro*, dok su *in vivo* efekti prijavljeni samo kod virusa Zapadnog Nila i Newcastle virusa (Azeem i sar., 2015; Nguyen i sar., 2015). Uprkos obećavajućim rezultatima u laboratorijskim uslovima, upotreba ivermektina kao antivirusnog sredstva kod ljudi je ograničena zbog mogućih toksičnih efekata i nedovoljne kliničke efikasnosti. Studije su pokazale da visoke doze ivermektina, koje bi mogle biti potrebne za efikasnu antivirusnu aktivnost, značajno prelaze standardne terapijske doze za parazitske infekcije i povećavaju rizik od neuroloških neželjenih dejstava.

Zbog široke primene ivermektina u lečenju parazitskih bolesti kod ljudi i životinja, u periodu pandemije COVID-19 (*eng.* Coronavirus disease 2019) istraživači su pokrenuli ispitivanja njegovog antivirusnog potencijala protiv SARS-CoV-2 (*eng.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Tokom pandemije, studija Caly i saradnika (2020) pokazala je sposobnost ivermektina da inhibira replikaciju SARS-CoV-2 *in vitro*, što je izazvalo globalni interes za mogućnost prenamene ovog leka za lečenje COVID-19. *In vitro* studije su sugerisale da ivermektin inhibira virusne proteine zadužene za transport u ćeliju domaćina, čime potencijalno smanjuje replikaciju virusa. Ipak, antivirusna efikasnost ivermektina kod ljudi ostaje neizvesna, jer rezultati kliničkih studija nisu potvrdili klinički značajan efekat. Pored ograničene efikasnosti, upotreba visokih doza ivermektina, neophodnih za antivirusno delovanje, dovela je do neurotoksičnih efekata, uključujući simptome poput konfuzije, ataksije i konvulzija.

Ivermektin, široko korišćen u terapiji parazitskih infekcija, može izazvati neurotoksične efekte kod sisara, što je u velikoj meri povezano s aktivnostima transportnih sistema, naročito P-glikoproteina (P-gp). Ovaj transporter omogućava eliminaciju ivermektina iz centralnog nervnog sistema (CNS), čime se smanjuje rizik od neuroloških neželjenih efekata. Međutim, inhibicija ili indukcija P-gp, kao i interakcije sa lekovima koji se metabolišu putem citohroma P-450, značajno utiču na farmakokinetiku ivermektina. Ivermektin se prvenstveno metaboliše putem citohroma P-450, pretežno preko izoforme CYP3A4, što omogućava njegovu brzu eliminaciju iz organizma. Inhibitori citohroma P450 mogu smanjiti metabolizam ivermektina, što dovodi do povećanja njegove sistemske koncentracije i potencijalnog povećanja neurotoksičnosti. Nasuprot tome, induktori citohroma P450 ubrzavaju eliminaciju ivermektina i mogu smanjiti njegovu terapijsku efikasnost. Dodatno, krvno-moždana barijera (KMB) predstavlja fiziološku prepreku za prolaz ivermektina u CNS, gde P-gp transportni sistem smanjuje njegov ulazak i time smanjuje rizik od neurotoksičnih efekata. Međutim, lekovi koji inhibiraju P-gp mogu povećati koncentraciju ivermektina u CNS-u, što doprinosi razvoju neuroloških simptoma.

Ove interakcije i njihov potencijal za izazivanje neželjenih efekata nisu bile obuhvaćene u početnim predkliničkim i kliničkim studijama ivermektina. Ipak, prijavljeni slučajevi toksičnih efekata kod životinja, posebno kod osetljivih pasa koji imaju genetski deficijentnu P-gp pumpu, naglašavaju važnost istraživanja interakcija ivermektina sa P-gp i citohrom P-450 enzimima. Toksičnost ivermektina dodatno je istaknuta tokom pandemije COVID-19, kada je zabeležen porast neželjenih reakcija usled primene visokih doza ovog leka kod pacijenata, često bez medicinskog nadzora.

Ivermektin ostaje ključni lek u veterinarskoj i humanoj medicini za lečenje parazitskih bolesti. Međutim, njegova prenamena za lečenje virusnih infekcija, uključujući COVID-19, i dalje je kontroverzna i predstavlja izazov za istraživače. Dodatna klinička ispitivanja i razjašnjavanje mehanizama njegove farmakokinetike i farmakodinamike, potrebni su kako bi se procenila bezbednost, uzimajući u obzir i potencijalnu interakciju sa lekovima inhibitorima P-gp transportnih sistema i citohroma P-450, kao i uticaj na CNS i neurološke funkcije.

2. PREGED LITERATURE

2.1. Otkriće i razvoj

Pionirski trenutak u otkriću ivermektina datira u ranim 1970-im godinama, kada je uspostavljeno međunarodno partnerstvo između javnog i privatnog sektora, odnosno Instituta Kitasato u Tokiju i Američke farmaceutske kompanije Merck, Sharp and Dohme (MSD). Istraživači Satoshi Omura i William C. Campbell zajedno su radili na ekstraktima iz tla u potrazi za gljivicama potencijalnim producentima novih antibakterijskih supstanci. U drugoj godini saradnje, tim sa Instituta Kitasato izolovao je organizam *Streptomyces avermitilis*, vrstu aktinomiceta, iz zemlje blizu golf terena uz obalu u Kawani, blizu grada Ito u regionu Shizuoka (Omura i Crump, 2004). Kitasato istraživačka grupa je zatim objavila morfološke, fiziološke, biohemijske i filogenetske dokaze koji su argumentovali reklasifikaciju originalnog mikroorganizma i preimenovanje u *Streptomyces avermectinius* (Takahashi i sar., 2002) (Slika 1). Soj *Streptomyces* pronađen u Japanu i dalje je jedini mikroorganizam koji proizvodi avermektin. Originalno identifikovan kao OS-3153, najperspektivniji uzorak bio je soj *S. avermectinius* koji je pokazao snažnu antihelmintičku aktivnost sa malo ili nimalo toksičnosti. Jedinjenje odgovorno za aktivnost nazvano je avermektin (Burg i Stapley, 1989). Dalja istraživanja su pokazala da avermektin ima biocidnu aktivnost protiv raznolikog spektra nematoda, insekata i arahnida. Avermektin je bio je 25 puta jači od svih do tada dostupnih antihelmintika. Jedinstvena sposobnost avermektina da uništava i ektoparazite i endoparazite dala je podsticaj stvaranju nove klase jedinjenja nazvane "endektocidi". Avermektin je bio prvi endektocid na svetu, preteča potpuno nove klase antiparazitskih agenasa, koji snažno deluju protiv širokog spektra nematoda, artropoda i insekata, unutrašnjih i spoljašnjih parazita ljudi i životinja (Omura i Crump, 2004).

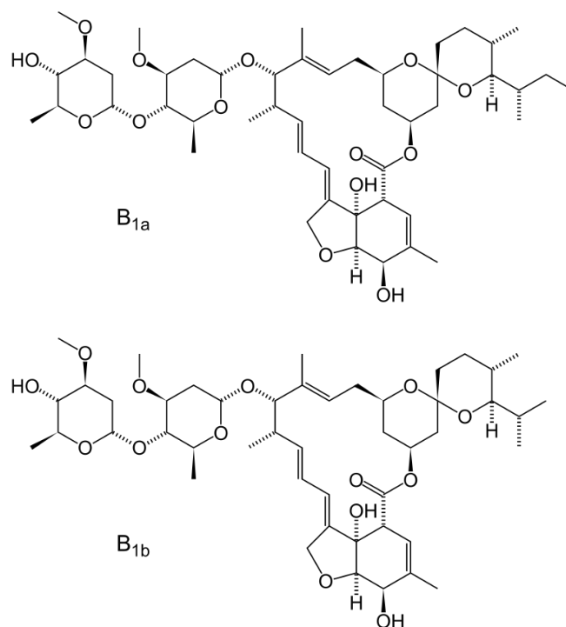


Slika 1. Mikrofotografija *Streptomyces avermectinius* (Omura i Crump, 2004).

Istraživanje strukture avermektina je identifikovalo ključne razlike između njegovih podtipova, posebno u pogledu konfiguracije olefinske veze između ugljenika C22 i C23. Avermektini su kompleks 16-članih makrocikličnih laktona, a fermentacija *S. avermectinius* proizvodi smešu od osam avermektinskih jedinjenja (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a i B2b) (Chabala i sar., 1980). Dok se u podtipu 1 ova veza pojavljuje kao olefinska veza, u podtipu 2 je hidrogenizovana sa hidroksilnom grupom na poziciji C23. Ova razlika ima duboke implikacije na konformaciju prstena koji nosi te funkcionalne grupe i stoga uzrokuje suptilne, ali značajne promene u bioaktivnosti. Na primer, utvrđeno je da je avermektin B1 efikasniji od avermektina B2 nakon oralne primene, dok je obrnut slučaj kada su oba primenjena parenteralno. Posebno treba napomenuti da je avermektin B1 bio značajno manje efikasan protiv određenih vrsta (npr. *Cooperia*) kada je primenjen parenteralno u poređenju sa oralnom primenom, dok je sa druge strane avermektin B2 bio manje aktivan od B1 protiv drugih vrsta (npr. *Haemonchus sp.*). Zbog toga je postalo od ključnog značaja da se sintetišu

jedinjenja koja bi zadržala konformaciju serije B2, ali bez 22-hidroksil supstituenta, sa ciljem da takva jedinjenja ispoljavaju samo pozitivne karakteristike oba definisana podtipa avermektina (Campbell i sar., 1983).

Analiza podtipova avermektina, koji sadrže metoksi grupu na poziciji 5, pokazala je ukupnu nižu efikasnost u poređenju sa podtipovima B i stoga nisu ozbiljno razmatrani za dalji razvoj. Iako su supstituenti na poziciji 25 (izopropil ili sek-butil) imali mali uticaj na biološku aktivnost, njihovo razdvajanje se nije smatralo neophodnim. U hemijskim i biološkim procenama korišćene su smeše, uglavnom zasnovane na odnosu nastalom u procesu fermentacije. Najpoželjnije jedinjenje, 22, 23-dihidroavermektin B1, zahtevalo je selektivnu redukciju jednog od pet olefina za sintezu. Važno je napomenuti da je samo ciljani olefin bio *cis*-supstituisan, što sugerise mogućnost sinteze korišćenjem Vilkinsonovog homogenog hidrogenacionog katalizatora $(\text{PH}_3\text{P})_3\text{RhCl}$, poznatog po svojoj visokoj osetljivosti na sterično okruženje olefina. Hidrogenizacija avermektina B, sa Vilkinsonovim katalizatorom tokom 20 sati u benzenu ili toluenu na 25°C u atmosferi vodonika, rezultirala je sa 85 procenata 22, 23-dihidroavermektina B, zajedno sa 3 procenta 3, 4, 22, 23-tetrahidroavermektina. 22, 23-dihidroavermektin B, koji sadrži najmanje 80 procenata 22, 23-dihidroavermektina B_{1a}, i ne više od 20 procenata 22, 23-dihidroavermektina B_{1b}, dobio je nezaštićeni naziv **ivermektin** (Slika 2) (Campbell i sar., 1983).



Slika 2. Hemijska formula Ivermektina.

IUPAC: Smeša (2aE,4E,5'S,6S,6'R,7S,8E,11R,13R,15S,17aR,20R,20aR,20bS)-7-[[2,6-dideoksi-4-O-(2,6-dideoksi-3-O-metil- α -L-arabino-heksopiranozil)-3-O-metil- α -L-arabino-heksopiranozil]oksi]-20,20b-dihidroksi-5',6,8,19-tetrametil-6'-[(1S)-1-metilpropil]-3',4',5',6,6',7,10,11,14,15,17a,20,20a,20b-tetradekahidrospiro[11,15-metano-2H,13H,17H-furo[4,3,2-pq][2,6]benzodioskaciklooktadecena-13,2'-[2H]piran]-17-on (komponenta H₂B_{1a}) i (2aE,4E,5'S,6S,6'R,7S,8E,11R,13R,15S,17aR,20R,20aR,20bS)-7-[[2,6-dideoksi-4-O-(2,6-dideoksi-3-O-metil- α -L-arabino-heksopiranozil)-3-O-metil- α -L-arabino-heksopiranozil]oksi]-20,20b-dihidroksi-5',6,8,19-tetrametil-6'-(1-metiletil)-3',4',5',6,6',7,10,11,14,15,17a,20,20a,20b-tetradekahidrospiro[11,15-metano-2H,13H,17H-furo[4,3,2-pq][2,6]benzodioskaciklooktadecena-13,2'-[2H]piran]-17-on (komponenta H₂B_{1b}) (European Pharmacopoeia, 2014).

Prvi lek iz grupe avermektina uveden je u veterinarsku medicinu od strane kompanije Merck i Co. 1981. godine, a nove formulacije ivermektina, gotovo svake naredne godine pojavljivale su se na tržištu. Postojalo je veoma malo motivacije za proizvodnjom ivermektina za humanu upotrebu, sve dok se nije pokazala njegova efikasnost protiv filarijalnih nematoda (Ashour, 2019; Omura i Crump, 2014). Ivermektin je prvi put registrovan kao lek za ljude pod trgovačkim imenom Mectizan[®] 1987.

godine (Laing i sar., 2017) i prvi put je korišćen za lečenje onhocerkoze ljudi 1988. godine (Crump i Omura, 2011). Ivermektin je bio jedini član grupe avermektina odobren za upotrebu kod ljudi sve do nedavnog odobrenja moxidectina od strane Američke Uprave za hranu i lekove (FDA) u junu 2018. godine za lečenje onhocerkoze kod ljudi (Ashour, 2019; FDA, 2018).

Otkriće, razvoj i primena ivermektina kroz program kompanije Merck i Co. i Kitasato Instituta, uz pomoć grupe međunarodnih partnera iz različitih disciplina, ocenjeno je kao jedno od najvećih medicinskih dostignuća dvadesetog veka i krunisano Nobelovom nagradom 2015. godine koju su dobili Satoshi Omura i William C. Campbell (Chen, 2016).

2.2. Terapijske indikacije u veterinarskoj i humanoj medicini

Interesantna je činjenica da se posle otkrića avermektina na osnovu njihove hemijske strukture (makrolidna struktura slična makrolidnim antibioticima), očekivala antimikrobna aktivnost. Međutim, u preliminarnim istraživanjima takav efekt je izostao. Naredna ispitivanja su sprovedena na miševima veštački inficiranim sa *Nematospiriodes dubius*, i dobijeni su iznenađujuće dobri antinematodni efekti. Brojna istraživanja koja su usledila pokazala su visoku efikasnost tada već definisanog ivermektina protiv endo i ektoparazita životinja. Danas je dobro poznato da je ivermektin je endo i ektoantiparazitik (endektocid) širokog spektra delovanja. Dat per os (p.o.) ili parenteralno, efikasno deluje protiv odraslih i larvenih oblika (IV stadijum) nematoda i artropoda domaćih, divljih životinja, životinja u zoovrtovima i kućnih ljubimaca (Brander i sar., 1991; Riviere i Papich, 1995), ali ne deluje na cestode i trematode (Brander i sar., 1991).

U goveda i ovaca ivermektin je dat p.o. ili subkutano (s.c.) u dozi od 0,2 mg/kg ispoljava efikasnost 97-100%, protiv adultnih oblika i larvi IV stadijuma parazita *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Bunostomum*, *Nematodirus*, *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Dictyocaulus* i u ovaca posebno *Chabertia ovina* (Riviere i Papich, 1995). Ivermektin deluje i na ektoparazite goveda. Dokazano je da su najčešći ugrci goveda *Hypoderma bovis* i *H. lineatum* visoko osetljivi na ivermektin. Tretman ovim avermektinom uništava sva tri stadijuma larve. Međutim, uginjavanje larvi u toku njihovog normalnog migratornog puta kroz organizam, može izazvati neželjene reakcije, kao što je eozinofilni ezofagitis ili hemoragije (Roncalli, 1984). Kada se ivermektin aplikuje s.c. govedima u dozi od 200 µg/kg telesne mase efikasno uništava adultne oblike vaši (*Haematopinus eurytarnus*, *Linognathus vituli* i *Solenopotes capillatus*). Ispitivanja su pokazala da su šugarci *Sarcoptes scabiei* var. *bovis*, najosetljiviji upravo na ivermektin (Strickland i Gerrish, 1987; Wright i Guillot, 1984). I krpelji su jako osetljivi na ivermektin, *Boophilus microplus* i *B. decoloratus* su najosetljiviji. Inače soj *Boophilus* je rezistentan na organofosfate, DDT i sintetske piretroide. Larve muva koje parazitiraju u ranama i lezijama na koži goveda su takođe osetljive na ivermektin. Tako ivermektin deluje na larve *Chrysomya bezziana* čak 14 dana posle aplikacije (Campbell, 1989).

Efikasnost ivermektina primenjenog s.c. u dozi od 200 µg/kg izražena u procentima protiv adultnih i larvenih oblika gastrointestinalnih nematoda ovaca iznosi: *Haemonchus contortus* 99 i >99, *Ostertagia circumcincta* >99 i >99, *Ostertagia trifurcata* 100 i 98; *Trichostrongylus axei* 100%, *T. colubriformis* 98 i >99, *T. vitrinus* 100 i 93, *Nematodirus filicollis* 92 i 93, *N. spathiger* za larve 95, *Cooperia curticei* 99 i >99, *Oesophagostomum columbianum* >99 i >99, *O. venulosum* 100, *Chabertia ovina* 100 i 98, *Trichuris ovis* 87, *Strongyloides papillosus* za larve >99, *Gaigeria pachyscelis* 100 i >99. Za plućne nematode efikasnost je: *Dictyocaulus filaria* >99 i >99, *Protostrongylus rufescens* 100 (Brander i sar., 1991). Ivermektin je veoma efikasan protiv larvi *Oestrus ovis*, kao i šugaraca *Sarcoptes scabiei* i *Psorergates ovis*. Za razliku od formulacije namenjene za peroralnu upotrebu, dat parenteralno ivermektin deluje i na *Psoroptes ovis*. Posle prvog davanja znatno redukuje broj parazita, a posle ponovljene aplikacije (nakon 7 dana) može potpuno eliminisati prisustvo parazita na životinjama (Roncalli i Sutherland, 1986).

Kod svinja ivermektin dobro deluje na gastrointestinalne, plućne i bubrežne nematode, vaši i šugarce. Preporučena s.c. doza ivermektina za svinje iznosi 300 µg/kg. Efikasnost ove doze ivermektina (izražena u procentima) za različite parazite svinja iznosi: gastrointestinalne nematode -

Ascaris suum 100 i >99; *Hyostrogylus rubidus* 98 i 99; *Oesophagostomum spp.* 96 i 95; *Strongyloides ransomi* 99; *Trichuris suis* 80. Plućne nematode - *Metastrongylus spp.* 100. Bubrežne nematode - *Stephanurus dentatus* >99 i >99 (Brander i sar., 1991). Ivermektin uspešno suzbija infestaciju svinja vašima (*Haematopinus suis*) i šugarcima (*Sarcoptes scabiei* var. *suis*) (Hogg, 1984).

Ivermektin je registrovan i za primenu kod pasa i mačaka. Primenjuje se p.o. u malim dozama od 0,006 mg/kg (psi) ili 0,024 mg/kg (mačke) kao preventiva protiv dirofilarijaze. Ivermektin je efikasan protiv trećeg i četvrtog stadijuma nematode (mikrofilarija) *Dirofilaria immitis*, ali ne i protiv adultnih oblika. U ovim malim dozama ivermektin ispoljava samo ograničenu aktivnost protiv gastrointestinalnih nematoda pasa i mačaka. Međutim, kada se primeni oralno u dozama između 0,05 mg/kg i 0,2 mg/kg postižu dobru efikasnost protiv parazitskih nematoda *Ancilostoma caninum*, *Trichuris vulpis*, *Toxocara canis* i *Capillaria aerophila* (Riviere i Papich, 2018).

Ivermektin se pokazao kao čudotvorni lek za ljudsko zdravlje, značajno unapređujući opšte zdravstveno stanje i dobrobit milijardi ljudi širom sveta od prvog korišćenja u lečenju onhocerkoze 1988. godine. Njegova prednost u odnosu na druge lekove se ogleda u visokoj efikasnosti i širokom spektru delovanja, sigurnosti, dobroj podnošljivosti i jednostavnoj primeni (jedna godišnja oralna doza). Ivermektin se koristi za lečenje različitih unutrašnjih nematodnih infekcija, uključujući onhocerkozu, strongiloidijazu, askarijazu, limfatičnu filarijazu, gnatostomijazu i trihurijazu. Takođe, primenjuje se za oralno lečenje ektoparazitskih infekcija kao što su pedikuloza (infestacija vaškama) i šuga (infestacija grinjama) (Ottesen i Campbell, 1994).

Onhocerkozu uzrokuje filaricidni parazit *Onchocerca volvulus*, koga prenosi crna mušica vrste *Simulium* u blizini reka u zapadnom, istočnom i centralnom delu Afrike, Jemenu, Centralnoj Americi i severozapadnim zemljama Južne Amerike. Larve prenete crnim mušicama razvijaju se u odrasle nematode u koži, gde ženke proizvode mikrofilarije koje migriraju kroz potkožna tkiva i oči, uzrokujući različite kožne lezije i ireverzibilno oštećenje vida poput sklerozirajućeg keratitisa i iridociklitisa. Zbog toga je ova bolest poznata i kao „rečno slepilo“. Ivermektin je postao lek izbora protiv *Onchocerca volvulus* početkom devedesetih godina prošlog veka zbog svoje efikasnosti i bezbednosti u poređenju sa drugim dostupnim lekovima. Od tada, ovaj lek se široko koristi protiv onhocerkoze u dozama od 150-200 µg/kg svakih 6-12 meseci koje dovode do smanjenja mikrofilarija od oko 85-95% (González i sar., 2012). Ivermektin nema visok stepen aktivnosti protiv, adultnih parazita, pa je potrebna primena ponovljene godišnje ili polugodišnje doze kako bi se sprečilo da pacijenti ponovno obole od bolesti (Gardon i sar., 2002; Omura, 2008). Lečenje ivermektinom zasnovano je na tretmanu populacije, poznato i kao masovna primena lekova i predstavlja ključnu strategiju za eliminaciju onhocerkoze. Ova strategija zahteva minimalnu terapijsku pokrivenost od 80%. Da bi se postigla eliminacija prenošenja bolesti u područjima sa visokim i srednjim stepenom endemičnosti, neophodno je sprovesti godišnje tretmane tokom perioda od najmanje 12 do 15 godina. Kompanija Merck donira ivermektin, poznat pod brendom Mectizan®, za ove svrhe (World Health Organisation, 2022). Program za kontrolu onhocerkoze (OCP) ostvario je značajan uticaj na javno zdravlje i ekonomski razvoj u pogođenim regionima. Kroz svoje aktivnosti, OCP je oslobodio 40 miliona ljudi od infekcije onhocerkozom, prevenirao slepilo kod 600.000 osoba i osigurao da je 18 miliona dece rođeno bez rizika od ove bolesti i slepila. Pored toga, program je doveo do povraćaja 25 miliona hektara napuštenog obradivog zemljišta, koje je sada dostupno za naseljavanje i poljoprivrednu proizvodnju, što omogućava prehranu za 17 miliona ljudi godišnje.

Limfatična filarijaza je bolest koju prenose komarci i pogađa oko 885 miliona ljudi širom sveta, pri čemu globalne procene ukazuju na to da je zahvatila 25 miliona muškaraca sa hidrokedom i više od 15 miliona ljudi sa limfedemom. Najmanje 36 miliona ljudi živi sa hroničnim manifestacijama ove bolesti. Limfatična filarijaza se može eliminisati zaustavljanjem širenja infekcije preventivnom terapijom uz bezbedne kombinacije lekova koje se ponavljaju svake godine. Više od 9 milijardi kumulativnih tretmana je isporučeno kako bi se zaustavilo širenje infekcije od 2000. godine (World Health Organisation, 2023). Bolest uzrokuje *Wuchereria bancrofti* u tropskim i subtropskim područjima ili *Brugia malayi* i *Brugia timori* u jugoistočnoj Aziji. Ove infekcije dovode do disfunkcije limfnog sistema. Najčešća akutna manifestacija je akutni adenolimfangitis, koji se karakteriše napadima groznice, bolnim oticanjem zahvaćenog područja tela i upaljenim limfnim

čvorovima u preponama i pazuhu. Hronična manifestacija limfne filarijaze karakteriše se limfedemom (otok tkiva) ili elefantijazom (zadebljanje kože/tkiva) udova i hidrocenom (nakupljanje tečnosti), rezultirajući progresivnim i ireverzibilnim oticanjem ekstremiteta, dojki i genitalija. Ivermektin prouzrokuje značajno početno smanjenje nivoa cirkulišućih mikrofilarija, praćeno dugoročnim suzbijanjem njihove produkcije. Standardni tretman je 150–200 µg/kg telesne mase, pri čemu su glavni efekti uništavanje mikrofilarija i dugoročna sterilnost odraslih nematoda. Kombinacija doksiciklina i ivermektina pruža antifilaralnu efikasnost od oko 80% u poređenju sa 9% efikasnosti za tretman samo doksiciklinom. Ivermektin (200 µg/kg) se primenjuje zajedno sa dietilkarbamazin citratom (DEC) (6 mg/kg) i albendazolom (400 mg/kg) u zemljama bez onhocerkoze i gde su ispunjeni drugi programski uslovi (World Health Organisation, 2023). Globalni program za eliminaciju limfatične filarijaze u endemskim područjima uključuje ivermektin u svoju strategiju masovne primene lekova kako bi sprečio širenje infekcije. Kombinacija od 150 µg/kg telesne mase ivermektina i 400 mg albendazola smanjuje broj mikrofilarija. Nedavno je odobrena jedna doza triple terapije sa ivermektinom, dietilkarbamazinom i albendazolom, pokazujući se superiornom u odnosu na druge programe eliminacije limfatične filarijaze (González i sar., 2012).

Strongiloidijaza je endemska bolest u tropskim i subtropskim regionima koju izaziva *Strongyloides spp.* Bolest se dobija prodiranjem filariformnih larvi kroz kožu. Larve migriraju do krvnih sudova, a zatim do pluća, uzdižući se kroz traheobronhijalno stablo i zatim gutanjem dospevaju u gastrointestinalni trakt. U gastrointestinalnom traktu, larve sazrevaju u odrasle oblike koji proizvode nova jaja, koja se razvijaju u rabditiformne larve i izlučuju se fecesom. Ovaj složeni ciklus uzrokuje različite kliničke manifestacije koje uključuju upalne reakcije kože (razvoj serpentinastih eritematoznih trakta, poznatih kao larva currens), gastrointestinalne upalne simptome i plućne manifestacije. Kada dođe do hiperinfekcije, posebno kada je narušen ćelijski imunitet, jetra, srce, centralni nervni sistem ili endokrine žlezde takođe mogu biti zahvaćene invazijom filariformnih larvi (González i sar., 2012). Oralni ivermektin u dozi od 200 µg/kg tokom 2 dana ostaje preporučeni tretman za nekomplikovane infekcije izazvane parazitom *Strongyloides* (Suputtamongkol i sar., 2011).

Gnatostomijaza je parazitska bolest koja se javlja u jugoistočnoj Aziji i Latinskoj Americi. Prenosi se konzumiranjem sveže ribe ili morskih plodova zaraženih sa *Gnathostoma spinigerum*, *G. binucleation*, *G. hispidium*, i ređe, drugim vrstama *Gnathostoma*. Jednom progutane, larve migriraju kroz ljudska tkiva izazivajući morfološka oštećenja i imunsku reakciju (González i sar., 2012). Najefikasniji tretman za kožnu gnatostomiazu je hirurško uklanjanje larvi, ali nije praktično za visceralne slučajeve. Hemoterapija se koristi za uništavanje parazita, ali s oprezom jer uginuli paraziti mogu izazvati štetne upalne reakcije, naročito u mozgu. Studije su pokazale da su ivermektin 200 µg/kg primenjen tokom 2 dana a zatim i albendazola 400 mg/kg dva puta dnevno tokom 21 dan efikasni u lečenju gnatostomijaze. U slučaju neurognatostomijaze, ivermektin može pomoći u smanjenju migracije parazita i ublažavanju simptoma, posebno kada se koristi u kombinaciji sa kortikosteroidima kao što su deksametazon i prednizolon. Ove kombinacije pomažu u kontroli upale i edema izazvanih migracijom parazita u nervni sistem. Kliničke studije i prikazi slučajeva sugerišu da ivermektin može značajno poboljšati ishod lečenja kod pacijenata sa neurognatostomijazom (Nogrado i sar., 2023).

Askariaza je parazitska bolest koju izaziva *Ascaris lumbricoides*, jedan od najrasprostranjenijih parazita u ljudskom crevnom traktu. *A. lumbricoides* inficira više od 1,4 milijarde ljudi globalno, naročito u regijama kao što su Azija, Afrika i Južna Amerika. Infekcija se dešava oralnim unosom jaja nematoda putem kontaminirane vode, hrane ili kontakta ruku sa zagađenim materijalima. Larve, jednom unete, sazrevaju u crevnom traktu, dok odrasle ženke proizvode nova jaja koja se izlučuju stolicom, kontaminirajući okolinu i zemljište, čime se kompletira životni ciklus parazita. Iako su simptomi retki, mogu se pojaviti zbog migracije larvi ili prisustva odraslih nematoda, izazivajući imunološke, mehaničke ili direktne povrede tkiva. Ključni uticaj parazita na javno zdravlje ogleda se u doprinosu nutritivnim nedostacima i odloženom fizičkom i kognitivnom razvoju kod dece. Ivermektin se istakao kao bezbedan i visoko efikasan tretman za askariazu, postizujući stope izlečenja od skoro 78% sa pojedinačnom oralnom dozom od 200 µg/kg (Belizario i sar., 2003). Ipak, masovni

dugoročni tretmani ivermektinom u opservacionim studijama nisu pokazali značajan uticaj na kontrolu prenosa i prevalencije *A. lumbricoides* (Ranque, 2001). Čini se da ivermektin nije dovoljno aktivan u kontroli izlučivanja parazita putem stolice, naglašavajući potrebu za suštinskim sanitarnim programima. Pitanje rezistencije na ivermektin postavljeno je kao mogući uzrok ovog fenomena, ali potvrđeni dokazi nedostaju, što zahteva dalje istraživanje (Moncayo i sar., 2008).

Trihurijaza zahvata četvrtinu svetske populacije na svim kontinentima. *Trichuris trichiura* inficira ljudski gastrointestinalni trakt putem feko-oralnog prenosa i uzrokuje lokalne gastrointestinalne simptome. Ispitivanja su pokazala da bi se najveća efikasnost postigla korišćenjem ivermektina u dozi od 200 µg/kg i albendazola od 400 mg (stopa izlečenja od 65% jednom dozom) (Belizario i sar., 2003; Ismail, 1999).

Ivermectin je pokazao efikasnost protiv ektoparazita u veterinarskoj medicini. Kliničari su istraživali njegovu primenu i protiv ektoparazita ljudi, posebno vaši i šugaraca (Ashour, 2019). Infekcija šugarcima predstavlja globalni zdravstveni problem, pogađajući do 300 miliona ljudi širom sveta. Ova infekcija, izazvana grinjom *Sarcoptes scabiei*, često prolazi kroz ciklične fluktuacije uslovljene migracionim kretanjima i zahvata kožu, prenoseći se sa osobe na osobu ili retko putem kontaminirane odeće. Kontakt sa grinjom izaziva odloženu reakciju preosetljivosti tipa IV, uzrokujući suptilne promene na koži i svrab. Oralni ivermektin je efikasan za lečenje klasične i krustozne šuge. Za klasičnu šugu koristi se jedna oralna doza od 200 µg/kg ivermektina (NICE, 2014). Za krustoznu šugu preporučuju se višestruke doze oralnog ivermektina i/ili kombinacija ivermektina sa topikalnom terapijom, kao što su 5% permetrin (Huffam i Currie, 1998) ili 15% rastvor benzil benzoata (Alberici i sar., 2000). Ivermektin je superioran u odnosu na druge tretmane, a oralna terapija se preporučuje kod težih oblika ili kod krustozne šuge. Postoje recidivi, pa se preporučuje ponovljena doza, iako su zabeležena dva slučaja rezistencije (Nofal, 2009).

Infestacije vašima, uključujući vaši glave (*Pediculus humanus capitis*), vaši tela (*Pediculus humanus humanus*) i vaši stidne regije (*Pthirus pubis*), predstavljaju značajan zdravstveni izazov, naročito među decom školskog uzrasta i osobama niskog socijalno-ekonomskog statusa. Ivermektin ne ispoljava direktno ovicidno dejstvo, ali topikalni losion sa 0,5% ivermektina za 10 minuta ispoljava 100% smrtnost izleglih nimfa (Strycharz i sar., 2011). Ipak, laboratorijski rezultati ukazuju na potencijalnu rezistenciju. Preporučene doze variraju u zavisnosti od vrste vaši: za vaši glave preporučuje se oralni ivermektin u dozi od 400 µg/kg svakih 7 dana, za vaši tela oralni ivermektin u dozi od 200 µg/kg svakih 7 dana, a za vaši stidne regije oralni ivermektin u dozi od 250 µg/kg svakih 7 dana ili 250 µg/kg svakih 14 dana (Ameen i sar., 2010; Crump, 2017). Značajan broj pacijenata zahteva drugu dozu radi potpune eradikacije. FDA je odobrila upotrebu 0,5% ivermektin losiona sa maslinovim uljem i ši buterom za lečenje vaši na glavi kod pacijenata starijih od 6 meseci, pružajući emolijentno dejstvo koje pomaže u smanjenju svraba (FDA, 2017; Koch i sar., 2016).

2.3. Primena ivermektina u vreme COVID-19

U *in vitro* studiji koju su sproveli Caly i saradnici (2020), pokazano je da Vero/hSLAM ćelije inficirane virusom SARS-Co-2, kada su bile "izložene" ivermektinu u koncentraciji od 5 µM, imaju smanjenje virusne RNK (ribonukleinska kiselina) od 5000 puta nakon 48 sati u poređenju sa kontrolnom grupom. Ova studija je izazvala mišljenja o nemogućnosti postizanja terapijskog efekta ivermektina na COVID-19 pri rutinskoj dozi. Dalje smanjenje virusne RNK nije primećeno nakon 72 sata. Toksičnost ivermektina nije primećena ni u jednom trenutku, ni u uzorcima tretiranim lekom ni u kontrolnim uzorcima. IC₅₀ za tretman ivermektinom određena je na približno 2 µM. S druge strane, koncentracija IC₅₀ u njihovoj *in vitro* studiji potrebna za inhibiciju rasta SARS-CoV-2 iznosila je približno 2 µM, što je ekvivalentno 1,750 ng/mL (molekulska masa ivermektina, komponente B_{1a} 90%, komponente B_{1b} manje od 10%, iznosi 873,75). Ova koncentracija je 15 do 30 puta veća od maksimalne serumske koncentracije koja se može postići primenom uobičajne terapijske doze od 200 µg/kg telesne mase (oko 50 ng/mL na prazan stomak i oko 130 ng/mL nakon obroka) (Yagisawa i sar., 2021). Studija Caly i saradnika (2020) samo je pokazala da ivermektin ima anti-SARS-CoV-2 aktivnost *in vitro*, ali nekoliko farmakokinetičkih faktora ograničilo je njegovu neposrednu *in vivo*

primenu, jer nema dokaza da se koncentracija od 5 μM ivermektina, koja je korišćena u njihovom *in vitro* eksperimentu na SARS-CoV-2, može postići *in vivo*.

Farmakokinetika ivermektina kod ljudi je dobro opisana i čak i sa najvišom prijavljenom dozom od približno 1700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (što je 8,5 puta više od FDA odobrene doze od 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), maksimalna koncentracija u plazmi bila je samo 0,28 μM (Guzzo i sar., 2002). Takođe, 93% ivermektina vezano je za proteine plazme, što ograničava njegov unos u ćelije endotela (Audus i sar., 1992). Kada se uzme u obzir ukupna koncentracija u plazmi i vezivanje za proteine, slobodna koncentracija ivermektina u plazmi bi bila 250 puta niža od koncentracije potrebne za smanjenje replikacije virusa SARS-Co-2 *in vitro*. Iako su visoke doze ivermektina kod odraslih ili dece dobro podnošljive (Weil i sar., 2019), klinički efekti ivermektina pri koncentracijama od 5 μM su nepoznati i mogu biti povezani sa toksičnošću. Stoga, iako ivermektin ima *in vitro* aktivnost protiv SARS-CoV-2, verovatno je da se taj efekat neće postići *in vivo* pri preporučenim dozama (Peña-Silva i sar., 2021).

Genom SARS-CoV-2, koji je dugačak oko 29,8 kilobaza (kb), sastoji se od 14 otvorenih okvira za čitanje (ORF) koji kodiraju 27 različitih proteina. Prve dve trećine ovog virusnog genoma sadrže replikatni gen, koji se sastoji od dva ORF-a: ORF1a i ORF1b. Ovi ORF-ovi koriste specifičan mehanizam kako bi proizveli dva velika poliproteina. Ovi poliproteini se potom postranslacijski dele na 15 nestrukturanih proteina (nsp), specifično nsp1 do nsp10 i nsp12 do nsp16 (Wu i sar., 2020). Preostali deo genoma SARS-CoV-2 kodira četiri glavna strukturna proteina, koji su ključni za strukturu i funkciju virusa:

- (S) šiljasti protein
- (E) protein omotač
- (M) membranski protein
- (N) nukleokapsidni protein (Wu i sar., 2020).

Nedavna *in silico* studija pokazala je najjaču interakciju između ivermektina i RdRp sa energetskom vrednošću vezivanja od -9,7 kcal/mol, sugerišući potencijalnu inhibiciju virusne replikacije (Swargiary, 2020). RdRp, koji se nalazi u nsp12, je centralni element replikacionog i transkripcionog kompleksa koronavirusa i smatra se obećavajućom metom za razvoj lekova zbog svoje ključne uloge u replikaciji viralnog genoma i transkripciji subgenomskih mRNK (V'kovski i sar., 2021). Ivermektin se vezuje za viralni RdRp i ometa njegovu funkciju. Visoka efikasnost vezivanja ivermektina za nsp14 potvrđuje njegovu ulogu u inhibiciji virusne replikacije i sklapanja. Poznato je da nsp14 igra ključnu ulogu u transkripciji i replikaciji, delujući kao egzoribonukleaza za proveru i kao metiltransferaza u kopiranju viralne RNK (Ma i sar., 2015). Takođe, visoko efikasno vezivanje ivermektina za viralne N fosfoprotein i M protein sugerise njegovu ulogu u inhibiciji virusne replikacije. Ovi nalazi ukazuju na potencijalnu ulogu ivermektina u antivirusnoj terapiji kroz višestruke mehanizme delovanja na različite viralne proteine (Eweas i sar., 2021).

Nakon infiltracije u ćeliju domaćina, virusna RNK je podložna translaciji putem ribozoma domaćina, rezultirajući formiranjem velikog poliproteina. Ovaj poliprotein se dalje procesira, pri čemu određeni enzimi iz njega izlaze putem autoproteolize, te pomažu u oslobađanju drugih proteina neophodnih za replikaciju virusa. Jedan od ključnih enzima koji posreduje u ovom procesu je 3-himotripsinu slična proteaza (3CLpro/Mpro), koja katalizuje odvajanje drugih proteina iz poliproteina, omogućavajući im da izvrše svoje funkcije u replikaciji virusa. Ivermektin, poznat kao inhibitor ove proteaze, vezuje se za nju i remeti njen funkcionalni rad (Mody i sar., 2021). Osim toga, istraživanja ukazuju na to da ivermektin efikasno vezuje i Mpro i u manjoj meri PLpro proteine SARS-CoV-2, što implicira da može sprečiti posttranslacijsku obradu virusnih poliproteina. Ovi nalazi pokazuju potencijal ivermektina kao terapijskog agensa za suzbijanje replikacije SARS-Co-2 virusa (Eweas i sar., 2021).

ACTIV-6 studija, adaptivna platforma sprovedena među ambulantnim pacijentima sa blagim do umerenim COVID-19 u Sjedinjenim Američkim Državama, imala je za cilj procenu efikasnosti ivermektina u ovoj populaciji pacijenata. Učesnici su nasumično dodeljeni da prime ili režim ivermektina (u dozama od 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tokom 3 dana ili 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tokom 6 dana) ili odgovarajući placebo. Tokom faze studije sa dozom od 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, srednje do trajnog oporavka je bio 12 dana za učesnike u ivermektinskoj grupi u poređenju sa 13 dana za one u placebnoj grupi. Suprotno tome,

tokom faze studije sa dozom od 600 µg/kg, srednje vreme do trajnog oporavka bio je 11 dana kako za učesnike u ivermektinskoj grupi, tako i za one u placebo grupi. Ovi nalazi sugerišu da, iako može postojati blaga tendencija ka bržem oporavku uz terapiju ivermektinom, posebno pri nižoj dozi, razlika nije bila statistički značajna u poređenju sa placebom i ne podržavaju upotrebu ivermektina kod pacijenata sa blagim do umerenim COVID-19 (Naggie i sar., 2022, 2023).

I-TECH, otvoreno kliničko ispitivanje sprovedeno u Maleziji, nije pokazalo značajnu razliku između grupe koja je primala ivermektin i grupe koja je primala standardnu negu u pogledu primarnog ishoda rizika od progresije u teški oblik COVID-19 (21,6% naspram 17,3%). Iako su pacijenti u grupi koja je primala ivermektin pokazali niži relativni rizik od smrtnosti u poređenju sa onima koji su primali standardnu negu (relativni rizik 0,31; 95% CI, 0,09–1,11; $p = 0,09$), ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Dobijeni rezultati ne pružaju dovoljnu podršku za korišćenje ivermektina kao superiorne alternative u tretmanu pacijenata sa COVID-19 (Lim i sar., 2022).

Populacije pacijenata u većini pregledanih kliničkih ispitivanja bile su osobe sa blagim do umerenim oblikom COVID-19, koje su imale relativno nizak rizik od progresije bolesti, uz očekivano nizak broj smrtnih slučajeva (Abd-Elsalam i sar., 2021; Galan i sar., 2021; López-Medina i sar., 2021; Mohan i sar., 2021; Ravikirti i sar., 2021). U ovim randomizovanim ispitivanjima, potpuno isključivanje potencijalnog efekta ivermektina na progresiju bolesti COVID-19 je izazovno, jer ispitivanja nisu bila dovoljno obimna da otkriju razlike u sekundarnim ishodima, poput smrtnosti. Ipak, dostupni podaci iz ovih ispitivanja ne pružaju dovoljno dokaza koji bi podržali efikasnost ivermektina u tretmanu COVID-19. S obzirom na to da su drugi lekovi pokazali jasne kliničke koristi u lečenju COVID-19, ne preporučuje se upotreba ivermektina za lečenje ove bolesti (National Institutes of Health, 2023).

Hoang i saradnici (2022) su uradili retrospektivnu analizu slučajeva iz Centra za trovanje Oregon, koji su se odnosili na upotrebu ivermektina radi prevencije ili lečenja COVID-19, a rezultirali su posetom zdravstvenoj ustanovi tokom 24-nedeljnog perioda (od 14. avgusta 2021. do 31. januara 2022. godine). Neurotoksičnost je bila najčešća tegoba kod pacijenata koji su uzimali ivermektin bez obzira na status COVID-a, formulaciju, dozu ili hroničnost. Većina prijavljenih simptoma bila je neurološka, gastrointestinalna i mišićno-skeletna. Ukupno, prosečna ukupna doza koju su pacijenti uzimali bila je 277,8 µg/kg, a prosečna dnevna doza bila je 57,1 mg. Šest pacijenata je koristilo propisane inhibitore P-gp, uključujući makrolide, inhibitore protonske pumpe i beta blokatore. Pet pacijenata koji su uzimali inhibitore P-gp uzeli su akutne doze koje su bile veće od preporučenih (u rasponu od 21 do 136,5 mg). Pacijenti koji su uzimali P-gp inhibitore uz simptome su prijavili opštu slabost, gastrointestinalne tegobe ili tegobe mišićno-skeletnog sistema.

Na osnovu podataka Državnog centra za trovanje Oregona (SAD) objavljenih u New England Journal of Medicine, doze ivermektina koje su uzimali ljudi hospitalizovani u centru tokom pandemije iznosile su do 1800 µg/kg, oralno, dok je terapija obično trajala 5-7 dana. Konfuzija, ataksija, konvulzije i hipotenzija su prijavljeni kod hospitalizovanih pacijenata (Temple i sar., 2021).

Više *in vitro* ispitivanja i nekoliko kliničkih studija na ljudima je sprovedeno u periodu COVID-19 pandemije sa ciljem testiranja efikasnosti ivermektina protiv virusa uzročnika infekcije. Verovatni razlog očekivanja da će ivermektin ispoljiti antivirusno dejstvo je prethodno korišćenje antimalarika hlorokvina i hidrosihlorokvina u protokolima lečenja infekcije COVID-19, i činjenica da ivermektin *in vitro* deluje na uzročnika malarije, protozou *Plasmodium falciparum*. Na žalost ni jedna studija nije pokazala terapijsku efikasnost ali su primenjene doze u kliničkim ispitivanjima često ispoljavale toksičnost. Primenjene doze ivermektina su se kretale od 600 do 2000 µg/kg, davane peroralno najčešće tokom 5 dana, a studije su uglavnom prekidane zbog teškog stanja pacijenata, koje je procenjavano kao posledica dejstva ivermektina (Buonfrate i sar., 2022).

2.4. Mehanizmi dejstva ivermektina

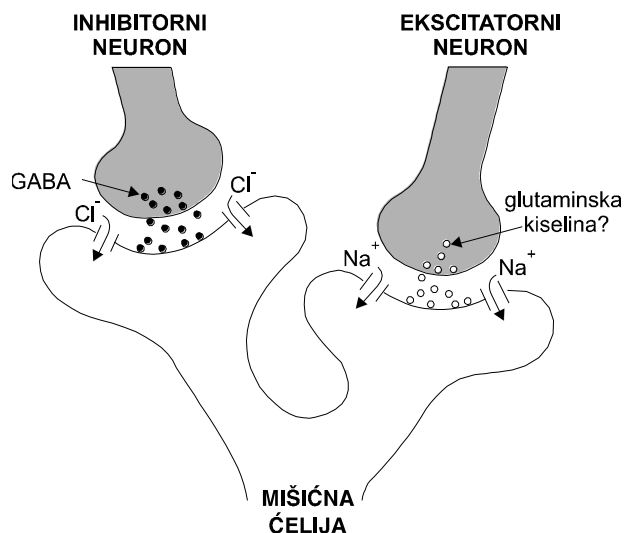
U početnim fazama istraživanja ivermektina, naučnici su smatrali da ovaj lek blokira neurotransmisiju delujući na hloridne kanale koje otvara γ -amino-buterna kiselina (GABA), izazivajući značajne poremećaje na GABA receptorima kod beskičmenjaka i sisara. GABA je poznata kao glavni inhibitorski neurotransmiter u somatskom neuromišićnom sistemu nematoda. Međutim, kasnija istraživanja su otkrila da su zapravo glutamat-zavisni hloridni kanali (GluCl^-) prava meta delovanja ivermektina i srodnih makrocikličnih endektocida. Ovo otkriće je otvorilo nove mogućnosti za istraživanja, budući da ovi kanali, iako igraju ključne uloge kod nematoda i insekata, nisu prisutni kod kičmenjaka (Turner i Schaeffer, 1989).

U ljudskom organizmu, ivermektin ispoljava specifičan i jedinstven efekat, koji još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Imunski odgovor na infekciju mikrofilarijama pokazuje visok stepen kompleksnosti, gde Th2-tip odgovora igra ključnu ulogu u suzbijanju infektivnih L3 larvi i mikrofilarija, dok kombinacija Th1 i Th2 puteva doprinosi otpornosti prema adultnim nematodama. Pretpostavlja se da odrasle ženke filarijalnih nematoda mogu manipulirati imunoregulacijskim okruženjem, verovatno putem modulacije nivoa interleukina 10 (IL-10), čime obezbeđuju preživljavanje svojih mikrofilarijalnih potomaka (Maizels i Lawrence, 1991).

Terapija ivermektinom kod onhocerkoze rezultira brzim i dugotrajnim nestankom mikrofilarija iz perifernih kožnih limfnih sudova. Osim toga, ivermektin inhibira odrasle ženke nematode u oslobađanju novih mikrofilarija, što doprinosi smanjenju ukupnog broja parazita u organizmu (Greene i Taylor, 1989).

Vezivanjem za glutamat-zavisne hloridne kanale (GluCl^-), ivermektin remeti neurotransmisiju regulisanu ovim kanalima kod nematoda. Međutim, *in vitro*, lek pokazuje minimalan direktan efekat na mikrofilarije kada se primenjuje u farmakološki relevantnim koncentracijama. Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) ivermektina kod ljudi iznosi 12–36 sati, dok njegovi metaboliti mogu ostati prisutni do tri dana. S obzirom da se najniži nivoi dermalnih mikrofilarija javljaju značajno nakon ovog vremenskog perioda, pretpostavlja se da ivermektin ne ubija sve mikrofilarije u prvih nekoliko dana (Crump i Omura, 2011). Ova pretpostavka je podržana izveštajima o migraciji mikrofilarija u dublje slojeve dermisa, potkožno masno tkivo, vezivno tkivo i limfne čvorove nakon administracije leka (Wolstenholme i Rogers, 2005).

Svi antinematodni lekovi iz klase makrolida deluju kao agonisti GABA receptora, pojačavajući endogeno oslobađanje ove inhibitorne aminokiseline i njen odgovor na GABA receptore. Makrolidni antinematodni lekovi (ML) deluju na različite životne stadijume mnogih nematoda i artropodnih vrsta putem modulacije Cys-loop porodice ligand zavisnih jonskih kanala, uključujući glutamat zavisne hloridne kanale (GluCl^-) (Meyers i sar., 2015). Ivermektin povećava provodljivost hloridnih jona, što dovodi do dugotrajne hiperpolarizacije postsinaptičke membrane i smanjene formacije akcionih potencijala, čime se blokiraju dalji funkcionalni procesi u ciljnim ćelijama (Ménez i sar., 2012). Ovi lekovi deluju kao agonisti glutamat zavisnog hloridnog kanala. GABA otvara hloridne kanale na postsinaptičkoj membrani, što omogućava ulazak jona hlora iz ekstracelularnog u intracelularni prostor (Slika 3). Ovaj proces rezultira smanjenjem rezistencije ćelijske membrane i hiperpolarizacijom postsinaptičke membrane. U prisustvu ivermektina, hloridni kanali ostaju otvoreni čak i kada bi trebalo da budu zatvoreni, što omogućava ulazak hloridnih jona u ćeliju, umesto jona natrijuma. Ovo dovodi do negativnog naelektrisanja motoneurona (niskog električnog otpora), čime se sprečava registrovanje inhibitornih i ekscitatornih signala u ćelijama primaocima. Iako su motoneuroni i mišićne ćelije spremni za "akciju", ne dobijaju odgovarajući signal, što rezultira paralizom somatskih mišića, posebno faringealne pumpe, što uzrokuje smrt parazita (Campbell, 1981). Kod sisara, GABA receptori i neuroni nalaze se u centralnom nervnom sistemu, dok su kod artropoda i nematoda smešteni u perifernom nervnom sistemu. Selektivna toksičnost ovih supstanci proizlazi iz toga što ne prolaze kroz KMB sisara, što znači da ne pokazuju efekte u centralnom nervnom sistemu domaćina. Ovo, zajedno sa relativno niskim koncentracijama leka potrebnim za efikasnost, obezbeđuje da sisari mogu uzimati ivermektin s visokim stepenom sigurnosti (Campbell i sar., 1983).



Slika 3. Vezivanje za hloridne kanale koje kontroliše glutamat unutar tretiranih parazita. Ovo vezivanje rezultira pojačanim ulaskom jona hlora i naknadnom hiperpolarizacijom nervnih ćelija parazita. Kao posledica toga, ometa se prenos nervnih signala, što konačno dovodi do paralize i smrti parazita (Trailović, 2001).

GABA predstavlja neurotransmitter koji posreduje u prenosu inhibitornih impulsa iz interneurona ka motoneuronima bezkičmenjaka. Ovaj ključni element se pokazao od suštinskog značaja pri objašnjenju mehanizma nematocidnog delovanja avermektina. Brojna elektrofiziološka istraživanja su potvrdila da avermektini, uključujući i ivermektin, deluju kao agonisti GABA-ergičkih receptora. Specifično, avermektini potenciraju efekte GABA na sinaptičkom nivou putem stimulacije presinaptičkog oslobađanja GABA-e, istovremeno povećavajući afinitet za postsinaptičko vezivanje za GABA-ergičke receptore (Ivanović, 2013).

Istraživanja ukazuju da aktivnost ivermektina može uticati ne samo na neurofiziologiju parazita, već i na imunski odgovor domaćina, što može biti ključni deo njegovog terapijskog dejstva. (López-Olvera i sar., 2006). Receptori makrolidnih antinematodnih lekova (podjedinica AVR-14 GluCl⁻) identifikovani su kod mikrofilara *Brugia malayi*. Ovi receptori su locirani blizu ekskretornog-sekretornog (ES) aparata, a makrolidni antinematodni lekovi izazivaju smanjenje oslobađanja ES proteina iz mikrofilara i juvenilnih filarija, kao i sekreciju uterusnog fluida kod adultnih nematoda. ES proteini imaju imunomodulatorna svojstva koja omogućavaju parazitu da izbegne prirodni imunski sistem domaćina. Stoga, pod dejstvom makrolidnih antinematodnih lekova, mikrofilarije i adultne nematode se prepoznaju kao strana tela, što pokreće sistemski imunski odgovor sposoban da eliminiše parazita i razvije memoriju koja utiče na nove filarijalne infekcije (Ashour, 2019; Moreno i sar., 2010).

Odgovor imunskog sistema domaćina je ključan za potpunu aktivnost makrolidnih antinematodnih lekova, sa sugestijom o povećanoj efikasnosti u *in vivo* uslovima i razlikama u koncentracijama potrebnim *in vitro* i *in vivo*. Otkriveno je da efikasnost ivermektina opada kod pacijenata sa koinfekcijom humanim T-ćelijskim limfotropnim virusom tipa 1 (HTLV-1) i strongiloidiazom. To je pretežno rezultat oštećenja Th2 imunološkog odgovora protiv *Strongyloides stercoralis*, što se manifestuje kroz smanjene nivoe IL-4 i IL-5, kao i niže nivoe imunoglobulina E (IgE) u serumu. Stoga, verovatnoća efikasnosti ovih lekova direktno zavisi od očuvanosti imunskog odgovora (Ashour, 2019; Kinjo i sar., 2006). Pored toga, istraživanja sugerišu da ivermektin redukuje oslobađanje proteinskih materijala iz mikrofilara, koji igraju ključnu ulogu u izbegavanju prirodnog imunološkog odgovora domaćina. Ovaj efekat doprinosi brzom eliminisanju mikrofilara nakon tretmana, ne toliko zbog neposrednog delovanja leka, već usled inhibicije sposobnosti parazita da luče proteine koji omogućavaju izbegavanje prirodnog imunskog odgovora domaćina (Crump i Omura, 2011).

U životinjskim modelima, Th2 odgovori su se pokazali kao zaštitni imunitet protiv L3 infektivnih larvi i mikrofilarija, međutim, paraziti često uspevaju izbeći ove odgovore. Takva činjenica otvara perspektivu za razvoj efikasne vakcine, uz pretpostavku da se potpuno razume ovaj proces. Ovaj pregled takođe pruža objašnjenje odsustva ili relativno sporog razvoja otpornosti na lek kod osoba koje su podvrgnute redovnom tretmanu ivermektinom tokom više od 20 godina (Crump i Omura, 2011).

2.5. Farmakokinetika ivermektina

Najvažniji faktori koji utiču na bioraspoloživost i trajanje delovanja različitih preparata ivermektina uključuju način primene i vrstu formulacija (Canga i sar., 2008). Ivermektin je generalno nerastvorljiv i nestabilan u vodenim preparatima. Stoga, da bi se prevazišao problem loše rastvorljivosti u vodi i dobila stabilna formulacija ivermektina za injekcije, razvijeno je nekoliko komercijalnih preparata koji koriste organske rastvarače kao nosače. Međutim, prijavljeno je da visoke koncentracije organskih rastvarača izazivaju značajne neželjene efekte kod mnogih vrsta (Dong i sar., 2016).

U Veterinarskoj medicini najčešće preporučena doza ivermektina kreće se od 50-600 µg/kg ivermektina, primenjenog p.o., parenteralno ili lokalno (spot-on ili pour-on). Ivermectin je dostupan kao 1% (10 mg/mL), 2% (20 mg/mL) i 0,27% (2,7 mg/mL) injekcioni rastvor, 10 mg/mL oralni rastvor, 5 mg/mL pour-on za goveda, 0,8 mg/mL oralni rastvor za ovce, 18,7 mg/mL oralna pasta, u obliku tableta od 68, 136 i 272 µg; i tableta za mačke od 55 i 165 mg. Vodotopivi topikalni proizvod od 0,01% (0,1 mg/mL) dostupan je u ampulama u folijskim pakovanjima za lečenje ušnih grinja kod mačaka (Papich, 2021).

Odobreni režimi lečenja ivermektinom u humanoj medicini su sledeći: 150 µg/kg jednom godišnje za onhocerkozu, 200 µg/kg kao jednokratna doza za strongiloidozu i 150 do 200 µg/kg dva puta godišnje ili 300 do 400 µg/kg jednom godišnje u endemskim područjima za limfatičku filarijazu. Najveća iskustva u primeni ivermektina kod ljudi su zabeležena u dozama od 150 do 200 µg/kg (Guzzo i sar., 2002).

U humanoj medicini odobrene i dostupne su sledeće formulacije ivermektina: 0,5% topikalni losion (FDA, 2017), 1% topikalni krem (FDA, 2022a) i tablete 3 mg (FDA, 2022b).

2.5.1. Apsorpcija

Resorpcija ivermektina posle p.o. ili parenteralne aplikacije kod životinja je uglavnom dobra ali se značajne razlike pojavljuju u zavisnosti od korišćenih konstituenata u preparatu i vrste životinje kod koje se koristi. Tako posle s.c. aplikacije govedima, 1%-tnog rastvora ivermektina (200 µg/kg) koji sadrži 60% propilenglikola i 40% glicerofomola, maksimalna koncentracija u plazmi od 44ng/ml zabeležena je u toku prvih 24 časa. Ovakva formulacija omogućila je laganu resorpciju i održavanje terapijske koncentracije 2 nedelje posle davanja (Campbell i Benz, 1984). Slične rezultate dobili su i drugi autori, pa je tako posle s.c aplikacije govedima doze ivermektina od 200 µg/kg, maksimalna koncentracija leka od 44 ng/ml u plazmi dokazana tokom 48 sati, dok je biološko poluvreme eliminacije iznosilo 8,3 dana (Fink i Porras, 1989). S druge strane ispitivanja na svinjama se pokazala brža resorpcija posle p.o. davanja u odnosu na parenteralnu aplikaciju (s.c.), i to kada je za s.c. davanje korišćena formulacija sa propilenglikol/glicerofomolom (60:40), a za peroralnu ivermektin rastvoren u propilenglikolu (Tolan i sar., 1980). Posle parenteralne aplikacije ivermektina svinjama dolazi do nešto sporije resorpcije, verovatno zbog precipitacije leka na mestu injiciranja (Campbell, 1993). Kod ovaca deo resorbovane doze posle s.c injekcije iznosi 22% u komparaciji sa intravenskim (i.v.) načinom aplikacije. Izračunata je i vrednost konstante resorpcije koja iznosi kod ovaca $K_a=1,2$ dana, dok maksimalnu koncentraciju u plazmi ovaca posle parenteralnog davanja ivermektin dostiže za 12 sati (Lo i sar., 1985). Ispitivanja bioraspoloživosti ivermektina posle različitih načina aplikacije pokazala su da je s.c. aplikacija najbolji put unošenja leka u organizam životinja (Oksanen i sar., 1995).

U humanoj medicini, u okviru istraživanja na zdravim ispitanicima, koji su podvrgnuti primeni ivermektina u različitim farmaceutskim oblicima (oralni rastvor, tablete i kapsule), uočena je značajna varijabilnost u sistemskoj bioraspoloživosti. Važno je napomenuti da je oralni rastvor bio formulisan kao etanolni rastvor, što može uticati na bioraspoloživost i potencijalno objasniti dvostruko veću bioraspoloživost u odnosu na tablete i kapsule. Ipak, brzina apsorpcije je bila slična u sva tri slučaja (Edwards i sar., 1988). Analiza podataka od zdravih dobrovoljca i osoba s onhocerkozom, lečenih ivermektinom (150 µg/kg), ukazuje na odsustvo značajnih razlika u farmakokinetičkim parametrima. Nakon početnog opadanja, obe grupe pokazale su trend sekundarnog porasta nivoa leka u plazmi, najčešće između 6 i 12 sati nakon primene, što implicira na mogućnost enterohepatičkog reciklisanja (Baraka i sar., 1996).

Sposobnost postizanja adekvatnih nivoa ivermektina nakon oralne primene kod pacijenata sa diseminovanom strongiloidozom može biti oslabljena, što ukazuje na potrebu za alternativnim putevima primene ivermektina kod ovih pacijenata. Nivo ivermektina nakon oralne administracije kod pacijenata s diseminovanom strongiloidijazom. bili su ispod prosečnih vrednosti prijavljenih u drugim studijama nakon oralne primene (1,1 ng/ml nakon ukupne doze od 1.000 µg/kg tokom 3 uzastopna dana). Nakon toga usledila je primena tri supkutane doze (200 µg/kg), koje su ubrizgane svaka dva dana, što je povećalo nivo ivermektina na 7,9 ng/ml u roku od jedne nedelje nakon poslednje doze, uz dokaze o dodatnoj akumulaciji metabolita i postojanom antiparazitskom efektu. Intervencija s.c. dozama rezultirala je povećanjem nivoa ivermektina i održanim antiparazitskim efektom, naglašavajući potrebu za alternativnim putevima administracije, posebno kod pacijenata s otežanom apsorpcijom oralnih lekova (Marty i sar., 2005).

2.5.2. Distribucija

Distribucija i biološko poluvreme eliminacije ivermektina razlikuju se u zavisnosti od načina aplikacije, vrste životinje i farmaceutske formulacije koja je korišćena. Poluvreme eliminacije ivermektina ($t_{1/2}$) u plazmi goveda posle i.v. aplikacije doze od 300 µg/kg iznosi 2,8 dana. Posle i.v. aplikacije ovcama $t_{1/2}$ ivermektina je slična kao i kod goveda ($t_{1/2}=2,7$ dana), međutim koncentracija u plazmi ovaca je niža u odnosu na goveda a volumen distribuciji viši (1,9 u odnosu na 4,6 L/kg). Poluvreme eliminacije ivermektina u goveda posle s.c. aplikacije doze od 200 µg/kg iznosi 8 dana i značajno je duži nego posle i.v. aplikacije (Riviere i Papich, 1995). Peroralno davanje ivermektina ovcama (200 µg/kg) rezultira u $t_{1/2}$ od 3-5 dana i maksimalnoj koncentraciji u serumu za 24 sata (Riviere i Papich, 1995). Razlike u distribuciji ivermektina zapažene su i kod konja, i to u zavisnosti od formulacije koja je primenjena (oralna pasta ili rastvor). Posle p.o. davanja maksimalnu koncentraciju u serumu ivermektin brže postiže kada je primenjen rastvor (4-5 sati) u odnosu na pastu (15 sati) (Riviere i Papich, 1995). Ispitivanja distribucije ivermektina pokazala su da se kod goveda posle s.c. aplikacije ovaj anthelminetik najbolje distribuira u tkivo jetre i masno tkivo, sa $t_{1/2}$ od 4,8 dana. Izvorna supstanca se zadržava u tkivima u nivou do 50% kod goveda 14 dana, ovaca 5 dana a svinja i pacova 7 do 3 dana posle aplikacije (Chiu i sar., 1990).

Kod ljudi se ivermektin distribuira unutar tela zahvaljujući izrazitoj lipofilnosti. Kod zdravih muškaraca, volumen distribucije u centralnom kompartmentu (V_c), iznosio je 3,1 i 3,5 l/kg nakon ingestije 6mg odnosno 12 mg ivermektina (Krishna i sar., 1993). Kod pacijenata sa onhocerkozom, koji su primili 6 mg (tableta) ivermektina, volumen distribucije (V_d) je iznosio 9,9 l/kg, a srednje vreme zadržavanja (MRT) 3,7 dana (Okonkwo i sar., 1993).

Distribucija ivermektina u tkivima bila je slična kod zdravih osoba i osoba sa onhocerkozom, dobrovoljaca tretiranih oralno. Infekcija *Onchocerca volvulus* ne utiče na raspodelu ovog leka. Jedinjenje je prisutno u masnom tkivu, koži, potkožnoj fasciji, čvorovima i fragmentima nematoda. Masno tkivo je pokazalo najviše i najupornije nivoe, dok su vrednosti za kožu, nodularna tkiva i nematode bile uporedive, s najnižim koncentracijama zabeleženim u potkožnoj fasciji (Baraka i sar., 1996). Kod pacijenata sa infekcijom *Onchocerca volvulus* tretiranih oralnim ivermektinom (150 µg/kg), Elkassaby (1991) je takođe detektovao lek u nodularnom tkivu parazita i fragmentima crva. Nakon s.c. administracije (500 µg/kg) govedima sa čvorovima *Onchocerca ochengi* (parazitima goveda koji se mogu koristiti kao model za *O. volvulus*), visoke koncentracije su detektovane u zidu

kapsule i unutar čvora (55 i 45 ng/g drugog dana; 60 i 30 ng/g sedmog dana). Stoga, slaba penetracija ivermektina u čvorove ne bi mogla objasniti nedostatak efikasnosti protiv odraslih filarija (Cross, 1997). U koži, maksimalna koncentracija leka u skvamama, sebumu i znoju na čelu i antitenaru bila je zabeležena 8 sati nakon oralne doze od 12 mg i brzo je opadala posle 24 sata (Haas i sar., 2002). Ivermektin se snažno vezuje za proteine plazme kod zdravih osoba (93,2%) (Klotz i sar., 1990). Vezivanje je takođe bilo visoko kod pacijenata sa onkocerkozom (93,1%), sa specifičnim vezivanjem za serum albumine. Postoje dva mesta vezivanja, sa konstantom vezivanja od $2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$ na primarnom mestu. Ovo snažno vezivanje ima veliki značaj jer se lek primenjuje u područjima gde je malnutricija i hipoalbuminija uobičajena, pa se kod ovih pacijenata može očekivati smanjenje plazma proteina i posledično, veći slobodni deo ivermektina. Međutim, acetilsalicilna kiselina ne remeti vezivanje ivermektina (Okonkwo i sar., 1993). Ivermektin nije detektovan u cerebrospinalnoj tečnosti kod čoveka sa diseminiranom strongiloidiazom, teškom hipoalbuminijom i paralitičkim ileusom, nakon pet s.c. doza ivermektina, kada je nivo u serumu iznosio 12,1 ng/ml (Marty i sar., 2005).

2.5.3. Biotransformacija

Metabolizam resorbovanog ivermektina u jetri i masnom tkivu goveda, ovaca i koza je sličan. Neke razlike su primećene u odnosu na biotransformaciju kod svinja. Glavno mesto biotransformacije je jetra (Halley i sar., 1992, Halley i sar., 1987). Najvažniji metabolit koji nastaje u jetri je 24-hidroksimetil- H_2B_{1b} , koji konjuguje sa masnim kiselinama i ugrađuje se kao ester u masno tkivo. Glavni metabolit ivermektina u svinja je 3"-O-desmetil- H_2B_{1b} , koji se takođe deponuje u masnom tkivu (Chiu i sar., 1987). U Metabolizam ivermektina kod životinja su uključeni mikrozomalni enzimi jetre, pri čemu citohrom P450 ima glavnu ulogu.

Studije o metabolizmu ivermektina kod ljudi su retke. Ovaj lek se obimno metabolizuje od strane ljudskih mikrozomalnih enzima jetre putem citohroma P450. Prevladavajući izooblik odgovoran za biotransformaciju ovog jedinjenja u jetri kod ljudi je citohrom P450 3A4, koji pretvara lek u najmanje 10 metabolita, većinom hidroksilovanih i demetilovanih derivata (Zeng i sar., 1998).

2.5.4. Eliminacija

Fekalna ekskrecija je najvažniji put eliminacije ivermektina iz organizma kod svih životinjskih vrsta. Samo 2% date doze izluči se urinom (Jacob i sar., 1983). Radioaktivni abamektin obeležen tricijumom, korišćen je za određivanje inteziteta ekskrecije posle intravenske (i.v.) ili dermalne aplikacije kod majmuna. Posle i.v. aplikacije 95% doze 6 mg i 97% od doze 300 mg izlučeno je fecesom i urinom. Kada je u pitanju bila dermalna aplikacije < 99% radioaktivnosti zabeleženo je na mestu nanošenja ivermektina, što praktično znači da se manje od 1% dermalno aplikovane doze resorbuje (Campbell, 1989). Mada se po nekim autorima urinom izluči svega 0,5 do maksimalno 2% parenteralno aplikovane doze ivermektina, čak do 5% iste može se izlučiti mlekom tretiranih životinja (Toutain i sar., 1988).

Nisu uočene razlike u poluvremenu eliminacije između zdravih ljudi i pacijenata sa onhocerkozom (Baraka i sar., 1996). Ivermektin i njegovi metaboliti izlučuju se pretežno putem fecesa i samo 1% putem urina. Pozitivna identifikacija postignuta je za prisustvo 3"-O-desmetil- H_2B_{1a} i 22,23-dihidroavermektin B_{1a} monosaharida u urinu i fecesu (Fink i Porras, 1989). U mleku zdravih žena koje su primile 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, maksimalna koncentracija (14,1 ng/ml) postignuta je za 6,5 sati (Ogbuokiri i sar., 1994). Na osnovu ovih informacija, dete koje se doji bi dobilo prosečnu dozu od svega 2,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ putem mleka. Stoga, ovi autori nisu preporučili isključivanje dojilja iz masovnih terapija ivermektinom, jer one čine samo 5-10% populacije na područjima gde je onhocerkoza hiperendemična.

2.6. Toksičnost i neželjena dejstva

Od svih vrsta životinja neželjeni efekti ivermektina su najčešće registrovani kod pasa. Dobro je poznato da su posebno osetljivi psi rasa Coli i Pinč, mada su trovanja ivermektinom zabeležena i kod drugih rasa kao i kod mešanaca. Početna ispitivanja toksičnosti ivermektina srovedena su na psima rase Bigl. U ovim istraživanjima utvrđene su doze koje prouzrokuju toksične efekte. Međutim, kasnije je pokazano da su psi rase Coli znatno osetljiviji na ivermektin i da niže doze ovog antiparazitika mogu da prouzrokuju ozbiljne toksične efekte. Neželjena dejstva ivermektina zabeležena su kako posle njegove oralne tako i posle parenteralne primene. Kratko vreme posle davanja psima beleži se pojačana salivacija, proširenje zenica, povraćanje, tremor i ataksija. Kasnije kliničku sliku upotpunjuje opšta slabost, nepomično ležanje, izostajanje reakcije na spoljašnje nadražaje, stupor i koma (Paul i sar., 1987). Neki autori navode da i unutar rase Coli postoje značajne individualne razlike u osetljivosti na ivermektin. Ivermektin u dozi od 100 µg/kg, koja je 16 puta veća od preporučene profilaktičke doze za larvene oblike srčanog crva (6 µg/kg), u Coli pasa ne prouzrokuje neželjene efekte, dok doza od 200 µg/kg prouzrokuje toksične efekte u 50% tretiranih pasa (Paul i sar., 1991).

U goveda, preporučene terapijske doze ivermektina, mogu da prouzrokuju trovanje koje se manifestuje inkordinacijom, muskularnom fascikulacijom, suženjem i pojačanjem salivacijom već posle 24 sata od aplikacije leka. U otrovanih životinja jezik je paralizovan a uginuća nastaju u toku 24 sata od davanja ili u naredne 3 nedelje. Na obdukciji životinja otrovanih ivermektinom nisu nađene značajnije promena. Jedini signifikantni nalaz je povećana koncentracija ivermektina u mozgu. Ovakva pojava objašnjena je činjenicom da su slučajevi trovanja zabeleženi samo kog Murray-Greys goveda, odnosno povećanom propustljivošću meninga (za ivermektin), koja je genetski uslovljena kod ove rase (Radostits i sar., 1994).

Ivermektin se već više od tri decenije koristi u humanoj medicini za lečenje filarijaze, onhocerkoze i strongiloidoze kod ljudi, kao i za druge dermatološke bolesti poput šuge, vašljivosti i demodikoze. Iako se smatra sigurnim u preporučenim dozama, ivermektin može izazvati pruritus, limfadenitis, artralgiu i groznicu, ponekad kao deo Mazzotti reakcije. Najozbiljniji bezbednosni problem vezan za ivermektin, iako retko, je neurotoksičnost. Međutim, u poslednjih nekoliko godina zabeleženo je nekoliko slučajeva ozbiljnih kožnih neželjenih reakcija na lekove (SCARs) nakon primene sistemskog ivermektina, uključujući SJS (Stevens-Johnsonov sindrom), TEN (toksična epidermalna nekroliza) i DRESS (lekovima izazvan sindrom eozinofilije i sistemskih simptoma), sa stopom smrtnosti od 20%. Disproporcionalna analiza pokazala je značajnu povezanost između sistemskog ivermektina i prijava SCARs, što potvrđuje i nedavna studija iz VigiBase, druge baze podataka za farmakovigilancu (Bomze i sar., 2022).

Između decembra 2003. i jula 2020. godine, nakon eliminacije duplikata, prijavljeno je 2041 slučaj sumnjivih ozbiljnih neželjenih reakcija na lekove povezanih sa primenom antihelmintika, od kojih je 209 (10,2%) rezultiralo smrtnim ishodom. Od toga, 667 slučajeva ozbiljnih neželjenih reakcija na lekove bilo je povezano sa primenom ivermektina, sa značajnim razlikama u broju prijave između podsaharske Afrike i ostatka sveta. Većina prijave se odnosila na osobe uzrasta 18–44 godine, pri čemu su zdravstveni radnici bili primarni izvor prijave. Prosečna starost pacijenata bila je značajno niža u podsaharskoj Africi u odnosu na ostatak sveta. Smrtonosni ishodi su bili češći u ostatku sveta nego u podsaharskoj Africi, a onhocerkoze je bila najčešća indikacija za upotrebu ivermektina, posebno u podsaharskoj Africi, dok je šuga bila druga najčešća indikacija u ostatku sveta. Prijave su uglavnom dolazile iz Sjedinjenih Američkih Država, Francuske i Demokratske Republike Kongo. Najčešće prijavljene neželjene reakcije odnosile su se na opšte poremećaje, poremećaje nervnog sistema i poremećaje kože i potkožnog tkiva. Ozbiljne encefalopatije i toksidermije povezane sa upotrebom ivermektina prijavljene su u različitim geografskim regionima, sa značajnim razlikama u indikacijama i učestalosti između posaharske Afrike i ostatka sveta (Campillo i sar., 2021).

U eksperimentalnom ispitivanju intravenskih doza ivermektina na pacovima, ustanovljeno je da doze od 2,5, 5,0 i 7,5 mg/kg ne izazivaju klinički vidljivu depresiju centralnog nervnog sistema. Nasuprot tome, doza od 10 mg/kg uzrokuje poremećaje kretanja, karakterisane nesigurnim i sporijim

hodom, koji spontano nestaju u roku od 10 do 40 minuta. Najviša testirana doza, 15 mg/kg, dovela je do značajne depresije CNS-a, nalik stanju opšte anestezije, sa trajanjem dužim od 12 sati. Dva od deset pacova su uginula nakon 12 sati od primene ove doze (Trailović, 2001).

Tokom pandemije COVID-19, zabeležen je porast slučajeva toksičnosti izazvane ivermektinom u Sjedinjenim Američkim Državama, posebno među pacijentima koji su koristili ovaj lek za prevenciju ili lečenje COVID-19. Retrospektivna analiza podataka iz Centra za trovanja u Oregonu, koja je obuhvatila period od avgusta 2021. do januara 2022. godine, identifikovala je 37 slučajeva toksičnosti izazvane ivermektinom. Pacijenti, pretežno muškarci stariji od 60 godina, razvili su neurološke simptome, gastrointestinalne i mišićnoskeletne tegobe. Većina pacijenata je hospitalizovana ili tretirana u hitnoj službi, dok su pacijenti koji su koristili veterinarske formulacije ivermektina uzimali veće doze i imali izraženije promene u mentalnom statusu. S druge strane, pacijenti sa hroničnim unosom manjih doza tokom nekoliko nedelja ispoljili su blažu toksičnost. Studija ukazuje na značajne razlike u kliničkim efektima između pacijenata koji su koristili veterinarske naspram formulacija ivermektina za humanu upotrebu, kao i između onih sa akutnim i hroničnim obrascima unosa, naglašavajući potrebu za oprezom prilikom primene ovog leka (Hoang i sar., 2022).

Opisani slučajevi ukazuju na potencijalne toksične efekte ivermektina, uključujući ozbiljne epizode konfuzije, ataksije, napada i hipotenzije, kao i na rastuću učestalost neadekvatne upotrebe ovog leka. Postoji nedovoljno dokaza koji podržavaju upotrebu ivermektina za lečenje ili prevenciju COVID-19, dok nepravilna upotreba, kao i moguća interakcija sa drugim lekovima, može dovesti do ozbiljnih neželjenih efekata koji zahtevaju hospitalizaciju (Temple i sar., 2021).

2.7. Krvno-moždana barijera i povezanost sa toksičnošću ivermektina

KMB igra ključnu ulogu u regulaciji ulaska lekova u CNS. Ova barijera se sastoji od endotelnih ćelija koje formiraju tesne spojeve, čime se ograničava prodor hidrofилnih lekova u CNS, osim ako ne postoji mehanizam nosača koji omogućava njihov transport kroz KMB. Iako lipofilni lekovi imaju sposobnost pasivnog prelaska preko KMB, prisustvo efluksnih transportera, poput P-gp, značajno ograničava ili smanjuje njihov ulazak u CNS (Demeule i sar., 2002; Golden i Pollack, 2003).

P-gp, koji je ATP-vezujući transporter kodiran genom MDR1, predstavlja jedan od najznačajnijih transportera unutar KMB. On je sposoban da transportuje širok spektar supstrata, uključujući mnoge lekove namenjene CNS-u, što može drastično smanjiti njihovu penetraciju iz krvotoka u moždano tkivo (Schinkel i sar., 1996).

Transporter P-gp je otkriven kao izvozni transporter koji igra ključnu ulogu u rezistenciji na lekove u tumorskim ćelijama, izbacujući ih iz ćelija (Bradley i sar., 1988). P-gp je prisutan u različitim tkivima kao što su crevne epitelijalne ćelije, jetra, bubrezi i mozak. Transport leka u ili iz ćelija, kao i pasivna difuzija, zavise od aktivnosti ovih transportera, što ima značajnu ulogu u mnogim slučajevima transporta lekova i može uticati na tkivnu selektivnost lekova. Takođe, P-gp može smanjiti nivo leka u ćeliji i usporiti njegovu biotransformaciju, što može uticati na farmakokinetiku i terapijsku aktivnost lekova, uključujući i antikarcinogene lekove (Lin i sar., 2003).

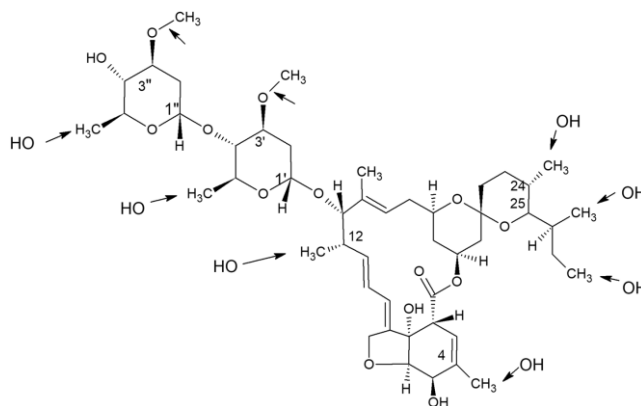
P-gp učestvuje u efluksu ivermektina pri niskim koncentracijama leka, sa sporim transportom. Pri višim, mikromolarnim koncentracijama koje saturišu MDR1 (P-gp), u transportu ivermektina preko fizioloških barijera učestvuju i MRP1, a u manjoj meri MRP2 i MRP3. Ivermektin pokazuje snažnu inhibiciju P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2) i BCRP1 (ABCG2), dok srednje do slabo inhibira transportnu aktivnost OATP1B1 (SLC21A6) i OATP1B3 (SLCOB3). Ovi podaci naglašavaju potencijalno nesigurne ili toksične efekte primene ivermektina u visokim dozama kod osoba sa oštećenom funkcijom P-gp transportera (Ménez i sar, 2012). U kliničkoj praksi, primena viših doza ivermektina može značajno uticati na farmakokinetiku istovremeno primenjenih lekova zbog interakcija među lekovima, što može dovesti do toksičnih efekata usled inhibicije P-gp i/ili MRP. Smatra se da transporter P-gp (MDR1) učestvuje u efluksu ivermektina pri niskoj koncentraciji leka i manjom brzinom transporta. Više, mikromolrne koncentracije ivermektina najverovatnije zasićuju P-gp i inhibišu njegovu aktivnost. Rendic (2021) je analizirao uloga transportera koji

pripadaju ABC transporter (eng. ATP-binding cassette) porodici i SLC transporter (eng. solute carrier) porodici u transportu ivermektina. ABC transporteri su membranski proteini koji se javljaju kod svih prokariota, biljaka, gljiva, kvasca i životinja. Kod ljudi, ABC transporteri imaju značajnu ulogu u transportu raznovrsnih jedinjenja, uključujući lekove i fiziološka jedinjenja, koristeći energiju ATP-a. Oni igraju ključnu ulogu u dispoziciji lekova i efektima/toksičnostima, utičući na apsorpciju, distribuciju i ekskreciju lekova (Liu, 2019). Slično tome, proteinski transporteri odgovorni za rezistenciju na veći broj lekova -Multidrug Resistance-associated Protein (MRP), uključujući MRP1, 2 i 3, igraju važnu ulogu u transportu različitih supstrata. Glavne uloge MRP transportera su izbacivanje ksenobiotika (lekova i komponenata hrane) i endogenih metabolita, kao i transport inflamatornih medijatora i odbrana od oksidativnog stresa. Pored toga, P-gp i MRP1 doprinose razvoju rezistencije na lekove kod različitih vrsta karcinoma i učestvuju u inflamatornim odgovorima (Cole i Deeley, 1998; Nakanishi i Tamai, 2015; Rendic i Guengerich, 2020).

Ivermektin se pokazao kao potentni inhibitor MDR1 (P-gp) i proteina MRP (Didier i Loor, 1996). Na primer, uočeno je da ivermektin povećava akumulaciju RH123 u LS180V ćelijama, što je pokazalo da je jedan od najefikasnijih inhibitora P-gp (Perloff i sar., 2003). Podaci iz literature klasifikuju ivermektin kao potentni inhibitor transporta posredovanog P-gp, sa IC_{50} vrednostima koje se kreću od 0,1 do 2,5 μ M. Takođe, podaci sugerišu da MRP1, a u manjoj meri MRP2 i MRP3, učestvuju u transportu ivermektina kroz fiziološke barijere. Ivermektin je takođe supstrat P-gp. Svojstva vezivanja MDR1 i MRP-a, kao i velika molekulska masa ivermektina, čine ga potencijalnim konkurentskim inhibitorom kada se primenjuje istovremeno sa drugim lekovima ili hemijskim supstancama koje su supstrati P-gp i MRP. Dodatno, ivermektin inhibira ATP-azu P-gp, MRP1, 2 i 3 nakon stimulacije njihovim aktivatorima. Rezultati istraživanja ukazuju da je distribucija ivermektina u plazmi i tkivima u velikoj meri pod uticajem aktivnosti P-gp (Alvinerie i sar., 2008; Kwei i sar., 1999).

2.8. Mikrozomalni enzimi jetre i biotransformacija ivermektina

Ivermektin se ekstenzivno metaboliše enzimima citohroma P-450 (P-450s, CYP) kako *in vivo*, tako i *in vitro*. *In vivo*, metaboliti ivermektina se pretežno izlučuju putem fecesa, dok se samo 1% doze izlučuje putem urina. Korišćenjem humanih jetrenih mikrozoma, humanih rekombinantnih enzima, hepatocita i uzoraka krvi, identifikovano je do 13 metabolita. Glavni metaboliti ivermektin- B_{1a} kod ljudi nastaju sledećim metaboličkim putevima: metil-hidroksilacija, O-demetilacija i oksidacija na različitim pozicijama molekula. Struktura glavnih pet metabolita ivermektina identifikovanih *in vitro* ukazuje da nastaju putem 3"-O-demetilacije, C4-hidroksilacije, C25 izobutil-hidroksilacije i formiranja 3"-O-demetil-4-hidroksimetil metabolita (Slika 4) (Rendic, 2021).



Slika 4. Metaboliti ivermektina nastali dejstvom enzima citohroma P450 (Rendic, 2021).

Glavni doprinos metabolizmu ivermektina *in vitro* pripisuje se enzimu P-450 3A4. Pored toga, 3"-O-demetil metabolit je u manjoj meri proizveden od strane enzima P-450 3A5 i smatra se minornim metabolitom. Drugi hidroksilovani metabolit nastaje putem enzima P-450 2C8. Od glavnih metabolita ivermektina formiranih *in vitro*, tri su identifikovana i u ljudskoj plazmi, i to putem 3"-O-demetilacije, C4-hidroksilacije, i kombinovanim reakcijama 3'-O-demetilacije i C4-hidroksilacije. Ove reakcije katalizuje *in vitro* enzim P-450 3A4, dok 3"-O-demetilaciju u manjoj meri katalizuje enzim P-450 3A5 (Tiphthara i sar., 2021). Podaci pokazuju da je ivermektin pretežno supstrat enzima P-450 3A4, te da istovremena primena lekova koji su snažni inhibitori ili induktori aktivnosti ovog enzima, kao i polimorfizmi enzima, mogu izazvati izražene interakcije između lekova. Snažni inhibitori aktivnosti enzima P-450 3A4 uključuju ketokonazol, ekonazol, troleandomicin, azamulin i ciklosporin, dok su snažni induktori aktivnosti P-450 3A4 karbamazepin, kortizol, hidrokortizon, rifampicin, amprenavir i klotrimazol (Rendic, 2002).

Vrednosti IC₅₀ za inhibiciju enzima P-450 2C9, 2D6 i 2C19 varirale su između 5,3 i 13,8 μM, ili nije zabeležena inhibicija. Ovi podaci ukazuju na određenu zavisnost od korišćenog eksperimentalnog modela, što sugeriše da je potencijal za interakcije između lekova usled inhibicije P-450 enzima malo verovatan i da će zavisiti od doze primenjenog leka. Budući da su koncentracije ivermektina u krvnoj plazmi kod ljudi retko više od 100 ng/ml (približno 0,1 μM) pri standardnoj oralnoj dozi, može se zaključiti da ivermektin, kada se primenjuje u klinički preporučenim dozama, nema potencijal da izazove interakcije između lekova na nivou inhibicije P-450 enzima (Rendic, 2021).

2.9 Inhibitori P-glikoproteinskih sistema i enzima citohrom P-450

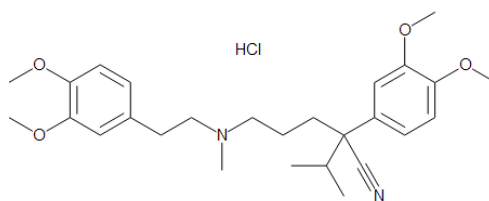
2.9.1 Verapamil

Verapamil spada u antiaritmijske lekove, blokatore kalcijumskih kanala. Verapamil blokira kalcijumske kanale u membrani i onemogućuje ulazak kalcijuma u ćeliju miokarda. Na taj način verapamil produžuje fazu refraktarnosti u A-V čvoru, dok na trajanje akcionog potencijala i brzinu sprovođenja nadražaja nema značajnijeg uticaja. Istim mehanizmom verapamil deluje negativno hronotropno i negativno inotropno čime smanjuje potrošnju kiseonika u miokardu. Od značaja je da verapamil širi koronarne krvne sudove dok je glavna indikacija za njegovu primenu supraventrikularna tahikardija („reentrant” tahikardija). Verapamil smanjuje frekvenciju rada komora u atrijalnoj fibrilaciji i flateru, a ove poremećaje može preobratiti u sinusni ritam (Varagić i Milošević, 2001). U veterinarskoj medicini verapamil se ne koristi često ali je indikovano za pse i mačke i to za lečenje za supraventrikularne tahikardije i atrijalno treperenje ili fibrilacije. Primenjuje se u oralnim dozama od 0.5-2 mg/kg na 8 do 12 sati (Plumb, 2008).

Putanja transporta verapamila putem P-gp obuhvata nekoliko ključnih faza i interakcija. Početak procesa označen je vezivanjem verapamila za specifično mesto na P-gp, koje se nalazi unutar proteina, a zatim se lek premešta ka ekstracelularnom prostoru (Aller i sar., 2009). Tokom transporta, dolazi do konformacione promene u strukturi P-gp, prelazeći iz unutrašnje u spoljašnju orijentaciju. Glavni faktori koji pokreću ovaj proces uključuju hidrofobne interakcije, koje olakšavaju kretanje verapamila kroz lipidni membranu, i elektrostatičke odbojnosti, koje utiču na dinamiku transporta (Aller i sar., 2009). Određeni aminoacidne rezidue, kao što su L65, P66, M69, F336, L339, I340, F343, S344, Q725, V982, F983 i M986, igraju ključnu ulogu u ovom procesu, omogućavajući specifične interakcije i odbojnosti koje su neophodne za efikasan transport verapamila. Ova putanja delimično podseća na putanju transporta doksorubicina, ali se razlikuje u vezi sa specifičnim reziduama i ulogom transmembranskih domena (TM) u procesu transporta (Wang i Sun, 2020).

Intravenozno primenjeni verapamil pokazuje brz metabolizam. Nakon intravenske infuzije kod ljudi, verapamil se eliminiše biekspontno, sa brzim početnim fazama distribucije (poluvreme oko 4 minuta) i sporijim terminalnim fazama eliminacije (poluvreme 2-5 sati). Kod zdravih muškaraca, oralno primenjeni verapamil prolazi kroz opsežan metabolizam u jetri, pri čemu je identifikovano 12 metabolita, većina u samo tragovima. Glavni metaboliti su identifikovani kao različiti N- i O-

dealkilirani proizvodi verapamila. Otprilike 70% primenjene doze izlučuje se u urinu, a 16% ili više u izmetu u roku od 5 dana. Oko 3% do 4% se izlučuje kao nepromenjen lek (FDA, 2016).



Slika 5. Hemijska formula Verapamil hidroklorida IUPAC: (2*RS*)-2-(3,4-Dimetoksifenil)-5-[[2-(3,4-dimetoksifenil)etil](metil)amino]-2-(1-metiletil)pentanonitril hidrohlorid (European Pharmacopoeia, 2014).

Istovremena primena verapamila značajno povećava oralnu bioraspoloživost i apsorpciju irinotekana, povećavajući ih 4,3 puta, što sugerise da je niska sistemska izloženost irinotekana nakon oralne primene delimično posledica njegovog visokog afiniteta ka P-gp efluks pumpi. Verapamil smanjuje izlučivanje irinotekana i njegovog metabolita SN-38 u žuči, što može omogućiti smanjenje doze irinotekana za 50-80% uz očuvanje slične efikasnosti, dok se rizik od gastrointestinalne toksičnosti smanjuje. Ovi nalazi otvaraju mogućnost za razvoj novih strategija doziranja irinotekana uz upotrebu P-gp inhibitora kako bi se poboljšala njegoova oralna bioraspoloživost i smanjila toksičnost (Bansal i sar., 2009).

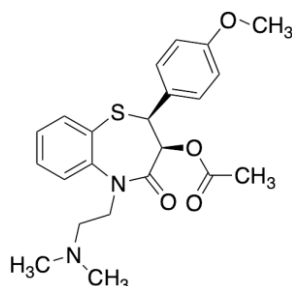
Razlike u farmakokinetičkim parametrima, kao što su srednje vreme zadržavanja (MRT) i površina ispod krive (AUC), između moksidektina i ivermektina, odražavaju dugotrajnu efikasnost moksidektina. Moksidektin pokazuje farmakokinetičke parametre koji su u skladu s ranijim istraživanjima, dok su vrednosti C_{max} , T_{max} , i $t_{1/2}$ eliminacije za ivermektin slične onima iz ranijih studija. P-gp je tkivno specifičan, s različitim nivoima ekspresije u različitim tkivima, uključujući jetru, gde učestvuje u transmembranskom transportu. Verapamil, kao inhibitor P-gp, može smanjiti izlučivanje ivermektina putem žuči, čime se povećava njegoova apsorpcija i bioraspoloživost. Ipak, verapamil nije značajno uticao na farmakokinetiku moksidektina, verovatno zbog brže distribucije moksidektina u masnom tkivu ili zbog njegoove slabije interakcije sa P-gp u poređenju s ivermektinom. Takođe, metaboličke interakcije putem enzima CYP3A4, koji je ključan za metabolizam ivermektina, mogu igrati manju ulogu u poremećaju farmakokinetike ivermektina uzrokovanom verapamilom, s obzirom na to da se većina ivermektina izlučuje nepromenjena. Zaključuje se da su značajne promene u farmakokinetici ivermektina primećene nakon njegoove ko-administracije s netoksičnom dozom verapamila kod ovaca (Molento i sar., 2004).

Kliničke studije su pokazale da verapamil inhibira metabolizam supstrata CYP3A, kao što su midazolam, ciklosporin A, simvastatin, buspiron i almotriptan, ali mehanizam tih interakcija nije bio potpuno jasan. Potvrđeno je da su enantiomeri verapamila, D617, i norverapamila slabi, reverzibilni inhibitori CYP3A, što ne bi trebalo da uzrokuje značajnu inhibiciju CYP3A *in vivo*. Međutim, pokazano je da su i R- i S-verapamil, kao i njihovi norverapamil ekvivalenti, efikasni, ireverzibilni inhibitori aktivnosti CYP3A4 i CYP3A u humanim jetrenim mikrozomima, formiranjem metaboličkog intermedijernog kompleksa. Ovaj model inhibicije na bazi mehanizma uspešno je predvideo obim interakcija lekova, potvrđujući da je inhibicija CYP3A od strane verapamila uzrok nelinearnog nakupljanja verapamila i njegovih metabolita tokom hroničnog doziranja (Wang i sar., 2004).

2.9.2. Diltiazem

Diltiazem je kalcijumski antagonist, antiaritmijski lek sa antihipertenzivnim svojstvima. Diltiazem značajno deprimiraju frekvenciju sinusne aktivnosti i usporavaju AV-sprovođenje, što je osnova za njihovu primenu u terapiji supraventrikularnih tahiaritmija. Diltiazem jače deluju na srce

nego na krvne sudove (Varagić i Milošević, 2001). U veterinarskoj medicini koristi se kod pasa i mačaka za lečenje supraventrikularne aritmije, hipertrofične kardiomiopatije, i hipertenzije primenjen intravenski ili peroralno. Peroralne doze diltiazema se kreću od 0,5 do 1,5 mg/kg tri puta dnevno do efekta (dnevna doza 1,5 do 4,5 mg/kg) (Papich, 2021; Plumb, 2008).



Slika 6. Hemijska formula Diltiazema IUPAC: (2S,3S)-5-[2-(dimetilamino)etil]-2-(4-metoksifenil)-4-okso-2,3,4,5-tetrahidro-1,5-benzotiazepin-3-il acetat (European Pharmacopoeia, 2014).

Diltiazem se karakteriše slabom apsorpcijom nakon oralne primene, pri čemu je njegova bioraspoloživost dozno-zavisna. Niska bioraspoloživost diltiazema tradicionalno se pripisuje metabolizmu u gastrointestinalnom traktu i jetri. Međutim, uloga P-glikoproteina (P-gp/MDR1) u smanjenju bioraspoloživosti diltiazema postaje sve značajnija. Osim što inhibira transport drugih lekova preko P-gp/MDR1, diltiazem je identifikovan i kao supstrat za ovaj transporter, što rezultira njegovim povratkom u lumen creva i dodatnim smanjenjem sistemske dostupnosti leka (Cataldi, 2015).

Diltiazem se pretežno biotransformiše kroz dva glavna metabolička puta: deacetilaciju i N-demetilaciju. Proces deacetilacije katalizuju esteraze, dok je za N-demetilaciju zadužena citohrom P-450 izoenzimska podfamilija CYP3A. Ove metaboličke reakcije dovode do stvaranja ključnih metabolita, uključujući desacetil-diltiazem (M1), N-demetil-diltiazem (MA) i desacetil-N-demetil-diltiazem (M2), koji su prisutni u značajnim koncentracijama u krvotoku. Neki od ovih metabolita, poput MA i M1, zadržavaju biološku aktivnost, delujući kao koronarni vazodilatatori sa različitim potencijama u poređenju sa diltiazemom. Pored ovih glavnih puteva, postoje i alternativni metabolički procesi, uključujući O-demetilaciju, N-oksidaciju i oksidativnu deaminaciju, koji dovode do stvaranja manjih metabolita, koji se zatim mogu dalje biotransformisati putem glukurono- ili sulfo-konjugacije. Iako je jetra glavno mesto metabolizma diltiazema, drugi organi, posebno pluća i tanko crevo, takođe doprinose ovom procesu. Konkretno, podfamilija CYP3A4, koja se nalazi unutar enterocita tankog creva, igra ključnu ulogu u N-demetilaciji diltiazema, dok su intestinalne esteraze uključene u njegovu deacetilaciju u jejunumu. Osim što je supstrat za CYP3A4, diltiazem deluje i kao potentan inhibitor ovog enzima, utičući na aktivnost CYP3A4 u jetri i crevima, što objašnjava nekoliko značajnih farmakokinetičkih interakcija povezanih sa ovim lekom. Ovaj inhibitoryni efekat proteže se i na metabolite diltiazema, pri čemu N-desmetil i N,N-didesmetil diltiazem pokazuju još veću potentnost u tom pogledu. Inhibicija CYP3A izazvana diltiazemom i njegovim metabolitima primarno se posreduje stvaranjem kompleksa između metabolita i feronsnog prostetičkog hema, što rezultira vremenski zavisnim gubitkom aktivnosti CYP3A. Osim toga, dok CYP3A4 pretežno upravlja N-demetilacijom diltiazema, CYP2D6 igra ključnu ulogu u O-demetilaciji i metabolizmu desacetil-diltiazema, ističući specifične enzimске puteve uključene u biotransformaciju diltiazema (Cataldi, 2015).

Približno 75% eliminacije diltiazema odvija se putem intestinalnog trakta, dok se preostalih 25% izlučuje putem bubrega. Intestinalna eliminacija uključuje hepatobilijarno oslobađanje metabolita leka, sekreciju posredovanu P-gp/MDR1 proteinom od strane enterocita, ili direktnu metaboličku obradu u crevima. Renalna eliminacija obuhvata fazu neto sekrecije. Kao i mnogi drugi blokatori kalcijumskih kanala, diltiazem funkcioniše kao inhibitor P-gp/MDR1 proteina, koji je

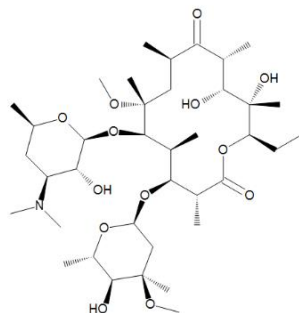
lokalizovan u luminalnim četkastim membranama proksimalnih bubrežnih tubula i igra ključnu ulogu u bubrežnom izlučivanju lekova kao što su digoksin i kinidin (Cataldi, 2015).

Ochs i Knfichel (1984) su istraživali farmakokinetiku intravenski aplikovanog diltiazema i uporedili apsorpciju iz dve oralne formulacije (oralna primena 120 mg u obliku rastvora i oralna primena 120 mg u obliku dve tablete sa produženim oslobađanjem od 60 mg). Diltiazem se široko distribuira u tkivima, sa prosečnim volumenom distribucije od 11,1 l/kg, zahvaljujući visokoj lipofilnosti i relativno niskom vezivanju za proteine plazme (oko 80%). Metabolički put uključuje uklanjanje acetilne grupe, što rezultira stvaranje metabolita sa minimalnom farmakološkom aktivnošću. Visok stepen ekstrakcije u prvom prolazu kroz jetru potvrđen je bioraspoloživošću od oko 44% nakon oralne primene u obliku rastvora. Iako je bioraspoloživost tableta nešto niža, nije uočena značajna razlika između obe oralne formulacije. Apsorpcija iz formulacije sa produženim oslobađanjem bila je sporija, što je u skladu sa očekivanjima. Oralna bioraspoloživost diltiazema je veća od verapamila i slična nifedipinu. Pacijentima koji prelaze sa intravenske na oralnu terapiju potrebno je povećanje doze od približno 50% zbog niže oralne bioraspoloživosti.

Enzimi iz porodice CYP3A odgovorni su za metabolizam približno 50% lekova koji prolaze kroz biotransformaciju, uključujući blokatore kalcijumskih kanala, makrolidne antibiotike, benzodiazepine, imunosupresive i antikonvulzive, te su najzastupljeniji u jetri i enterocitima tankog creva, gde značajno utiču na nisku bioraspoloživost mnogih supstrata. Tradicionalno se smatra da inhibitori smanjuju katalitičku aktivnost CYP3A reverzibilno i kompetitivno, ali je prepoznat značaj ireverzibilne inhibicije, koja može produžiti inhibitorni efekat i dovesti do nelinearne dispozicije inhibitora. Diltiazem, koji formira metabolički inertni kompleks (MIC) sa CYP4A *in vitro*, pokazuje povećano poluvreme eliminacije pri produženoj primeni, a studije su pokazale da formira MIC sa hepatičkim CYP3A kod ljudi, ali ne i u crevima. Administracija diltiazema u dozi od 120 mg dva puta dnevno tokom 7 dana dovodi do ireverzibilne inhibicije intestinalne CYP3A aktivnosti, bez promene u ekspresiji CYP3A4 proteina ili mRNA u crevima kod zdravih odraslih osoba, što ga razlikuje od drugih CYP3A inhibitora, poput eritromicina i troleandomicina, koji povećavaju koncentraciju CYP3A proteina (Pinto i sar., 2005).

2.9.3. Klaritromicin

Makrolidni antibiotici klaritromicin i azitromicin su poznati inhibitori P-gp (Munić i sar., 2010). Kod malih životinja, klaritromicin se koristi za indikacije kao što su infekcije kože i respiratornih organa ali upotreba kod malih životinja nije uobičajena. Kod ždrebadi, klaritromicin ima se koristi za lečenje infekcija izazvanih *Rhodococcus equi* (u kombinaciji sa rifampinom). Aktivniji je od drugih makrolida protiv *R. ekui* i ispoljava bolji klinički uspeh od azitromicina. Kod pasa i mačaka koristi se peroralno u dozama 2,5 do 10 mg/kg dva puta dnevno (Plumb, 2008).



Slika 7. Hemijska formula Klaritromicina IUPAC: (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-4-[(2,6-Dideoksi-3-C-metil-3-O-metil- α -L-ribo-heksopiranozil)oksi]-14-etil-12,13-dihidroksi-7-metoksi-3,5,7,9,11,13-heksametil-6-[[3,4,6-trideoksi-3-(dimetilamino)- β -D-ksilo-heksopiranozil]oksi] oksaciklotetradekan-2,10-dion (6-O-metil eritromicin A) (European Pharmacopoeia, 2014).

U humanoj medicini klaritromicin je antimikrobni lek koji se koristi za lečenje blage do umerene infekcije uzrokovane specifičnim, osetljivim bakterijama. Indikovana je za akutna bakterijska pogoršanja hroničnog bronhitisa kod odraslih, akutni maksilarni sinusitis, pneumoniju stečenu u zajednici, faringitis i tonzilitis, nekomplikovane infekcije kože i mekih tkiva, akutni otitis media kod dece, lečenje i profilaksu diseminiranih mikobakterijskih infekcija, kao i za infekciju *Helicobacter pylori* i duodenalni ulkus kod odraslih (Clarithromycin prescribing information, 2024).

Kohortna studija koju su Mordi i saradnici (2020) sprovedeli u dva dela, sa kombinovanim epidemiološkim i farmakogenomskim pristupom, istražila je povezanost upotrebe makrolidnog antibiotika klaritromicina sa kardiovaskularnim rizikom. Studija je pokazala da je upotreba klaritromicina povezana sa povećanim kardiovaskularnim rizikom u poređenju sa amoksicilinom, s tim da je rizik dodatno povećan kod pacijenata koji koriste inhibitore P-gp. Ovaj nalaz je potvrđen primenom ponderisanja pomoću skora sklonosti i u analizi genomske kohorte. Takođe, genomska studija je pokazala da je povezanost klaritromicina sa hospitalizacijom zbog kardiovaskularnih problema između 30 dana i jedne godine značajno povećana kod osoba sa genetski nižim nivoima aktivnosti P-gp. Ovi rezultati sugerišu da povezanost klaritromicina sa kardiovaskularnim rizikom može biti delimično modifikovana putem P-gp, što ukazuje na potrebu za oprezom pri propisivanju klaritromicina osobama koje koriste inhibitore P-gp.

Razumevanje CYP izoenzimskog sistema je značajno napredovalo, omogućavajući identifikaciju specifičnih metaboličkih puteva lekova i predviđanje potencijalnih lekovitih interakcija. Klaritromicin, makrolidni antibiotik, primarno se metabolizuje putem CYP3A izoenzima, koji imaju široku specifičnost za supstrate i mogu biti inhibirani ili indukovani različitim terapijskim agensima. *In vitro* studije su pokazale da jaki inhibitori CYP3A, kao što su ketokonazol i ritonavir, mogu uticati na metabolizam klaritromicina. Takođe, studije na jetrenim mikrozomima pacova su otkrile da klaritromicin i njegovi metaboliti indukuju CYP3A1 i formiraju specifične metabolite sa CYP. Ove informacije sugerišu da klaritromicin može izazvati lekovite interakcije povezane sa CYP3A, iako u manjoj meri u poređenju sa starijim makrolidima poput eritromicina i troleandomicina. Nedavne studije su pokazale da klaritromicin može značajno povećati AUC i koncentracije lekova koji se metabolizuju putem CYP3A, kao što su astemizol, cisaprid, pimoqid i terfenadin, što može zahtevati prilagođavanje doza ili praćenje nivoa ovih lekova. Povećane koncentracije lekova sa uskim terapijskim indeksom, kao što su karbamazepin, ciklosporin, digoksin i teofilin, takođe su zabeležene, ali u manjem stepenu u poređenju sa eritromicinom. Klaritromicin može povećati koncentracije omeprazola i ranitidina bismut citrata, što može biti korisno u lečenju *Helicobacter pylori* infekcija. Ritonavir, kao jak inhibitor CYP3A, značajno povećava koncentracije klaritromicina, ali inhibira formiranje 14-hidroksiklaritromicina, što zahteva pažnju pri istovremenoj primeni ovih lekova (Rodvold, 1999).

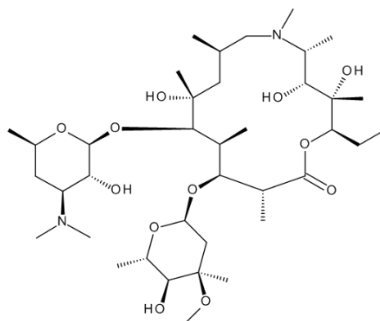
Primena 500 mg klaritromicina tokom sedam dana dovela je do značajne ($p < 0,001$) redukcije intestinalne CYP3A aktivnosti, sa 74% smanjenjem brzine formiranja 1-hidroksimidazolama u odnosu na početne vrednosti. Ovo smanjenje ukazuje na smanjenje intrinzične pročišćenosti CYP3A u crevnom zidu. Povećana bioraspoloživost midazolama u crevima nakon tretmana klaritromicinom može se predvideti primenom odgovarajuće jednačine, pri pretpostavci da se brzina apsorpcije ne menja. Istraživanje pokazuje da klaritromicin inhibira intestinalni CYP3A sporim formiranjem reverzibilnog MI kompleksa, dok kompetitivna inhibicija nije verovatna zbog niskih koncentracija klaritromicina i njegovih metabolita u crevnom homogenatu. Takođe, klaritromicin ne menja značajno ekspresiju intestinalnog CYP3A proteina niti brzinu transkripcije CYP3A4/CYP3A5 mRNA. Kod osoba sa CYP3A5*1 alelom, primećeno je značajno veće smanjenje intestinalne CYP3A aktivnosti nakon primene klaritromicina u odnosu na osobe koje ne ekspresuju CYP3A5, što sugeriše da su pojedinci sa višim početnim nivoima aktivnosti CYP3A, kao što su CYP3A5 ekspreseri, podložniji ozbiljnijim interakcijama sa lekovima (Pinto i sar., 2005).

Niemi i saradnici (2001) u sprovedenoj studiji su pokazali da čak i niske doze klaritromicina, inhibitora CYP3A4, mogu značajno povećati koncentracije repaglinida u plazmi i njegove efekte. Klaritromicin je povećao srednje vrednosti C_{max} i AUC(0-∞) repaglinida za 1,7 i 1,4 puta u odnosu na kontrolu. Takođe, povećao je srednji inkrementalni AUC(0-3) serumskog insulina i maksimalno

povećanje koncentracije insulina za 51% i 61%. Interindividualna varijacija u stepenu interakcije bila je mala, osim u slučaju C_{max} repaglinida, gde je relativno povećanje variralo od 10% do 270%. Nisu zabeležene značajne razlike u varijablama glukoze u krvi između faza, što može biti posledica niskog stepena farmakokinetičke interakcije i ponovljenog unosa hrane tokom studije. Klaritromicin je značajno povećao C_{max} repaglinida, ali samo blago produžio $t_{1/2}$, što sugeriše da inhibira biotransformaciju repaglinida prvenstveno tokom prvog prolaza. Efekat klaritromicina na CYP3A4 je doza-zavistan; veće doze imaju značajniji uticaj na plazma koncentracije repaglinida. Povećani rizik od hipoglikemije može biti prisutan kod pacijenata sa višom aktivnošću CYP3A4. U zaključku, klaritromicin povećava koncentracije i efekte repaglinida, što može povećati rizik od hipoglikemije pri istovremenoj primeni sa drugim CYP3A4 inhibitorima.

2.9.4. Azitromicin

Azitromicin je makrolidni antibiotik, relativno širokog antimikrobnog spektra i povoljnog farmakokinetičkog profila, koristan za razne infekcije kod različitih životinjskih vrsta. Kod pasa se najčešće primenjuje u p.o. dozi od 5 mg/kg/dnevno ili svaki drugi dan (Papich, 2021).



Slika 8. Hemijska formula Azitromicina IUPAC: (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-13-[(2,6-Dideoksi-3-C-metil-3-O-metil- α -L-ribo-heksopiranozil)oksi]-2-etil-3,4,10-trihidroksi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-11-[[3,4,6-trideoksi-3-(dimetilamino)- β -D-ksilo-heksopiranozil]oksi]-1-oksa-6-azaciklopentadekan-15-on (European Pharmacopoeia, 2014).

Azitromicin je makrolidni antibakterijski lek koji se u humanoj medicini koristi za lečenje blage do umerene infekcije uzrokovane osetljivim bakterijama. Indikacije za azitromicin uključuju akutne bakterijske pogoršanja hroničnog bronhitisa kod odraslih, akutni bakterijski sinusitis kod odraslih, jednostavne infekcije kože i kožnih struktura kod odraslih, uretritis i cervicitis kod odraslih, genitalne čireve kod muškaraca, akutni otitis media kod pedijatrijskih pacijenata (starijih od 6 meseci), zajednicu stečenu pneumoniju kod odraslih i pedijatrijskih pacijenata (starijih od 6 meseci), kao i faringitis/tonzilitis kod odraslih i pedijatrijskih pacijenata (starijih od 2 godine) (Azithromycin Tablets Prescribing Information, 2024).

Azitromicin pripada podklasi azalida i sadrži prsten sa 15 članova, sa metil-supstituisanim azotom umesto karbonilne grupe na poziciji 9a aglikonskog prstena, što sprečava metabolizam koji je karakterističan za druge makrolide (Fiese i Steffen, 1990). Studija Sugie i saradnika (2004) je pokazala da intravenozno primenjen azitromicin ima značajno smanjenu eliminaciju iz plazme kod pacova prethodno tretiranih ciklosporinom, dok eritromicin nije imao isti efekat. Rezultati sugerišu da P-gp igra ključnu ulogu u eliminaciji azitromicina kroz tkiva koja ekspimiraju ovaj protein. Eksperimenti bubrežnog i žučnog klirensa ukazali su na to da su jetra i bubrezi glavni putevi eliminacije, ali njihov doprinos ukupnoj eliminaciji je relativno mali, što implicira postojanje drugih nepoznatih puteva. Ciklosporin značajno smanjuje žučnu ekskreciju azitromicina, što ukazuje na veliku ulogu P-gp u ovom procesu. Probenecid, inhibitor MRP2, nije potpuno inhibirao žučnu ekskreciju, što sugeriše da azitromicin može biti delimično izlučen putem MRP2 transportera, iako je njegov doprinos manji u poređenju sa P-gp. Na osnovu ovih rezultata, zaključeno je da su P-gp i

MRP2 uključeni u eliminaciju azitromicina, pri čemu je P-gp glavni faktor. Ovi podaci mogu pružiti korisne informacije za dizajniranje režima lečenja kod pacijenata sa bakterijskim infekcijama.

Pokazano je da je azitromicin slab supstrat za CYP3A4, da ga ovaj enzim minimalno metaboliše, te da azitromicin ne indukuje niti inhibira aktivnost CYP3A4 (He i sar., 2009). Analiza podataka El-Tahtawy i saradnika (2008) iz studije interakcije ivermektina i azitromicina donosi značajne nalaze. Ovo je prvi objavljeni populacioni model farmakokinetike ivermektina, koji pokazuje efikasnost populacionog mešovito modelovanja u istraživanju interakcija lekova, naročito u prisustvu populacione heterogenosti. Identifikovan je mehanizam interakcije, koji uključuje povećanje bioraspoloživosti u jednoj subpopulaciji. Model je korišćen za simulaciju različitih kliničkih ispitivanja kako bi se odredile maksimalne koncentracije koje bi mogle biti primećene tokom istovremene primene i omogućile poređenje sa prethodno objavljenim podacima o bezbednosti i farmakokinetici. Model je pokazao da maksimalne koncentracije ivermektina tokom koadministracije sa azitromicinom neće prelaziti srednje vrednosti zabeležene u studijama visokih doza, koje su se pokazale kao bezbedne i dobro podnošljive. Ova analiza demonstrira korisnost populacionog modela za analizu interakcija lekova i pruža osnovu za predikciju izloženosti lekovima, što može pomoći u dizajnu bezbednih terapijskih režima. U ovoj studiji, istražena je interakcija pet makrolidnih antibiotika (azitromicin, eritromicin, klaritromicin, roksitromicin i telitromicin) sa ljudskim MDR1 (P-gp) kako bi se razumelo kako makrolidi utiču na funkciju MDR1 i kako MDR1 utiče na njihovu akumulaciju u ćelijama. Rezultati su pokazali da se procena interakcije makrolida sa MDR1 značajno razlikuje u zavisnosti od korišćene metode. Svi testirani makrolidi su, osim inhibicije izbacivanja rodamin-123 putem MDR1, pokazali karakterističnu aktivaciju ATPaze MDR1 u niskim koncentracijama i inhibiciju u višim koncentracijama, što ukazuje na konkurenciju za ista mesta vezivanja u MDR1. Merenje akumulacije makrolida u MES-SA i MESSA/Dx5 ćelijama sa i bez inhibicije MDR1 pokazalo je da visoka ekspresija MDR1 smanjuje intracelularne koncentracije makrolida, pri čemu je inhibicija MDR1 najviše uticala na azitromicin i eritromicin. Različiti rezultati akumulacije u prisustvu aktivnog MDR1 ukazuju na to da ekspresija MDR1 može značajno promeniti rangiranje makrolida prema njihovoj akumulaciji u ćelijama. Ovi nalazi ukazuju na važnost razumevanja interakcija između makrolida i MDR1 kako bi se objasnile razlike u njihovom farmakokinetičkom i farmakodinamskom ponašanju. Proučavanje ovih interakcija može doprineti boljem razumevanju farmakokinetičkih svojstava makrolida i njihovih efekata na druge lekove koji se transportuju putem MDR1 (Munić i sar., 2010).

3. CILJEVI I ZADACI

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje toksičnosti ivermektina primenjenog u dozama višim od antiparazitske terapijske doze, kao i utvrđivanje interakcija sa lekovima koji moduliraju P-glikoproteinske transportne sisteme i enzime citohroma P-450, u cilju razumevanja mehanizama koji doprinose povećanju toksičnosti kod sisara.

Zadaci koji će doprineti ostvarenju ciljeva:

1. Određivanje toksičnih efekata ivermektina primenjenog u rastućim dozama, višim od terapijskih, tokom dužeg vremenskog perioda, s posebnim fokusom na režim doziranja korišćen tokom pandemije SARS-CoV-2.
2. Analiziranje neurotoksičnih simptoma izazvanih ivermektinom kod pacova, korišćenjem specifičnih testova: refleks uspravljanja, test pritiska na rep i rota-rod test (rigting refleks, tail-pinch test, rota-rod test).
3. Određivanje koncentracija ivermektina u plazmi i mozgu pacova nakon primene različitih doza i analiza odnosa njegovih koncentracija između plazme i mozga.
4. Praćenje hematoloških i biohemijskih parametara pacova tretiranih ivermektinom i njihova komparacija sa rezultatima makroskopskog i patohistološkog pregleda unutrašnjih organa.
5. Ispitivanje interakcija ivermektina sa lekovima koji inhibiraju P-gp (azitromicin, klaritromicin) i enzime citohroma P-450 (verapamil, diltiazem), sa analizom njihovog uticaja na ispoljenu toksičnost.
6. Određivanje koncentracija ivermektina i inhibitora P-gp i enzima citohroma P-450 u plazmi i mozgu pacova kako bi se ispitali efekti kombinovane primene lekova na toksičnost ivermektina.

Ovi zadaci će omogućiti detaljno ispitivanje mehanizama toksičnosti ivermektina u višim dozama od terapijskih i interakcije sa lekovima koji toksična dejstva ivermektina mogu da potenciraju delujući na njegov metabolizam (modulatori enzima citohroma P-450) ili resorpciju i distribuciju (modulatori P-gp).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Smeštaj pacova i dizajn studije

U ovom ispitivanju korišćeno je ukupno 90 odraslih mužjaka pacova Wistar soja, telesne mase od 145 do 193 g, starosti 7 do 8 meseci, nabavljenih sa uzgojne farme Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Srbija. Ispitivanje je sprovedeno na mužjacima zbog dokaza iz literature koji sugerišu potencijalne toksične efekte ivermektina na funkciju testisa, dok su prema podacima Oregonkog centra za trovanja, tokom pandemije COVID-19 toksični efekti ivermektina češće zabeleženi kod muških pacijenata (Collins i sar., 2022; Temple i sar., 2021).

Nakon transporta, pacovi su prošli period aklimatizacije u trajanju od 10 dana, tokom kojih su bili smešteni u standardizovane uslove držanja. Svaka grupa od po šest pacova bila je smeštena u posebne kaveze sa prostirkom od autoklaviranih drvenih strugotina, pri kontrolisanoj temperaturi od $21 \pm 1^\circ\text{C}$, relativnoj vlažnosti od 55-60%, i u uslovima ciklusa svetlo-tama od 12/12 sati. Pacovi su imali neograničen pristup hrani i vodi (*ad libitum*). Prostirka i flašice za vodu menjani su svakodnevno u aseptičnim uslovima, dok su kavezi i prateća oprema bili mehanički oprani i autoklavirani pre svakog unošenja u prostoriju. Ispitivanja je sprovedeno u tri faze:

1. Faza: Ispitivanja toksičnih efekata ivermektina posle oralne primene doza: 0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg, tokom pet dana.
2. Faza: Ispitivanje dejstva inhibitora P-gp: azitromicina, klaritromicina i inhibitora enzima citohroma P-450: verapamila i diltiazema na parametre praćene u prvoj fazi ispitivanja.
3. Faza: Ispitivanje interakcija ivermektina sa lekovima koji inhibiraju P-gp (azitromicin, klaritromicin) i enzime citohroma P-450 (verapamil, diltiazem), sa analizom njihovog uticaja na potencijalnu toksičnost ivermektina.

4.2. Prva faza ispitivanja

Životinje su metodom slučajnog izbora raspoređene u pet eksperimentalnih grupa, sa po šest pacova u svakoj grupi. Grupe su tretirane rastućim oralnim dozama ivermektina (0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg), dok je kontrolna grupa dobijala peroralno istu zapreminu rastvarača propilenglikola. Ova grupa je služila kao kontrola i za ostale faze ispitivanja.

Pacovi su tretirani svakodnevno, pet dana uvek u isto vreme, u 10 časova prepodne. Prethodno im je merena telesna masa. Ivermektin je rastvaran u propilenglikolu, a aplikacija je sprovedena peroralno krutom želučanom sondom, u zapremini od 0,1 ml/100g telesne mase pacova. U istom volumenu i na isti način aplikovan je i sam propilenglikol kontrolnoj grupi pacova.

Nakon petodnevno tretmana, 24 sata posle poslednje primene ivermektina, pacovi su anestetizirani intravenskom aplikacijom tiopenton natrijuma, aplikovanim intravenskom kanilom (OptivaTM 2, Johnson & Johnson, Arlington, TX, SAD) u lateralnu repnu venu u dozi od 35 mg/kg, nakon čega je izvršeno uzorkovanje krvi.

4.2.1. Procena koordinacije i ravnoteže prve faze ispitivanja

Rota rod test korišćen je za ispitivanje potencijalnih efekata ivermektina na CNS. Ovaj test meri sposobnost pacova da održe ravnotežu na rotirajućoj osovini. Testiranje je sprovedeno primenom rota rod aparata sa softverskom kontrolom rotacije i registrovanjem broja padova (EIUnit, Srbija). Pre početka prve faze ispitivanja, životinje su bile trenirane tokom 5 dana da se održe na rotirajućoj osovini koja se okreće konstantnom brzinom od 15 obrtaja u minuti (rpm) tokom 5 minuta. Za prvu fazu studije je odabrano 30 pacova (n=30) koji su uspeli da održavaju ravnotežu na rota rod aparatu 5 minuta bez pada.

Efekat rastućih doza ivermektina na integritet motorne koordinacije procenjivan je na osnovu sposobnosti pacova da ostanu na rotirajućoj osovini 5 minuta bez pada. Testiranje je vršeno svakodnevno, 30 minuta nakon primene ivermektina ili rastvarača (kontrolna grupa). Takođe, ispitivanje refleksa uspravljanja (righting reflex-RR) i test pritiska na rep (tail pinch test) sprovedeni su svakodnevno, pre rota rod testa radi procene mogućih klinički vidljivih opštih depresivnih efekata ivermektina na CNS pacova.

Rota-rod test se smatra prvenstveno prediktivnim testom za procenu anksiolitičkog, sedativnog i ataksijskog uticaja različitih lekova na CNS. Dunham i Miya (1957) su predložili da se relaksacija skeletnih mišića izazvana ispitivanjem jedinjenjem može proceniti testiranjem sposobnosti miševa ili pacova da ostanu na rotirajućoj osovini. Rota-rod test se uglavnom koristi za procenu neuroloških deficita kod glodara (Trailovic i sar., 2011)

RR je standardni test za procenu buđenja/oporavka kod glodara što ukazuje na svest u okruženju. RR se procenjuje postavljanjem glodara na leđa i merenjem vremena koje je potrebno životinji da se ispravi, odnosno postavi na noge. Zaključci zasnovani na RR testu odražavaju ideju da je budnost u korelaciji sa pojedinačnim događajima uključujući spontano kretanje ili motorne odgovore. Kada je pozitivan, RR predstavlja potvrdu očuvane svesti pacova (Dickinson i sar., 2000; Suckow i sar., 2006).

Pean iglodržać dužine 18 cm korišćen je za blago pritiskanje osnove repa pacova u testu pritiska na rep. Pozitivna reakcija bila je pokušaj životinje da se kreće unapred (beg) posle pritiska (Trailović i sar., 2011).

Na kraju prve faze ispitivanja, svim pacovima je uzeta krv za hematološke i biohemijske analize, kao i za određivanje koncentracije ivermektina u plazmi. Uzorci krvi su uzeti kardijalnom punkcijom. Pacovi anestetizirani tiopenton natrijumom su žrtvovani dekapitacijom, nakon čega je izvršena obdukcija i makroskopski pregled unutrašnjih organa. Uzeti su i uzorci tkiva za patohistološku analizu, kao i tkivo mozga za određivanje koncentracije ivermektina.

4.3. Druga faza ispitivanja

U drugoj fazi, četiri grupe mužjaka pacova (n=6) tretirane su peroralno terapijskim dozama sledećih lekova: azitromicin (3,6 mg/kg telesne mase), klaritromicin (7 mg/kg telesne mase) (inhibitori P-gp) (Plumb, 2008) kao i verapamil (1 mg/kg telesne mase) i diltiazem (2,5 mg/kg telesne mase) (inhibitori enzima citohrom P-450) (Papich, 2021). Svi lekovi su primenjivani u preporučenim režimima doziranja, tokom 10 dana. Administracija lekova vršena je želudačnom sondom, a pacovi su držani u istim uslovima kao i u prvoj fazi i svakodnevno mereni.

Nakon desetodnevno tretmana, 24 sata posle poslednje primene azitomicina, klaritromicina, verapamila i diltiazema, pacovi su anestetizirani intravenskom aplikacijom tiopenton natrijuma u dozi od 35 mg/kg u lateralnu repnu venu, nakon čega je izvršeno uzorkovanje krvi.

Pacovi su svakodnevno mereni, a rota-rod test, ispitivanje refleksa uspravljanja (righting reflex) i test pritiska na rep (tail pinch test) sprovedeni su takođe svakodnevno radi procene mogućih klinički vidljivih opštih depresivnih efekata na CNS pacova. Na kraju ispitivanja, svim pacovima je uzeta krv za hematološke i biohemijske analize, kao i za određivanje koncentracije azitromicina, klaritromicina, verapamila, diltiazema u plazmi. Pacovi su anestetizirani tiopentonom i žrtvovani dekapitacijom, nakon čega je izvršena obdukcija i makroskopski pregled unutrašnjih organa. Uzeti su uzorci tkiva za patohistološku analizu, kao i tkivo mozga za određivanje koncentracije azitromicina, klaritromicina, verapamila, diltiazema.

4.3.1. Procena koordinacije i ravnoteže druge faze ispitivanja

Rota-rod test, refleks uspravljanja i test pritiska na rep sprovedeni su svakodnevno radi procene opštih depresivnih efekata lekova na CNS pacova, na isti način kako je opisano u prvoj fazi.

4.4. Treća faza ispitivanja

U trećoj fazi četiri grupe pacova (n=6) tretirane su azitromicinom (3,6 mg/kg telesne mase), klaritromicinom (7 mg/kg telesne mase), verapamilom (1 mg/kg telesne mase), diltiazemom (2,5 mg/kg telesne mase) u terapijskom režimu doziranja tokom 5 dana. Lekovi su primenjeni u terapijskim dozama i prema preporučenom režimu doziranja (Papich, 2021; Plumb, 2008), kao i u prethodnoj fazi, nakon čega su tokom narednih pet dana davani zajedno sa ivermektinom u dozi od 1,2 mg/kg koja nije ispoljila klinički vidljive znakove toksičnosti u prvoj fazi. Lekovi su aplikovani peroralno želudačnom sondom, a pacovi su držani pod istim uslovima kao i u prethodnim fazama i svakodnevno mereni. Svakodnevno su sprovedeni rota rod test, refleks uspravljanja i test pritiska na rep, radi ispitivanja mogućih depresivnih efekata kombinacija lekova na CNS pacova. Na kraju ispitivanja, uzeta je krv za hematološke i biohemijske analize, kao i za određivanje koncentracija ivermektina, azitromicina, klaritromicina, verapamila i diltiazema u plazmi. Nakon žrtvovanja pacova, izvršena je obdukcija i makroskopski pregled organa, a uzeti su uzorci tkiva za histopatološku analizu i određivanje koncentracije ivermektina, azitromicina, klaritromicina, verapamila i diltiazema u tkivu mozga.

4.4.1. Procena koordinacije i ravnoteže treće faza ispitivanja

Rota-rod test, refleks uspravljanja i test pritiska na rep sprovedeni su svakodnevno radi procene opštih depresivnih efekata lekova na CNS pacova, na isti način kako je opisano u prvoj i drugoj fazi.

4.5. Dozvola za istraživanja

Svi eksperimentalni protokoli i postupci korišćeni u istraživanju odobreni su od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije – Uprava za veterinu (dozvola br. 323-07-11564/2022-05/4), u skladu sa Zakonom o zaštiti dobrobiti životinja Republike Srbije i Direktivom 2010/63/EU.

4.6. Hematološke i biohemijske analize

Uzorci krvi su uzeti 24 sata nakon poslednje primene ivermektina ili lekova. Krv je uzeta punkcijom iz srca, nakon čega su pacovi eutanazirani dekapitacijom. Krv je sakupljena u epruvete sa antikoagulantom etilendiamin tetrasirćetnom kiselinom (EDTA) (BD Microtainer® K 2 EDTA, Becton, Dickinson and Company, SAD) i epruvete za serum (BD Vacutainer® Serum Tubes, Becton, Dickinson and Company, SAD). Iz uzoraka krvi sa antikoagulantom parametri krvne slike određivani su odmah nakon uzimanja na veterinarskom hematološkom analizatoru sa 5-part diferencijalom (BC-500 Vet, Mindray, Kina). Nakon odvajanja seruma, merene su koncentracije ukupnih proteina (TP), uree, kreatinina i triglicerida (TG). Takođe, određivana je aktivnost enzima alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), alkalne fosfataze (ALP) i γ glutamil transferaze (γ -GT) na automatskom biohemijskom analizatoru (BC-240, Mindray, Kina). Sve analize su sprovedene odmah nakon uzimanja uzoraka.

Koncentracija citohroma P-450 određivana je u serumu pacova, jer se ivermektin metaboliše *in vivo* i *in vitro* putem citohroma P-450 kroz reakcije C-hidroksilacije i O-demetilacije. Kako se najveći deo metabolizma ivermektina odvija preko citohroma P450 izoforme 3A4, njegova koncentracija je određena metodom imunoenzijske analize (ELISA) korišćenjem dvostruke sendvič ELISA metode prema uputstvu proizvođača (MyBioSource, San Diego, Kalifornija, SAD). Uzorci seruma za određivanje koncentracije citohroma P-450 zamrznuti su na -20°C odmah nakon uzimanja i odloženi do analize.

4.7. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) za određivanje ivermektina u serumu i tkivu mozga pacova

Koncentracija ivermektina određivana je prema metodi Whelan i sar., 2010 sa sledećim modifikacijama. Za hromatografsku separaciju korišćena je Kinetex® kolona (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD) dimenzija 100×2,1 mm, 2 µm, povezana sa Shimadzu 8040 LC-MS/MS sistemom (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), kako je opisano od strane Simunovic i sar., 2019. Ekstrakcija je izvedena pomoću 20 mL mešavine acetonitrila i acetona (5:1), centrifugacijom, filtracijom i kasnijom evaporacijom pod azotom na 50°C. Rekonstitucija je obavljena u 1 mL acetonitrila, nakon čega je ekstrakt prenet u HPLC bočicu. Validacija metode sprovedena je prema evropskoj regulativi (2002/657/EC, 2002). Granice kvantifikacije za uzorke mozga i plazme iznosile su 1 µg/kg i 0,5 µg/kg, respektivno. Za potrebe kvantifikacije, kalibracioni standardi su pripremljeni spajkovanjem praznih uzoraka radnim rastvorom ivermektina.

4.8. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) za određivanje azitromicina, klaritromicina, verapamila i diltiazema u serumu i tkivu mozga pacova.

Koncentracija ivermektina, klaritromicina, azitromicina, diltiazema i verapamila određivana je prema metodi Whelan i saradnika (2010) sa sledećim modifikacijama:

Ekstrakcija uzoraka izvršena je korišćenjem mešavine acetonitrila (for HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) i acetona (for liquid chromatography, Merck, Nemačka) u odnosu 5:1. Homogenizacija uzoraka obavljena je na uređaju Ultra-Turrax T-25 (Ika-Werke GmbH, Nemačka). Kivete su zatim podvrgnute centrifugiranju na uređaju SIGMA 2-16P (Sigma laborzentrifugen, Nemačka) pri brzini od 4000 obrtaja/min tokom 5 minuta. Nakon centrifugiranja, sadržaj je filtriran kroz najlonske filtere sa porama veličine 0,22 µm (Amtast, Florida, SAD). Preostali sadržaj je isparavan do suva u struji azota na 50 °C, a suvi ostatak je rekonstituisan u 1 ml acetonitrila i prenet u staklenu vijalu.

Tabela 1. Odnosi masa i naelektrisanja (m/z) za roditeljske i produkt jone klaritromicina, verapamila, azitromicina, diltiazema i ivermektina.

Naziv jedinjenja	Prekursor jon (m/z)	Produkt jon (m/z)
Klaritromicin	748,50	590,10
		157,90
Verapamil	455,30	165,20
		177,93
Azitromicin	749,50	158,00
		591,40
Diltiazem	415,40	178,20
		177,90
Ivermektin	892,20	307,10
		569,20

Instrumentalno određivanje ivermektina, klaritromicina, azitromicina, diltiazema i verapamila u uzorcima mozga i seruma izvedeno je upotrebom tečne hromatografije visokih performansi sa masenom detekcijom (HPLC-MS/MS). HPLC-MS/MS sistem obuhvatao je dve pumpe visokog pritiska LC-30AD UPLC, degasera DGU-20A, autosemplera SIL-30AC, pećnicu za hromatografsku kolonu CTO-20AC i kontrolor sistema CBM-20A, povezane sa masenim detektorom LCMS 8040 (Shimadzu, Japan), kao što je opisano u radu Simunović i saradnika (2019).

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je reverzno fazna kolona Kinetex 100 x 2,1 mm, prečnik čestica 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD). Mobilna faza A sastojala se od 0,1% mravlje kiseline (Merck, Darmstadt, Nemačka) u vodi (HPLC plus, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), dok je mobilna faza B sadržala 1% mravlje kiseline u acetonitrilu.

Kalibracija je izvršena korišćenjem radnih rastvora pripremljenih od sledećih referentnih standarda: Klaritromicin, 100 mg (Dr. Ehrenstorfer, Nemačka), Verapamil, 100 mg (Dr. Ehrenstorfer, Nemačka), Azitromicin, 25 mg (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), Diltiazem, 1 g (LGC, Tedington, Velika Britanija), Ivermektin, 100 mg (Dr. Ehrenstorfer, Nemačka). Odnosi masa i naelektrisanja (m/z) za roditeljske i produkt jone prikazani su u tabeli 1.

Gradijent koncentracija mobilnih faza tokom hromatografskog razdvajanja klaritromicina, verapamila, azitromicina, diltiazema i ivermektina dat je u tabeli 2.

Tabela 2. Gradijent mobilnih faza tokom hromatografskog razdvajanja analita.

Vreme	Protok	Udeo mobilne faze A	Udeo mobilne faze B
0,00	0,35	0,5	0,5
0,01	0,35	0,5	0,5
3,00	0,35	0	1
3,01	0,35	0,5	0,5
6,00	0,35	0,5	0,5

Kvantifikacija je izvršena korišćenjem softvera LabSolutions (Shimadzu, Kjoto, Japan), kroz konstrukciju kalibracione krive zasnovane na pet kalibracionih tačaka različitih koncentracija. Kalibracioni uzorci su pripremljeni na identičan način kao i uzorci koji su ispitivani, uz dodatak odgovarajućih koncentracija standardnih rastvora. Validacija metode sprovedena je u skladu sa evropskom regulativom (2002/657/EC, 2002).

Parametri (tačnost, preciznost, linearnost i granica kvantifikacije (LOQ) tečne hromatografije sa masenom detekcijom (HPLC-MS/MS) za serum i tkivo mozga pacova prikazani su u tabeli 3 i 4.

Tabela 3. Parametri HPLC-MS/MS za serum pacova.

Parametar	Linearnost	Tačnost	Preciznost	Limit kvantifikacije
Kriterijumi	R² > 0,98	Prinos 70%-120%	CV < 30%	$\mu\text{g/kg}$
Klaritromicin	0,998	95,2%	8,1%	0,5
Verapamil	0,998	93,3%	8,3%	0,03
Azitromicin	0,997	96,5%	9,4%	1
Diltiazem	0,997	94,9%	8,5%	0,01
Ivermektin	0,997	98,2%	9,0%	1

Tabela 4. Parametri HPLC-MS/MS za tkivo mozga pacova.

Parametar	Linearnost	Tačnost	Preciznost	Limit kvantifikacije
Kriterijumi	R² > 0,98	Prinos 70%-120%	CV < 30%	$\mu\text{g/kg}$
Klaritromicin	0,993	94,2%	8,2%	1
Verapamil	0,998	90,6%	9,1%	0,3
Azitromicin	0,996	95,5%	9,0%	1
Diltiazem	0,996	92,6%	8,6%	0,2
Ivermektin	0,997	96,2%	9,8%	1

4.9. Ispitivanje nivoa oksidativnog stresa

Nivo oksidativnog stresa je ispitan merenjem koncentracije malondialdehida (MDA), glutationa (GSH), ukupnog oksidativnog statusa (TOS), ukupnog antioksidativnog statusa (TAS) i indeksa oksidativnog stresa (OSI). Za određivanje koncentracija MDA i GSH, korišćeni su eritrociti dobijeni centrifugiranjem krvi uz upotrebu EDTA kao koagulansa. Nakon izdvajanja plazme, krvni elementi su isprani fiziološkim rastvorom i hemolizirani hladnom vodom. Serum pacova je upotrebljen za analizu TOS i TAS.

Nivo MDA, markera lipidne peroksidacije, meren je prema metodi Draper i Hadley, (1990). Koncentracija GSH određena je primenom DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina) prema modifikovanoj Elmanovoj metodi (Ellman, 1959), kako su je prilagodili Jollow i sar. (1974). Sadržaj TOS u serumu meren je metodom prema Erel-u (2005), dok je TAS u serumu određen metodom po Erel-u (2004), koristeći ABTS+ (2,2-azobis(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat) kao hromogen. Indeks oksidativnog stresa izračunat je kao odnos koncentracija TOS i TAS.

Svi parametri oksidativnog stresa su mereni spektrofotometrijski. Koncentracije GSH, TOS i TAC određene su korišćenjem ELISA čitača (BioTek Instruments, Winooski, USA), dok su MDA koncentracije merene na Cecil-u 2021 UV/VIS (Select Science, Bath, UK).

4.10. Makroskopski i histopatološki pregled tkiva pacova

Nakon uzimanja krvi, pacovi su žrtvovani dekapitacijom koristeći giljotinu za glodare (Harvard Apparatus, SAD). Sproveden je makroskopski pregled unutrašnjih organa, a uzorci jetre, bubrega, testisa i mozga uzorkovani su za histopatološku analizu. Tkivni uzorci su fiksirani su u neutralnom puferizovanom 10% formalinu tokom 72 sata, uz odnos fiksativa i tkiva od najmanje 10:1. Nakon fiksacije, uzorci su obrađeni u automatskom tkivnom procesoru KD-TS3D (Kedee, Kina), kroz serije dehidratacije u alkoholu, prosvetljavanja u ksilolu i impregnacije parafinom, nakon čega su uzorci tkiva ukalupljeni u parafinske blokove. Parafinski kalupi su sečeni na mikrotomu Leica RM 2235 (Leica Biosystems, SAD) na isečke debljine 3-5 μm , postavljeni na predmetna stakla i sušeni na 56°C tokom 24 sata. Tkivni isečci su deparafinirani u ksilolu, dehidrirani kroz seriju alkohola (apsolutni, 96%, 70%) i obojeni hematoksilinom tokom 5 minuta, nakon čega su diferencirani u kiselom alkoholu i bojeni eozinom 3 minuta. Između bojenja, isečci su ispirani u vodi. Po dehidraciji u seriji alkohola rastuće koncentracije i tretmana ksilolom, tkivni isečci su pokriveni staklenim ljusticama. Histološki preparati analizirani su svetlosnim mikroskopom (BX51, Olympus Optical, Japan) i dokumentovani digitalnom kamerom (Olympus Color View III®, Olympus Corporation, Japan).

4.11. Supstance i lekovi

Supstance i lekovi korišćeni u ovom istraživanju uključuju: ivermektin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), azitromicin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Nemačka), klaritromicin (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Nemačka), verapamil hidrohlorid (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Nemačka), diltiazem (LGC, Ujedinjeno Kraljevstvo), tiopenton natrijum (Panpharma, Francuska), propilenglikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Rat Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) ELISA Kit (MyBiosource, California, SAD).

4.12. Statistička analiza

Svi podaci su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (mean \pm SE). Rezultati su testirani korišćenjem jednosmerne analize varijanse (ANOVA) ili t-testa, a razlike su smatrane značajnim pri vrednostima $p < 0.05$. Takođe, za ispitivanje zavisnosti doza-efekt korišćena je linearna regresija. Svi podaci analizirani su pomoću softvera GraphPad Prism, verzija 6.00 za Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Prva faza

5.1.1. Klinički pregled i telesna masa

Tokom petodnevnog tretmana, pacovi su kontinuirano praćeni kako bi se identifikovale kliničke manifestacije potencijalnih zdravstvenih poremećaja. Svakodnevno im je merena telesna masa a prosečne vrednosti na početku i kraju ispitivanja prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Srednje vrednosti (\pm SE) telesne mase pacova pre i posle aplikacije ivermektina tokom 5 dana.

Parametar	Jedinica	Kontrola	Ivermektin 0,6 mg/kg (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Ivermektin 2,4 mg/kg (n=6)	Ivermektin 4,8 mg/kg (n=6)
Telesna masa pre	g	165,00 \pm 5,16	193,33 \pm 4,94	188,33 \pm 4,77	186,66 \pm 6,66	183,33 \pm 1,66
Telesna masa posle	g	204,16 \pm 6,63	231,66 \pm 4,21	225,00 \pm 5,77	220,00 \pm 7,63	215,83 \pm 3,00

Ni u jednom trenutku nisu zabeleženi bilo kakvi simptomi zdravstvenih poremećaja kod tretiranih pacova, kao ni u kontrolnoj grupi. Životinje su u normalno konzumirali hranu i vodu, njihovo ponašanje je bilo u okviru fizioloških granica, bez značajnih razlika između kontrolnih i tretiranih pacova.

5.1.2. Procena koordinacije i ravnoteže

Za procenu neuromišićne koordinacije i integriteta CNS-a korišćen je rota-rod test. Procenjivana je sposobnost pacova da se održe na rotirajućoj osovinu. Nijedan od pacova, bilo tretiranih ili kontrolnih, nije pao tokom ispitivanja. Takođe, nijedan testirani pacov nije pokazao vidljive znakove depresije CNS-a, refleks ispravljanja je bio potpuno očuvan, hodanje na ravnoj statičnoj površini (nakon testa povlačenja repa) bilo je normalno, a svi testirani pacovi su adekvatno reagovali na spoljašnje stimulacije, uključujući reakcije na približavanje i dodir.

5.1.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih ivermektinom

5.1.3.1. Hematološke analize

Određivanje hematoloških parametara kod pacova tretiranih rastućim dozama ivermektina (0,6 mg/kg, 1,2 mg/kg, 2,4 mg/kg i 4,8 mg/kg) tokom petodnevnog perioda ukazalo je na dozno-zavisne promene u određenim parametrima, dok ukupan broj leukocita (WBC) nije bio značajno promenjen. Leukociti su ostali u rasponu od 5,55 do 7,90 \times 10⁹/l, bez statistički značajnih razlika između grupa (Tabela 6). Suprotno tome, doza od 0,6 mg/kg izazvala je značajan porast broja eritrocita (RBC) (7,71 \pm 0,12 \times 10¹²/l; p=0,004), dok su ostale doze pokazale trend povećanja broja eritrocita, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa kontrolom (6,57 \pm 0,11 \times 10¹²/l) (Marjanović i sar., 2024).

Hemoglobin (HGB) je bio značajno povećan kod pacova tretiranih najnižom dozom ivermektina (0,6 mg/kg; 142,83 \pm 1,47 g/l; p=0,0072) u poređenju sa kontrolom (127,50 \pm 2,43 g/l), dok kod ostalih doza nisu zabeležene značajne promene. Vrednost hematokrita (HCT) nije pokazala statistički značajne razlike između kontrolne i tretiranih grupa (Marjanović i sar., 2024).

Smanjenje srednjeg korpuskularnog volumena (MCV) bilo je prisutno kod pacova tretiranih dozama od 0,6 mg/kg (53,73 \pm 0,36 fl; p=0,0004), 1,2 mg/kg (53,23 \pm 0,37 fl; p=0,0028) i 2,4 mg/kg (54,15 \pm 0,37 fl; p=0,0065), dok najviša doza od 4,8 mg/kg nije izazvala značajnu promenu u MCV

vrednostima u poređenju sa kontrolom ($58,66 \pm 0,33$ fl). Srednji korpuskularni hemoglobin (MCH) bio je značajno smanjen kod pacova tretiranih svim dozama ivermektina u poređenju sa kontrolnom grupom, pri čemu su najznačajnija smanjenja zabeležena kod doza od 0,6 mg/kg ($p=0,0015$), 1,2 mg/kg ($p=0,0002$) i 2,4 mg/kg ($p=0,0072$) (Marjanović i sar., 2024). Međutim, vrednost srednje korpuskularne koncentracije hemoglobina (MCHC) značajno se povećala samo kod pacova tretiranih najnižom dozom ivermektina (0,6 mg/kg), dok kod ostalih tretiranih životinja nije bilo razlike u poređenju sa kontrolnim vrednostima.

Tabela 6. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih hematoloških parametara kod pacova nakon primene ivermektina.

Parametar	Jedinica	Kontrola (n=6)	Ivermektin 0,6 mg/kg (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Ivermektin 2,4 mg/kg (n=6)	Ivermektin 4,8 mg/kg (n=6)
WBC	$10^9/l$	$6,08 \pm 1,10$	$5,92 \pm 0,61$	$6,57 \pm 1,24$	$7,90 \pm 1,25$	$5,55 \pm 0,92$
RBC	$10^{12}/l$	$6,57 \pm 0,11$	$7,71 \pm 0,12^{***}$ ($p=0,004$) ($p=0,041$)	$7,02 \pm 0,65$	$6,98 \pm 0,21$	$6,83 \pm 0,27$
HGB	g/l	$127,50 \pm 2,43$	$142,83 \pm 1,47^{****}$ ($p=0,0072$) ($p=0,0086$)	$126,66 \pm 11,92$	$127,83 \pm 4,46$	$125,83 \pm 3,97$
HCT	%	$38,55 \pm 0,83$	$41,63 \pm 0,46$	$37,23 \pm 3,29$	$37,83 \pm 1,23$	$38,71 \pm 1,16$
MCV	fl	$58,66 \pm 0,33$	$53,73 \pm 0,36^{***}$ ($p=0,0004$)	$53,23 \pm 0,37^{**}$ ($p=0,0028$)	$54,15 \pm 0,37^{**}$ ($p=0,0065$)	$56,76 \pm 1,50$
MCH	pg	$19,45 \pm 0,07$	$18,36 \pm 0,13^{**}$ ($p=0,0015$)	$18,06 \pm 0,11^{***}$ ($p=0,0002$)	$18,31 \pm 0,15^{**}$ ($p=0,0072$)	$18,40 \pm 0,44$
MCHC	g/l	$331,00 \pm 1,43$	$342,50 \pm 1,20^{****}$ ($p=0,0030$) ($p=0,0038$)	$339,16 \pm 3,11$	$338,16 \pm 2,02^{++}$ ($p=0,0458$)	$327,33 \pm 2,87$

*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni nalaz; +-statistički značajna razlika u odnosu na ivermektin 4,8 mg/kg

5.1.3.2. Biohemijske analize

U tabeli 7 su prikazani rezultati biohemijskih parametara kod pacova tretiranih rastućim dozama ivermektina. Analiza je pokazala značajne promene u nekoliko merenih parametara. Aktivnost ALT bila je značajno povećana kod svih pacova tretiranih ivermektinom, sa najvišim nivoima zabeleženim kod doze od 2,4 mg/kg ($p < 0,0001$). Sličan obrazac je primećen za AST, koja je bila smanjena u grupama tretiranim sa 0,6 i 1,2 mg/kg, dok je bila značajno povećana kod pacova tretiranih dozom od 4,8 mg/kg ($p=0,0084$ za 0,6 mg/kg, $p=0,0065$ za 4,8 mg/kg) (Marjanović i sar., 2024).

ALP je bila značajno smanjena kod pacova tretiranih dozama od 0,6, 1,2 i 2,4 mg/kg u poređenju sa kontrolom ($p < 0,0001$), dok je kod pacova koji su 5 dana dobijali 4,8 mg/kg bila nesigifikantno niža. Nivoi γ -GT bili su nesigifikantno viši od kontrolnog nalaza kod pacova tretiranih dozama od 0,6 i 2,4 mg/kg, dok je značajno bio povećan samo kod pacova tretiranih najvišom dozom ivermektina (4,8 mg/kg) ($p < 0,0001$) (Marjanović i sar., 2024).

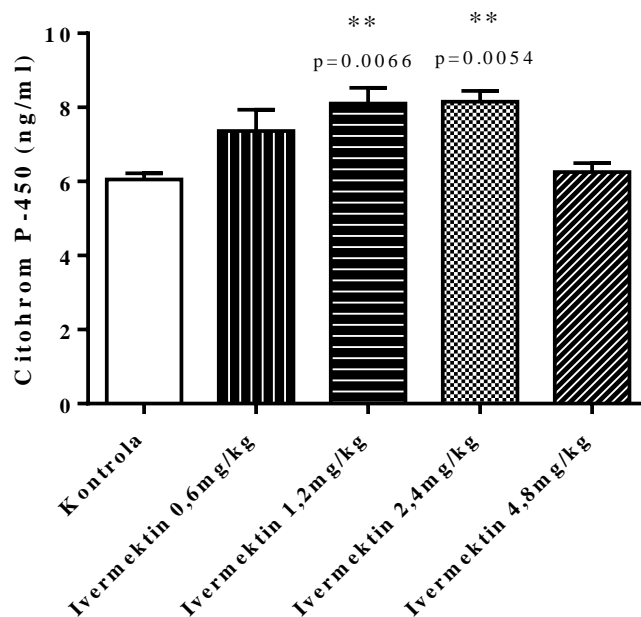
Koncentracija TP u serumu nije pokazala značajne razlike između kontrolnih i tretiranih grupa. TG su značajno povećani samo kod pacova tretiranih dozom od 4,8 mg/kg ($p=0,0128$), dok je nivo kreatinina (CREA) bio značajno smanjen kod pacova tretiranih dozom od 0,6 mg/kg ($p=0,0232$). Nivoi uree (UREA) nisu pokazali značajne razlike između kontrolne i tretiranih grupa (Marjanović i sar., 2024).

Tabela 7. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih biohemijskih parametara kod pacova nakon primene ivermektina.

Parametar	Jedinica	Kontrola (n=6)	Ivermektin 0,6 mg/kg (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Ivermektin 2,4 mg/kg (n=6)	Ivermektin 4,8 mg/kg (n=6)
ALT	U/l	57,63 \pm 3,25	94,26 \pm 3,55**** (p=0,0001)	90,86 \pm 3,75**** (p=0,0002)	97,90 \pm 5,81**** (p=0,0001)	93,45 \pm 5,84**** (p=0,0001)
AST	U/l	143,36 \pm 20,32 ⁺ (p=0,0284)	126,08 \pm 12,87 ⁺⁺ (p=0,0084)	120,06 \pm 7,06 ⁺ (p=0,0116)	115,93 \pm 8,29 ⁺⁺ (p=0,0065)	165,11 \pm 24,28
ALP	U/l	83,93 \pm 9,47	11,05 \pm 3,18**** ⁺⁺⁺ (p<0,0001) (p=0,0005)	19,31 \pm 7,22**** ⁺⁺⁺ (p<0,0001) (p=0,0034)	19,60 \pm 3,19**** ⁺⁺⁺ (p<0,0001) (p=0,0036)	64,33 \pm 11,95
γ -GT	U/l	1,38 \pm 0,13	1,68 \pm 0,20**** (p<0,0001)	1,36 \pm 0,30**** (p<0,0001)	2,06 \pm 0,17 ⁺⁺ (p=0,0015)	5,20 \pm 1,68**** (p<0,0001)
TP	g/l	58,03 \pm 1,28	64,10 \pm 1,75	63,31 \pm 1,51	60,90 \pm 2,04	61,90 \pm 2,11
TG	mmol/l	0,40 \pm 0,04	0,59 \pm 0,06	0,56 \pm 0,09	0,55 \pm 0,05	0,89 \pm 0,17* (p=0,0128)
CREA	μ mol/l	23,36 \pm 1,49	17,85 \pm 4,15 ⁺ (p=0,0232)	23,10 \pm 0,67	22,35 \pm 1,32	27,60 \pm 0,64
UREA	mmol/l	7,00 \pm 0,34	7,38 \pm 1,81	8,29 \pm 0,53	8,24 \pm 0,34	7,29 \pm 0,68

*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni nalaz; ⁺-statistički značajna razlika u odnosu na ivermektin 4,8 mg/kg

Ivermektin se intenzivno metabolizira putem enzima citohroma P-450 (P-450, CYP) kako *in vivo*, tako i *in vitro* (Rendic, 2021). Naši rezultati pokazuju da se koncentracija CYP-a proporcionalno povećavala sa rastom doze ivermektina (0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg), pri čemu su statistički značajni porasti uočeni kod doza od 1,2 mg/kg (p=0,0066) i 2,4 mg/kg (p=0,0054) u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 9).

**Slika 9.** Koncentracija citohroma P-450 u plazmi pacova nakon 5 dana tretmana rastućim dozama ivermektina.

Koncentracije CYP-a su se kretale od $6,05 \pm 0,16$ ng/ml u kontrolnoj grupi do $7,36 \pm 0,57$ ng/ml, $8,11 \pm 0,43$ ng/ml i $8,15 \pm 0,30$ ng/ml za pacove tretirane dozama od 0,6 mg/kg, 1,2 mg/kg odnosno 2,4 mg/kg. Suprotno tome, kod pacova koji su dobijali najvišu dozu (4,8 mg/kg), koncentracija CYP-a ($6,26 \pm 0,23$ ng/ml) bila je približna kontrolnoj vrednosti (Tabela 8).

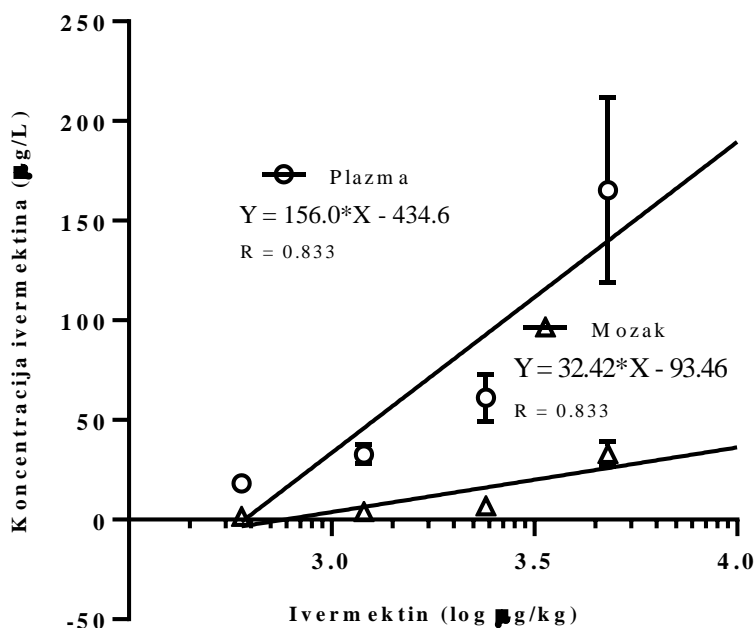
Tabela 8. Srednje vrednosti (\pm SE) koncentracije citohroma P-450 kod pacova nakon primene rastućih doza ivermektina.

Parametar (ng/ml)	Kontrola (n=6)	Ivermektin 0,6 mg/kg (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Ivermektin 2,4 mg/kg (n=6)	Ivermektin 4,8 mg/kg (n=6)
Citohrom P450	$6,05 \pm 0,16$	$7,36 \pm 0,57$	$8,11 \pm 0,43^{**}$ (p=0,0066)	$8,15 \pm 0,30^{**}$ (p=0,0054)	$6,26 \pm 0,23$

*-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolni nalaz

5.1.4. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) za ispitivanje koncentracije ivermektina u serumu i moždanom tkivu pacova

U ovoj fazi istraživanja analizirana je koncentracija ivermektina u plazmi i moždanom tkivu pacova nakon 5-dnevnog tretmana različitim oralnim dozama ivermektina. Korišćene doze tokom COVID-19 pandemije (0,6, 1,2, 2,4 i 4,8 mg/kg) značajno premašuju preporučene antiparazitske doze ivermektina kod ljudi (3, 6, 12 i 24 puta veće). Koncentracija ivermektina u plazmi i moždanom tkivu proporcionalna je primenjenoj dozi leka (Tabela 9). Linearna regresiona analiza pokazuje da je povećanje koncentracija ivermektina u plazmi i moždanom tkivu zavisno od primenjene doze ($Y=156,0X-434,6$, $r=0,8338$ i $Y=32,42*X-93,46$, $r=0,7359$) (Slika 10).



Slika 10. Linearna regresiona analiza zavisnosti koncentracije ivermektina u plazmi i moždanom tkivu pacova od primenjenih doza.

Svako dvostruko povećanje doze ivermektina (od 0,6 do 1,2 i od 1,2 do 2,4 mg/kg) dovelo je do gotovo dvostrukog povećanja koncentracija leka u plazmi i mozgu. Međutim, nakon primene doze od 4,8 mg/kg, koncentracija leka u plazmi bila je 2,5 puta veća, dok je u nivo u mozgu bio gotovo 5 puta viši u poređenju sa pacovima koji su primali duplo manju dozu (2,4 mg/kg) (Tabela 9). Ovi rezultati ukazuju na složen farmakokinetički profil ivermektina posle oralne primene visokih doza.

Tabela 9. Srednje vrednosti (\pm SE) koncentracije ivermektina u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Parametar	Ivermektin 0,6 mg/kg	Ivermektin 1,2 mg/kg	Ivermektin 2,4 mg/kg	Ivermektin 4,8 mg/kg
Koncentracija ivermektina u plazmi (μ g/L)	18,217 \pm 2,317** (p=0,0018)	32,717 \pm 4,671** (p=0,0046)	61,167 \pm 11,745* (p=0,0290)	165,317 \pm 46,450
Koncentracija ivermektina u mozgu (μ g/kg)	1,467 \pm 0,312*++ (p=0,0148, p=0,0076)	3,783 \pm 0,930* (p=0,0149)	6,667 \pm 0,932* (p=0,0193)	33,033 \pm 6,313

*-Statistički značajna razlika u odnosu na ivermektin 4,8 mg/kg; +- Statistički značajna razlika u odnosu na ivermektin 2,4 mg/kg.

5.1.5. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje usled dva ključna faktora: povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i insuficijencije adekvatnih enzimskih i neenzimskih antioksidanata. Ova neravnoteža može imati značajne posledice po zdravlje organizma, doprinoseći razvoju različitih patoloških stanja (Niedowicz i Daleke, 2005). Tabela 10 prikazuje srednje vrednosti (\pm SE) ključnih parametara oksidativnog stresa merenih u plazmi pacova, klasifikovanih prema rastućim dozama ivermektina i kontrolnoj grupi.

Tabela 10. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih parametara oksidativnog stresa u plazmi pacova.

Parametri	Jedinica	Kontrola (n=6)	Ivermektin 0,6 mg/kg (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Ivermektin 2,4 mg/kg (n=6)	Ivermektin 4,8 mg/kg (n=6)
MDA	μ M/gHb	0,771 \pm 0,035	1,015 \pm 0,078	1,140 \pm 0,094* (p=0,021)	1,107 \pm 0,077** (p=0,0092)	0,848 \pm 0,089
GSH	μ M/gHb	3,217 \pm 0,146	2,365 \pm 0,117* (p=0,0114)	2,137 \pm 0,144** (p=0,0011)	2,170 \pm 0,281** (p=0,0015)	2,337 \pm 0,081** (p=0,0086)
TAS	μ M H ₂ O ₂ Equiv/L	1,698 \pm 0,005	1,453 \pm 0,048* (p=0,0206)	1,438 \pm 0,027** (p=0,0012)	1,488 \pm 0,025** (p=0,0022)	1,488 \pm 0,033** (p=0,0086)
TOS	mM	2,567 \pm 0,058	3,163 \pm 0,205	3,167 \pm 0,193	3,145 \pm 0,075** (p=0,0057)	2,992 \pm 0,080* (p=0,0438)
OSI	TOS/TAC odnos	1,512 \pm 0,035	2,180 \pm 0,131* (p=0,0241)	2,203 \pm 0,135* (p=0,0204)	2,117 \pm 0,046*** (p=0,0005)	2,015 \pm 0,059* (p=0,0035)

*-Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

5.1.5.1. Malondialdehid (MDA)

MDA se često koristi kao biomarker lipidne peroksidacije, što je proces u kojem slobodni radikali oštećuju membrane ćelija. U prvoj fazi ispitivanja, kontrolna grupa je pokazala nivo MDA od 0,771 \pm 0,035 μ M/gHb. Tretman ivermektinom rezultirao je povećanjem nivoa MDA, pri čemu je signifikantno povećanje zabeleženo posle doza od 1,2 mg/kg i 2,4 mg/kg (1,140 \pm 0,094 μ M/gHb* p=0,021 i 1,107 \pm 0,077 μ M/gHb** p=0,0092). Ovo ukazuje na pojačan oksidativni stres kao posledicu primene ivermektina u visokom dozama. Sa druge strane, kod pacova koji su tretirani dozom od 4,8 mg/kg, vrednost MDA je bila samo malo povećana u odnosu na kontrolu, 0,848 \pm 0,089 μ M/gHb. Ovakva reakcija može ukazati na izražene toksične efekte ovako visoke doze ivermektina.

5.1.5.2. Glutation (GSH)

GSH je ključni antioksidant koji štiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Smanjenje nivoa GSH u tretiranim grupama ukazuje na potencijalnu iscrpljenost antioksidativnih resursa. U kontrolnoj grupi, nivo GSH iznosio je 3,217 \pm 0,146 μ M/gHb, dok su vrednosti u grupama sa ivermektinom varirale: 2,365 \pm 0,117 μ M/gHb* (p=0,0114) za 0.6 mg/kg, 2,137 \pm 0,144 μ M/gHb** (p=0,0011) za 1,2 mg/kg; 2,170 \pm 0,281 μ M/gHb** (p=0,0015) za 2,4 mg/kg i 2,337 \pm 0,081 μ M/gHb** (p=0,0086) za 4,8 mg/kg ivermektina. Ova smanjenja sugerišu da primena ivermektina dovodi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta organizma, što može povećati osetljivost ćelija na oksidativno oštećenje.

5.1.5.3. Ukupni antioksidativni status (TAS)

TAS je mera ukupne sposobnosti organizma da neutralizuje slobodne radikale. Vrednosti TAS u grupama sa ivermektinom su značajno smanjene: $1,453 \pm 0,048 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}^*$ ($p=0,0206$) kod 0,6 mg/kg; $1,438 \pm 0,027 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}^{**}$ ($p=0,0012$) kod 1,2 mg/kg; $1,488 \pm 0,025 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}^{**}$ ($p=0,0022$) kod 2,4 mg/kg i $1,488 \pm 0,033 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}^{**}$ ($p=0,0086$) kod 4,8 mg/kg. Kontrolna grupa je imala viši TAS ($1,698 \pm 0,005 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$), što sugeriše smanjen kapacitet organizma tretiranih pacova da neutralizuje oksidativne procese.

5.1.5.4. Ukupni oksidativni status (TOS)

TOS je meren kao pokazatelj ukupne oksidativne štete u organizmu. Kontrolna grupa je imala vrednost od $2,567 \pm 0,058 \text{ mM}$, dok je u grupama tretiranim ivermektinom vrednost TOS pokazala povećanje, ali signifikantno samo posle doza od 2,4 i 4,8 mg/kg ivermektina ($3,145 \pm 0,075 \text{ mM}$ $p=0,0057$ i $2,992 \pm 0,080 \text{ mM}$ $p=0,0438$). Ove promene su u skladu sa dobijenim podacima o povećanju MDA i smanjenju GSH, što sugeriše da ivermektin primenjivan u visokim dozama i duži vremenski period može doprineti oksidativnom oštećenju tkiva.

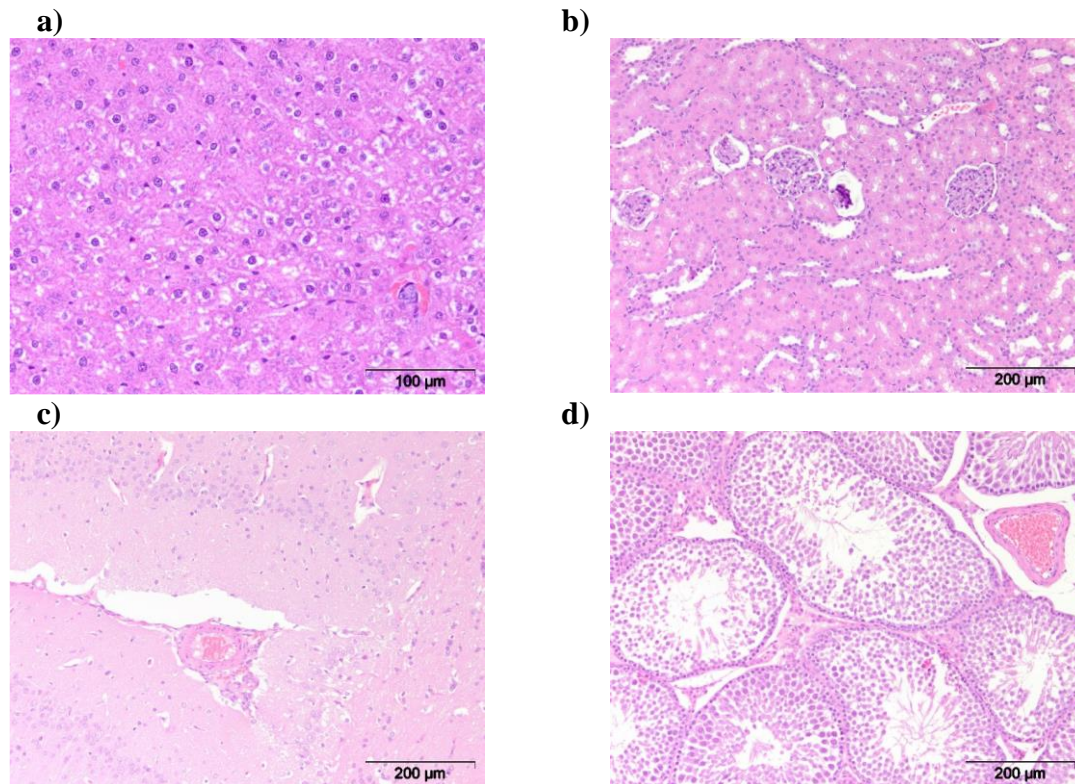
5.1.5.5. Indeks oksidativnog stresa (OSI)

OSI je pokazatelj ravnoteže između oksidansa i antioksidanata u organizmu. U kontrolnoj grupi, OSI je iznosio $1,512 \pm 0,035$, dok su vrednosti u grupama sa ivermektinom bile značajno povišene: $2,180 \pm 0,131^*$ ($p=0,0241$) za 0,6 mg/kg, $2,203 \pm 0,135^*$ ($p=0,0204$) za 1,2 mg/kg, $2,117 \pm 0,046^{***}$ ($p=0,0005$) za 2,4 mg/kg i $2,015 \pm 0,059^*$ ($p=0,0035$) za 4,8 mg/kg. Ovi rezultati naglašavaju značajno povećanje oksidativnog stresa, kao posledice primene ivermektina.

5.1.6. Makroskopski i histopatološki nalaz

U okviru makroskopske analize, patološke promene u unutrašnjim organima pacova tretiranih visokim dozama ivermektina nisu primećene. Međutim, histopatološke promene su evidentirane kod većine tretiranih pacova.

Fokalna mononuklearna infiltracija tkiva jetre uočena je kod svih tretiranih grupa, dok su intraceularni edem i vakuolarna degeneracija hepatocita (Slika 11a) bili učestaliji kod pacova koji su primili dve najviše doze ivermektina: 2,4 i 4,8 mg/kg. Kod pacova koji su primili 4,8 mg/kg ivermektina, detektovana je fokalna nekroza hepatocita. Takođe, dilatacija tubula, intraceularni edem i krvarenje u intersticijumu su primećeni u bubrezima svih tretiranih pacova. Glomerularna skleroza zabeležena je kod pacova koji su primali ivermektin u dozama od 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg (Slika 11b). Promene u tkivu mozga su zabeležene isključivo kod pacova koji su primili najvišu dozu ivermektina (4,8 mg/kg), a uključivale su fokalno i perivaskularno krvarenje (Slika 11c). Histopatološke promene u tkivu testisa detektovane su samo kod pacova tretiranih najvišom dozom ivermektina, obuhvatajući degeneraciju germinativnog epitela semenih kanalića i epitela epididimisa (Slika 11d), uz evidentno smanjenje i odsustvo spermatogeneze.



Slika 11. a) Intracelularni edem i vakuolarna degeneracija hepatocita; b) Glomerularna skleroza u bubrezima pacova; c) Fokarno i perivaskularno krvarenje u mozgu pacova; d) Degeneracija epitela semeni kanalići testisa.

5.2. Druga faza

5.2.1. Klinički pregled i telesna masa

Druga faza ispitivanja organizovana je u isto vreme sa prvom fazom. Međutim, u drugoj fazi ispitivanja četiri eksperimentalne grupe mužjaka pacova (n=6) tretirane su terapijskim dozama azitromicina i klaritromicina (inhibitorima P-gp), verapamila i diltiazema (inhibitorima enzima citohrom P450), tokom 10 dana. Cilj ispitivanja je bio da se utvrdi da li ovi lekovi u terapijskim dozama izazivaju promene u organizmu tretiranih pacova. Dobijene vrednosti praćenih parametara (kao i iz prve faze) upoređivane su sa kontrolnim nalazom iz prve faze. Telesna masa pacova merena je svakodnevno, a prosečne vrednosti na početku i kraju ispitivanja prikazane su u tabeli 11.

Tabela 11. Srednje vrednosti (\pm SE) telesne mase pacova pre i posle aplikacije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina (10 dana).

Parametar	Jedinica	Verapamil 1 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg (n=6)
Telesna masa pre	g	145,00 \pm 5,62	168,33 \pm 4,01	155,00 \pm 7,63	160,00 \pm 3,65
Telesna masa posle	g	190,00 \pm 4,28	223,33 \pm 3,57	200,83 \pm 8,10	205,83 \pm 3,96

Terapijski protokol i doziranje lekova sprovedeni su u skladu s preporukama, uz kontinuirano praćenje kliničkog statusa životinja radi identifikacije mogućih znakova toksičnosti ili zdravstvenih poremećaja. Tokom trajanja druge faze, kod pacova tretiranih lekovima nisu primećeni klinički simptomi koji bi ukazali na narušen zdravstveni status. Svi pacovi su konzumirali hranu i vodu u

uobičajenim količinama, a ponašanje je ostalo u granicama fizioloških normi, bez uočenih značajnih razlika u odnosu na kontrolni nalaz. Ovo potvrđuje odsustvo vidljivih toksičnih efekata lekova u primenjenim dozama.

5.2.2. Procena koordinacije i ravnoteže

U okviru procene motoričke koordinacije i ravnoteže korišćen je rota-rod test, pri čemu nijedan pacov, kao i u kontrolnoj grupi, nije pao sa rotirajuće šipke tokom ispitivanja. Kod svih testiranih jedinki nije zabeležen nijedan znak depresije CNS-a, refleks ispravljanja bio je potpuno očuvan, hod na ravnoj statičkoj površini nakon testa povlačenja repa ostao je stabilan, a odgovori na spoljašnje stimulse, uključujući reakcije na približavanje i dodir, bili su u potpunosti adekvatni. Ovi nalazi potvrđuju odsustvo poremećaja u motoričkim i neurološkim funkcijama kod tretiranih jedinki.

5.2.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom

5.2.3.1. Hematološke analize

U analizi hematoloških parametara kod pacova, nisu zabeležene značajnije promene. WBC u grupama tretiranim verapamilom i diltiazemom bio je nesignifikantno povišen, sa vrednostima od $8,86 \pm 0,79$ i $8,05 \pm 0,93 \times 10^9/l$, u poređenju sa kontrolnom grupom ($6,08 \pm 1,10 \times 10^9/l$). Nasuprot tome, u grupi tretiranoj azitromicinom, zabeležen je nesignifikantni pad WBC na $5,12 \pm 0,61 \times 10^9/l$, dok klaritromicin nije imao nikakav uticaj na ovaj parametar ($6,15 \pm 0,90 \times 10^9/l$). U pogledu RBC, verapamil i diltiazem su takođe pokazali vrlo blago nesignifikantno povišenje, pri čemu je diltiazem postigao najvišu vrednost ($7,38 \pm 0,76 \times 10^{12}/l$), dok je azitromicin povećao RBC na $7,07 \pm 0,16 \times 10^{12}/l$, a klaritromicin na $6,87 \pm 0,06 \times 10^9/l$). Nijedna promena nije bila signifikantna.

Tabela 12. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih hematoloških parametara kod pacova nakon primene verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicina.

Parametar	Jedinica	Kontrola (n=6)	Verapamil 1 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg (n=6)
WBC	$10^9/l$	$6,08 \pm 1,10$	$8,86 \pm 0,79$	$8,05 \pm 0,93$	$5,12 \pm 0,61$	$6,15 \pm 0,90$
RBC	$10^{12}/l$	$6,57 \pm 0,11$	$7,20 \pm 0,17$	$7,38 \pm 0,76$	$7,07 \pm 0,16$	$6,87 \pm 0,06$
HGB	g/l	$127,50 \pm 2,43$	$133,50 \pm 2,17$	$137,50 \pm 1,62$	$130,33 \pm 2,07$	$131,83 \pm 1,44$
HCT	%	$38,55 \pm 0,83$	$37,61 \pm 0,69$	$38,61 \pm 0,53$	$36,98 \pm 0,68$	$37,58 \pm 0,27$
MCV	fl	$58,66 \pm 0,33$	$52,28 \pm 0,57^{****}$ p<0,0001	$52,48 \pm 0,71^{****}$ p<0,0001	$52,25 \pm 0,45^{****}$ p<0,0001	$54,98 \pm 0,32^{***}$ p=0,0001
MCH	pg	$19,45 \pm 0,07$	$18,55 \pm 0,24^*$ p=0,0307	$18,71 \pm 0,30$	$18,43 \pm 0,20^*$ p=0,0109	$19,18 \pm 0,12$
MCHC	g/l	$331,00 \pm 1,43$	$355,00 \pm 2,92^{****}$ p<0,0001	$354,50 \pm 1,68^{****}$ p<0,0001	$352,83 \pm 1,75^{****}$ p<0,0001	$349,16 \pm 1,19^{****}$ p<0,0001

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

Svi tretmani su rezultirali blagim povišenjem koncentracije HGB, gde je diltiazem izazvao najveći porast ($137,50 \pm 1,62$ g/l), a klaritromicin najmanju promenu ($131,83 \pm 1,44$ g/l) u poređenju sa kontrolom ($127,50 \pm 2,43$ g/l). HCT nije pokazao značajne promene kod tretiranih grupa, a najniža vrednost zabeležena je kod azitromicina ($36,98 \pm 0,68$ %), dok su ostale grupe bile blizu kontrolne vrednosti ($38,55 \pm 0,83$ %).

Statistički značajno smanjenje MCV primećeno je kod svih tretiranih grupa (verapamil: $52,28 \pm 0,57$ fl, diltiazem: $52,48 \pm 0,71$ fl, azitromicin: $52,25 \pm 0,45$ fl, klaritromicin: $54,98 \pm 0,32$ fl) u poređenju sa kontrolnom vrednošću ($58,66 \pm 0,33$ fl).

Smanjenje MCH bilo je statistički značajno kod verapamila ($18,55 \pm 0,24$ pg; $*p = 0,0307$) i azitromicina ($18,43 \pm 0,20$ pg; $*p = 0,0109$), dok diltiazem i klaritromicin nisu izazvali signifikantne promene. Svi tretmani su pokazali značajno povećanje MCHC u poređenju sa kontrolom ($331,00 \pm 1,43$), pri čemu su verapamil ($355,00 \pm 2,92$), diltiazem ($354,50 \pm 1,68$), azitromicin ($352,83 \pm 1,75$) i klaritromicin ($349,16 \pm 1,19$) imali visoku statističku značajnost ($****p < 0,0001$) (Tabela 12). Međutim, ističemo da su sve praćene vrednosti, osim vrednosti MCHC (koje su blago povišene) bile u granicama fizioloških, za ovaj soj i starost pacova (Patel i sar., 2024).

5.2.3.2. Biohemijske analize

Rezultati biohemijskih analiza prikazani su u tabeli 13. Srednja vrednost ALT je bila neznatno smanjena kod svih tretiranih pacova ali ne i do nivoa statističke značajnosti. AST je u kontrolnoj grupi iznosila $143,36 \pm 20,32$ U/l. Tretman verapamilom i diltiazemom doveo je do izvesnog smanjenja vrednosti AST-a ($115,83 \pm 5,50$ U/l i $115,20 \pm 7,08$ U/l), dok je azitromicin izazvao nesignifikantno povišenje ($171,31 \pm 43,84$ U/l). Sve ove vrednosti bile su u granicama fizioloških (Patel i sar., 2024).

Tabela 13. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih biohemijskih parametara kod pacova nakon primene verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicina.

Parametar	Jedinica	Kontrola (n=6)	Verapamil 1 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg (n=6)
ALT	U/l	$57,63 \pm 3,25$	$51,28 \pm 2,83$	$54,50 \pm 3,38$	$54,51 \pm 2,05$	$48,30 \pm 2,05$
AST	U/l	$143,36 \pm 20,32$	$115,83 \pm 5,50$	$115,20 \pm 7,08$	$171,31 \pm 43,84$	$146,80 \pm 40,46$
ALP	U/l	$83,93 \pm 9,47$	$5,91 \pm 1,37^{****}$ $p < 0,0001$	$5,83 \pm 1,66^{****}$ $p < 0,0001$	$7,01 \pm 1,32^{****}$ $p < 0,0001$	$6,88 \pm 1,68^{****}$ $p < 0,0001$
γ -GT	U/l	$1,38 \pm 0,13$	$0,70 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,21^{**}$ $p = 0,0094$	$0,76 \pm 0,07$
TP	g/l	$58,03 \pm 1,28$	$61,60 \pm 2,46$	$64,08 \pm 0,50$	$62,15 \pm 1,39$	$61,88 \pm 1,29$
TG	mmol/l	$0,40 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04^{***}$ $p = 0,0009$	$1,03 \pm 0,09^{***}$ $p = 0,0001$	$1,06 \pm 0,12^{****}$ $p < 0,0001$	$0,99 \pm 0,07^{***}$ $p = 0,0003$
CREA	μ mol/l	$23,36 \pm 1,49$	$14,20 \pm 0,44^{****}$ $p < 0,0001$	$15,85 \pm 0,70^{***}$ $p = 0,0001$	$14,80 \pm 0,83^{****}$ $p < 0,0001$	$16,45 \pm 1,37^{***}$ $p = 0,0004$
UREA	mmol/l	$7,00 \pm 0,34$	$14,19 \pm 1,06^{****}$ $p < 0,0001$	$14,74 \pm 0,30^{****}$ $p < 0,0001$	$8,46 \pm 0,27$	$7,36 \pm 0,23$

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

Veće smanjenje vrednosti ALP je zabeleženo u svim tretiranim grupama, pri čemu su vrednosti za verapamil ($5,91 \pm 1,37$ U/l, $p < 0,0001$), diltiazem ($5,83 \pm 1,66$ U/l, $p < 0,0001$), azitromicin ($7,01 \pm 1,32$ U/l, $p < 0,0001$) i klaritromicin ($6,88 \pm 1,68$ U/l, $p < 0,0001$) bile statistički značajno niže u poređenju sa kontrolnom grupom ($83,93 \pm 9,47$ U/l).

Kontrolna grupa je imala vrednost γ -GT od $1,38 \pm 0,13$ U/l, dok je smanjenje nivoa zabeleženo kod svih tretiranih grupa, sa najnižom i jedino signifikantno smanjenom vrednošću kod pacova tretiranih azitromicinom ($0,53 \pm 0,21$ U/l, $p = 0,0094$), ipak su sve vrednosti i dalje bile u granicama normalih za ova soj, pol i uzrast pacova (Loeb i Quimby, 1999).

Prosečne vrednosti totalnih proteina se nisu razlikovale međusobno i u odnosu na kontrolni nalaz. Kretale od $58,03 \pm 1,28$ g/l u kontrolnoj grupi do $64,08 \pm 0,50$ g/l kod pacova tretiranih diltiazemom, što je u okviru fizioloških vrednosti (Patel i sar., 2024)

Vrednosti triglicerida u kontrolnoj grupi iznosile su $0,40 \pm 0,04$ mmol/l, dok su grupe tretirane lekovima pokazale značajno povećanje (verapamil: $0,94 \pm 0,04$ mmol/l, diltiazem: $1,03 \pm 0,09$ mmol/l, azitromicin: $1,06 \pm 0,12$ mmol/l, klaritromicin: $0,99 \pm 0,07$ mmol/l; svi sa $p < 0,0001$).

Srednja vrednost kreatinina kod kontrolne grupe bila je $23,36 \pm 1,49$ μ mol/l, i u odnosu na ovaj nalaz, tretirane grupe su pokazale značajno smanjenje (verapamil: $14,20 \pm 0,44$ μ mol/l, diltiazem:

15,85±0,70 µmol/l, azitromicin: 14,80±0,83 µmol/l, klaritromicin: 16,45±1,37 µmol/l; svi sa $p < 0,0001$ ili $p = 0,0001$).

Prosečne vrednosti uree su se kretale od 7,00±0,34 mmol/l u kontrolnoj grupi do značajno povišenih u grupama tretiranim verapamilom i diltiazemom (14,19±1,06 mmol/l i 14,74±0,30 mmol/l, sa $p < 0,0001$), dok su vrednosti kod pacova tretiranih azitromicinom i klaritromicinom bile približne kontrolnom nalazu (Tabela 13).

Tretman verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom nije doveo do statistički značajne promene koncentracije enzima P-450 u plazmi pacova (Tabela 14). Vrednosti koncentracije enzima su bile blago povećane kod svih tretiranih životinja, ali to povećanje je bilo daleko ispod signifikantne razlike u odnosu na kontrolnu vrednost.

Tabela 14. Srednje vrednosti (\pm SE) koncentracija citohroma P-450 kod pacova nakon primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina.

Parametar (ng/ml)	Kontrola (n=6)	Verapamil 1 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg (n=6)
Citohrom P-450	6,05±0,16	7,07±1,21	6,60±1,14	6,53±1,10	6,12±1,05

5.2.4. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom za ispitivanje verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u plazmi i moždanom tkivu pacova

Srednje koncentracije testiranih lekova u plazmi, posle desetodnevne primene prikazane su u tabeli 15. Verapamil je dostigao srednju koncentraciju od 0,085±0,02 µg/L dok je diltiazem detektovan u koncentraciji od 0,026±0,009 µg/L. Koncentracija azitromicina je posle desetodnevnog tretmana iznosila 13,988±1,75 µg/L, a klaritromicina 1,092±0,18 µg/L (Tabela 15).

Tabela 15. Srednje vrednosti (\pm SE, n=6) koncentracije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Parametar	Verapamil 1 mg/kg	Diltiazem 2,5 mg/kg	Azitromicin 3,6 mg/kg	Klaritromicin 7 mg/kg
Koncentracija lekova u plazmi (µg/L)	0,085±0,022	0,026±0,009	13,988±1,759	1,092±0,184
Koncentracija lekova u mozgu (µg/kg)	0,645±0,109	0,547±0,110	115,090±16,579	5,525±1,093

Kada su u pitanju koncentracije lekova u moždanom tkivu, verapamil je dostigao koncentraciju od 0,645±0,10 µg/kg a diltiazem 0,547±0,110 µg/kg. Azitromicin je u mozgu postigao koncentraciju od 115,090±16,579 µg/kg, a klaritromicin 5,525±1,093 µg/kg (Tabela 15).

5.2.5. Oksidativni stres

U istraživanju efekata verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina na parametre oksidativnog stresa kod pacova, analizirani su ključni pokazatelji oksidativnog i antioksidativnog odgovora: MDA, GSH, TAS, TOS i OSI. Kod svih tretiranih grupa pacova pojavile su se razlike u odnosu na kontrolni nalaz (Tabela 16).

Tabela 16. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih parametara oksidativnog stresa kod pacova nakon primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina.

Parametar	Jedinica	Kontrola (n=6)	Verapamil 1 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg (n=6)
MDA	$\mu\text{mol/gHb}$	0,771 \pm 0,035	1,268 \pm 0,219	1,370 \pm 0,144* (p=0,0371)	1,138 \pm 0,163	1,035 \pm 0,095
GSH	$\mu\text{mol/gHb}$	3,217 \pm 0,146	2,563 \pm 0,154	2,490 \pm 0,112	2,582 \pm 0,209	2,548 \pm 0,295
TAS	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L	1,698 \pm 0,005	1,392 \pm 0,013**** p<0,0001	1,403 \pm 0,016**** p<0,0001	1,342 \pm 0,043**** p<0,0001	1,335 \pm 0,055**** p<0,0001
TOS	mM	2,567 \pm 0,058	3,388 \pm 0,088**** p<0,0001	3,258 \pm 0,077*** P=0,0001	3,277 \pm 0,029**** p<0,0001	3,427 \pm 0,149**** p<0,0001
OSI	TOS/TAC odnos	1,512 \pm 0,035	2,44 \pm 0,08**** p<0,0001	2,342 \pm 0,072**** p<0,0001	2,440 \pm 0,089**** p<0,0001	2,588 \pm 0,133**** p<0,0001

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

5.2.5.1. Malondialdehid (MDA)

MDA, marker lipidne peroksidacije, je bio statistički značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu (0,771 \pm 0,035 $\mu\text{mol/gHb}$) samo kod pacova tretiranih diltiazemom (1,370 \pm 0,144 $\mu\text{mol/gHb}$, sa statistički značajnom razlikom (p=0,0371). Kod ostalih lekova, verapamila (1,268 \pm 0,219 $\mu\text{mol/gHb}$), azitromicina (1,138 \pm 0,163 $\mu\text{mol/gHb}$) i klaritromicina (1,035 \pm 0,095 $\mu\text{mol/gHb}$), primećen je izvestan porast MDA, ali bez dostizanja nivoa statističke značajnosti. Ovi rezultati sugerišu da diltiazem može indukovati intenzivniju lipidnu peroksidaciju, što može povećati rizik od oksidativnih oštećenja.

5.2.5.2. Glutation (GSH)

Kao ključni antioksidativni agens, GSH je nesignifikantno smanjen u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolom (3,217 \pm 0,146 $\mu\text{mol/gHb}$). Smanjenje GSH bilo je najizraženije kod diltiazema (2,490 \pm 0,112 $\mu\text{mol/gHb}$), dok su i verapamil, azitromicin i klaritromicin pokazali slične rezultate sa blagim odstupanjima. Ovo smanjenje ukazuje na opterećenje antioksidativnog sistema u tretiranim grupama i moguću iscrpljenost glutaciona kao odgovora na povećan oksidativni stres izazvan lekom.

5.2.5.3. Ukupni antioksidativni status (TAS)

TAS je značajno snižen u svim tretiranim grupama u poređenju sa kontrolnom (1,698 \pm 0,005 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L), sa najvećim padom zabeleženim u grupi tretiranoj klaritromicinom (1,335 \pm 0,055 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L). Sve razlike su bile statistički značajne (p<0,0001). Smanjenje TAS u tretiranim grupama sugeriše narušavanje antioksidativne zaštite, čime se povećava verovatnoća oštećenja ćelijskih struktura pod dejstvom oksidativnog stresa.

5.2.5.4. Ukupni oksidativni status (TOS)

TOS je značajno povećan u svim grupama tretiranim lekovima u poređenju sa kontrolom (2,567 \pm 0,058 mM), sa najvišim vrednostima u grupi tretiranoj klaritromicinom (3,427 \pm 0,149 mM). Statistički značajne razlike (p<0,0001) potvrđuju indukciju oksidativnog stresa kao odgovora na farmakološke agense, pri čemu su svi ispitivani lekovi pokazali tendenciju ka povećanju TOS, što može biti povezano sa intenzivnijom produkcijom reaktivnih kiseoničkih vrsta.

5.2.5.5. Indeks oksidativnog stresa (OSI)

Odnos TOS i TAS, takođe je pokazao značajno povećanje u tretiranim grupama, pri čemu je najviša vrednost zabeležena kod pacova tretiranih klaritromicinom ($2,588 \pm 0,133$). Razlike su bile statistički značajne ($p < 0,0001$) za sve grupe u odnosu na kontrolu ($1,512 \pm 0,035$). Ovi rezultati ukazuju na narušavanje ravnoteže između oksidativnog i antioksidativnog statusa, što dodatno potvrđuje prisustvo oksidativnog stresa kao odgovora na primenu lekova.

Ovi nalazi ukazuju na to da primena verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina može izazvati povećanje oksidativnog stresa, verovatno kroz iscrpljivanje antioksidativnih resursa kao što je glutation i smanjenje TAS, čime se povećava lipidna peroksidacija i ukupni oksidativni pritisak.

5.2.6. Makroskopski i histopatološki nalaz

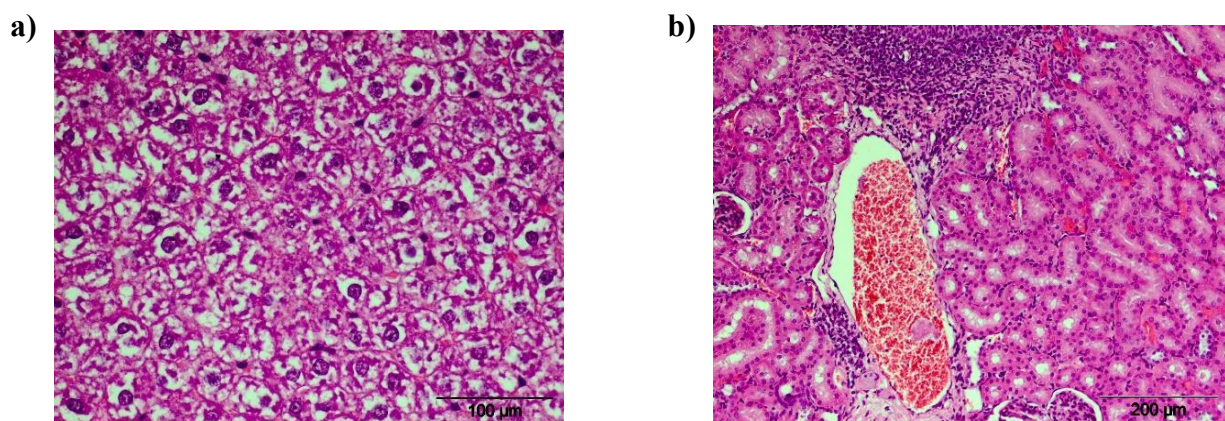
Makroskopske promene na unutrašnjim organima nisu zapažene. Međutim, histopatološki pregled je pokazao u jetri pacova tretiranih verapamilom fokalnu infiltraciju mononuklearnim ćelijama kod 2/6 pacova, intracelularni edem hepatocita (1/6) i intracelularni edem i vakuolarnu degeneraciju kod 2/6 životinja. Samo vakuolarna degeneracija je detektovana kod 3 od 6 pacova a fokalna nekroza hepatocita kod 2 pacova. U bubrežima je bila prisutna skleroza glomerula kod većine životinja (5/6) dok je nešto ređe uočena dilatacija tubula (2/6). Međutim, polovina tretiranih životinja imala intracelularni edem a većina krvavljenja u intersticijumu.

Kod većine pacova tretiranih diltiazemom u jetri je otkrivena vakuolarna degeneracija (4/6) dok su samo dva pacova imala i nekrozu hepatocita (Slika 12a). Sa druge strane, najčešći nalaz u bubrežima bio je intracelularni edem, a samo kod po jedne životinje zapažena je skleroza glomerula i dilatacija tubula.

Kod 5/6 pacova tretiranih azitromicinom zapažena je vakuolarna degeneracija hepatocita (perifeija lobusa) a samo kod jednog i intracelularni edem. U bubrežima ja dominantan nalaz bio skleroza glomerula (5/6) i intracelularni edem (3/6) dok je dilatacija tubula bila prisutna kod jednog pacova.

U jetri 2 životinje koje su dobijale klaritromicin nađen je intracelularni edem a vakuolarna degeneracija hepatocita na periferiji lobulusa kod 4 pacova. U bubrežima je uočena skleroza glomerula (5/6) i fokalni intersticijalni nefritis (4/6) (Slika 12b). Samo kod jedne životinje je uočen i intracelularni edem.

U mozgu i testisima tretiranih pacova nisu zapažene histopatološke promene.



Slika 12. a) Vakuolarna degeneracija i nekroza hepatocita kod pacova tretiranih diltiazemom; **b)** Intersticijalni nefritis u bubregu pacova tretiranih klaritromicinom.

5.3. Treća faza

5.3.1. Klinički pregled i telesna masa

Tokom petodnevnog tretmana azitromicinom, klaritromicinom, diltiazemom i verapamilom, nakon čega su ovi lekovi dodatno kombinovani sa ivermektinom u sledećih pet dana, pacovi su bili pod stalnim nadzorom radi praćenja kliničkih znakova mogućih zdravstvenih poremećaja. Nije primećen nijedan klinički znak toksičnosti ni kod tretiranih ni kod kontrolne grupe, što ukazuje na dobru podnošljivost ispitivanih terapijskih režima i njihove kombinacije sa ivermektinom. Pacovi su održavali stabilan unos hrane i vode, dok su parametri ponašanja ostali u granicama očekivanih normi, bez značajnih razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati sugerišu odsustvo kliničkih manifestacija akutnih toksičnih efekata tokom desetodnevne primene lekova u terapijskim dozama, što je u skladu sa prethodnim fazama istraživanja.

Tabela 17. Srednje vrednosti (\pm SE) telesne mase pacova pre i posle aplikacije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u kombinaciji sa ivermektinom (10 dana).

Parametar	Jedinica	Verapamil 1 mg/kg+ Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)
Telesna masa pre	g	146,66 \pm 5,57	148,33 \pm 5,42	150 \pm 2,58	153,33 \pm 5,57
Telesna masa posle	g	193,33 \pm 6,00	194,16 \pm 6,88	196,16 \pm 4,54	199,45 \pm 7,26

Telesna masa pacova merena je svakodnevno a prosečne vrednosti na početku i kraju ispitivanja prikazane su u tabeli 17.

5.3.2. Procena koordinacije i ravnoteže

Za procenu motoričke koordinacije i ravnoteže primenjen je rota-rod test, u okviru kog nijedan pacov tretiranih grupa nije pao sa rotirajuće šipke, što ukazuje na očuvanu motornu funkciju. Tokom ispitivanja nije primećena depresija CNS-a, s obzirom na to da su svi pacovi imali očuvan refleks ispravljanja i sposobnost normalnog hoda na ravnoj, statičnoj površini, posle sprovođenja testa povlačenja repa. Osim toga, kod svih ispitivanih pacova zabeležene su adekvatne reakcije na spoljašnje stimulse, uključujući odgovor na približavanje i taktilne nadražaje. Ovi rezultati sugerišu odsustvo neurotoksičnih efekata ispitivanih lekova u primenjenom desetodnevnom režimu.

5.3.3. Hematološke i biohemijske analize kod pacova tretiranih ivermektinom

5.3.3.1. Hematološke analize

Hematološki parametri pacova tretiranih kombinacijama ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom ukazuju na određene promene u pojedinim parametrima krvne slike. Analiza pojedinačnih parametara otkriva da vrednosti WBC nisu pokazale statistički značajne razlike između različitih tretmana, sa vrednostima u rasponu od 5,82 do 7,24 \times 10⁹/l. Kod parametra RBC, zabeleženo je blago povećanje u grupama tretiranim kombinacijama, pri čemu je najviša vrednost (8,08 \times 10¹²/l) zabeležena kod kombinacije klaritromicina i ivermektina. Slično tome, koncentracije HGB i HCT bile su nešto više kod kombinovanih tretmana, sa najvišim vrednostima u grupama sa verapamilom i klaritromicinom ali bez statističke značajnosti (Tabela 18). Sve praćene vrednosti bile su u granicama fizioloških vrednosti (Patel i sar., 2024).

MCV je pokazao statistički značajno smanjenje u svim grupama tretiranih kombinacijom u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu samo ivermektinom ($p < 0,005$), pri čemu je najniža vrednost zabeležena kod kombinacije klaritromicina i ivermektina (49,83 fl). Ovaj pad MCV, je bio nešto ispod fizioloških vrednosti (51,84-63,96 fl) (Patel i sar., 2024) i ukazuje na moguće promene u veličini

eritrocita, verovatno zbog kombinovanog uticaja lekova na eritropoezu ili osmotsku stabilnost ćelija. Kod MCH, nisu uočene značajne razlike između grupa, sa stabilnim vrednostima od 17,86 do 18,20 pg u okviru fizioloških vrednosti (Patel i sar., 2024).

Sa druge strane, MCHC pokazuje značajno povećanje u svim grupama tretiranim kombinacijom u odnosu na kontrolu sa ivermektinom ($p < 0,0001$), sa najvišom vrednošću u grupi tretiranoj kombinacijom klaritromicin/ivermektin (358,50 g/l). Ovo povećanje MCHC prevazilazi fiziološke vrednosti (297,6-340,0 g/l) i sugerise potencijalne promene u strukturi ili propustljivosti eritrocitne membrane pod uticajem kombinovanih tretmana. Rezultati prikazani u tabeli 18 ukazuju na specifične hematološke promene, naročito izražene u hematološkim indeksima, MCV i MCHC, koje bi mogle imati implikacije na osmoregulaciju i oksigenacioni kapacitet krvi kod pacova tretiranih ovim kombinacijama lekova.

Tabela 18. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih hematoloških parametara kod pacova nakon primene verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicin u kombinaciji sa ivermektinom.

Parametar	Jedinica	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Verapamil 1,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg + Ivermektin 1,2mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)
WBC	$10^9/l$	6,57 \pm 1,24	6,78 \pm 0,42	6,64 \pm 0,83	5,82 \pm 0,54	7,24 \pm 0,56
RBC	$10^{12}/l$	7,02 \pm 0,65	7,96 \pm 0,12	7,60 \pm 0,23	7,61 \pm 0,06	8,08 \pm 0,13
HGB	g/l	126,66 \pm 11,92	144,00 \pm 3,13	138,33 \pm 4,24	136,50 \pm 1,38	144,33 \pm 1,52
HCT	%	37,23 \pm 3,29	40,35 \pm 0,83	38,66 \pm 1,22	38,53 \pm 0,47	40,28 \pm 0,43
MCV	fl	53,23 \pm 0,37	50,68 \pm 0,40** p=0,0031	50,80 \pm 0,50** p=0,0049	50,65 \pm 0,29** p=0,0027	49,83 \pm 0,56**** p<0,0001
MCH	pg	18,06 \pm 0,11	18,10 \pm 0,18	18,20 \pm 0,14	17,95 \pm 0,09	17,86 \pm 0,24
MCHC	g/l	339,16 \pm 3,11	357,33 \pm 1,68**** p<0,0001	357,83 \pm 1,81**** p<0,0001	354,16 \pm 2,00*** p=0,0003	358,50 \pm 1,52**** p<0,0001

*- statistički značajna razlika u odnosu na grupu ivermektin 1,2 mg/kg.

5.3.3.2. Biohemijske analize

U analizi biohemijskih parametara pacova tretiranih kombinacijama ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom identifikovane su promene koje ukazuju na potencijalne interakcije ovih lekova u funkcijama jetre i bubrega (Tabela 19). Prosečne vrednosti ALT bile su nešto niže od vrednosti koja je zabeležena kod pacova tretiranih samo ivermektinom, ali su i dalje bile signifikantno više kod kombinacija verapamil/ivermektin, azitromicin/ivermektin i klaritromicin/ivermektin u odnosu na nalaz kod netretiranih kontrolnih pacova prikazano u tabeli 13 ($p=0,0268$; $p=0,0351$ i $p=0,0399$). Sa druge strane, vrednost AST je bila viša kod pacova svih grupa tretiranih kombinacijom u odnosu na nalaz kod pacova koji su samo dobijali ivermektin, ali bez statističke značajnosti. Ova promena kao posledica kombinovanog davanja ivermektina i izabranih lekova nije dostigla vrednost zabeleženu kod netretirane kontrole i bila je i dalje nesignifikantno niža.

Interesantan je nalaz ALP gde je uočeno signifikantno smanjenje u svim grupama koje su dobijale kombinaciju lekova u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo ivermektinom. Najniže vrednosti zabeležene su kod verapamila (0,73 U/l; $p=0,0037$) i diltiazema (0,68 U/l; $p=0,0036$). Sa druge strane, vrednosti ALP su bile visoko signifikantno niže ($p < 0,0001$) i u odnosu na netretiranu kontrolu (83,93 \pm 9,47 U/l). Aktivnost γ -GT, drugog značajnog markera jetrene funkcije, pokazuje statistički značajno smanjenje isključivo kod kombinacije ivermektin/verapamil (0,63 U/l; $p=0,0387$), dok su ostale kombinacije zadržale nivo sličan kontrolnoj grupi tretiranoj samo ivermektinom. Ovaj nalaz može sugerisati specifičnu interakciju verapamila sa ivermektinom, sa potencijalnim efektom na jetreni metabolizam. Ujedno, nivo γ -GT zabeležen posle davanja

kombinacije ivermektin/verapamil, bio je signifikantno niži i u odnosu na nalaz kod netretirane kontrole ($p=0,0029$).

Koncentracija TP i TG, uz manje varijacije se nije razlikovala među tretiranim grupama i grupi koja je dobijala samo ivermektin. Koncentracija triglicerida u grupi tretiranoj ivermektin/azitromicinom (0,72 mmol/l) ispoljila je nesignifikantno povećanje u odnosu na grupu tretiranu ivermektinom i kontrolnu netretiranu grupu, što može ukazati na specifičan efekt azitromicina u metabolizmu lipida. Kod parametara bubrežne funkcije, vrednosti kreatinina i pored blagog povećanja nisu pokazale statistički značajne razlike između tretiranih grupa, dok su vrednosti uree ispoljile trend smanjenja u grupama sa verapamilom (5,88 mmol/l) i klaritromicinom (5,81 mmol/l).

Rezultati prikazani u tabeli 19 pružaju značajan uvid u biohemijske posledice primene ivermektina u kombinaciji sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, posebno ukazujući na smanjenje aktivnosti ALP i γ -GT kod kombinacija sa verapamilom i diltiazemom.

Nakon primene različitih terapijskih režima, uključujući verapamil, diltiazem, azitromicin, klaritromicin i njihove kombinacije sa ivermektinom (1,2 mg/kg), koncentracije citohroma P-450 u plazmi pacova pokazale su nesignifikantne razlike među grupama. Kontrolna grupa, koja nije primala lekove, imala je najnižu koncentraciju citohroma P-450 ($6,05 \pm 0,16$ ng/ml), dok je grupa tretirana isključivo ivermektinom pokazala statistički značajan porast na $8,11 \pm 0,43$ ng/ml ($p=0,0214$), što ukazuje na indukcionu efekt ivermektina. Srednje vrednosti (\pm SE) koncentracija citohroma P-450 za sve tretirane grupe prikazane su u tabeli 20, pružajući uvid u efekte specifičnih kombinacija lekova sa ivermektinom.

Tabela 19. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih biohemijskih parametara kod pacova nakon primene verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicin u kombinaciji sa ivermektinom.

Parametar	Jedinica	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Verapamil 1,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)
ALT	U/l	90,86 \pm 3,75	81,70 \pm 7,09	76,55 \pm 6,24	80,81 \pm 0,52	80,38 \pm 6,32
AST	U/l	120,06 \pm 7,06	126,31 \pm 4,94	132,95 \pm 9,59	121,31 \pm 8,15	124,11 \pm 7,44
ALP	U/l	19,43 \pm 7,15	0,73 \pm 0,27** p=0,0037	0,68 \pm 0,29** p=0,0036	3,05 \pm 1,00* p=0,0125	3,55 \pm 1,00* p=0,0161
γ -GT	U/l	1,36 \pm 0,30	0,63 \pm 0,12* p=0,0387	1,35 \pm 0,12	0,93 \pm 0,14	1,13 \pm 0,13
TP	g/l	63,31 \pm 1,51	62,41 \pm 0,91	60,61 \pm 1,37	62,05 \pm 0,54	63,36 \pm 0,86
TG	mmol/l	0,56 \pm 0,09	0,51 \pm 0,02	0,47 \pm 0,03	0,72 \pm 0,15	0,53 \pm 0,05
CREA	μ mol/l	23,10 \pm 0,67	26,20 \pm 0,77	24,18 \pm 1,70	25,26 \pm 0,78	27,41 \pm 1,05
UREA	mmol/l	8,29 \pm 0,53	5,88 \pm 0,34	7,15 \pm 0,49	6,70 \pm 0,41	5,81 \pm 1,24

*- statistički značajna razlika u odnosu na grupu ivermektin 1,2 mg/kg.

Kombinacije ivermektina sa verapamilom i diltiazemom, inhibitorima citohroma P-450, nisu značajno promenile koncentraciju enzima u odnosu na primenu isključivo ivermektina, ali su vrednosti više od kontrolnih. Kombinacija ivermektina sa verapamilom rezultirala je koncentracijom od $6,57 \pm 1,17$ ng/ml, dok je kod kombinacije sa diltiazemom zabeleženo $6,83 \pm 1,17$ ng/ml. Kombinacija ivermektina sa azitromicinom i klaritromicinom rezultirala je povećanjem koncentracija citohroma P-450. Azitromicin je povećao koncentraciju na $6,99 \pm 1,25$ ng/ml, dok je najviše povećanje zabeleženo sa klaritromicinom ($7,44 \pm 1,25$ ng/ml). Međutim, sve ove vrednosti su bile niže od koncentracije citohroma koja je zabeležena posle primene samo ivermektina.

Tabela 20. Srednje vrednosti (\pm SE) koncentracije citohroma P-450 kod pacova nakon primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina zajedno sa ivermektinom.

Parametar (ng/ml)	Kontrola (n=6)	Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Verapamil 1,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)	Azitromicin 3,6mg/kg + Ivermektin 1,2mg/kg (n=6)	Klaritromicin 7,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg/kg (n=6)
Citohrom P-450	6,05 \pm 0,16	8,11 \pm 0,43* p=0,0214	6,57 \pm 1,17	6,83 \pm 1,17	6,99 \pm 1,25	7,44 \pm 1,25

*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

5.3.4. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom za ispitivanje verapamila, diltiazem, azitromicina i klaritromicin u kombinaciji sa ivermektinom u serumu i moždanom tkivu pacova

Ispitivanje uticaja ivermektina na koncentracije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u plazmi i moždanom tkivu prikazano je u tabeli 21. Kada je verapamil (1,0 mg/kg) davan zajedno sa ivermektinom, koncentracija u plazmi mu je iznosila 0,072 \pm 0,020 μ g/L, što predstavlja blagi pad u poređenju sa samostalnom primenom 0,085 \pm 0,022 μ g/L. Međutim, kombinovana primena sa ivermektinom dovela je do signifikantnog povećanja koncentracije verapamila u mozgu na 1,450 \pm 0,300 μ g/kg u poređenju sa samostalnim verapamilom (0,645 \pm 0,109 μ g/kg; p=0,0303).

Posle kombinovane primene diltiazema sa ivermektinom, koncentracija diltiazema u plazmi nesigifikantno je porasla na 0,042 \pm 0,005 μ g/L u odnosu na samostalno primenjen diltiazem (0,026 \pm 0,009 μ g/L). Koncentracija diltiazema u mozgu nakon kombinacije sa ivermektinom bila je 2,102 \pm 0,331 μ g/kg, što je signifikantno povećanje u poređenju sa samostalnom primenom 0,547 \pm 0,110 μ g/kg (p=0,0012).

Azitromicin (3,6 mg/kg) je u kombinaciji sa ivermektinom u plazmi dostigao koncentraciju od 17,728 \pm 2,416 μ g/L, što je nesigifikantno više u poređenju sa samostalnom primenom azitromicina (13,98 \pm 1,759 μ g/L). Vrlo slično, kombinovana primena sa ivermektinom rezultirala je koncentracijom azitromicina u mozgu od 157,113 \pm 17,585 μ g/kg, što je značajno više od samostalne primene (115,09 \pm 16,573 μ g/kg).

Tabela 21. Srednje vrednosti (\pm SE, n=6) koncentracije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina danih u kombinaciji sa ivermektinom i samostalno, u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Parametar	Verapamil 1,0 mg/kg+ Ivermektin 1,2 mg/kg	Diltiazem 2,5 mg/kg+ Ivermektin 1,2 mg/kg	Azitromicin 3,6 mg/kg+ Ivermektin 1,2 mg/kg	Klaritromicin 7,0 mg/kg+ Ivermektin 1,2 mg/kg
Koncentracija lekova u plazmi (μ g/L)	0,072 \pm 0,020	0,042 \pm 0,005	17,728 \pm 2,416	2,067 \pm 0,696
Koncentracija lekova u mozgu (μ g/kg)	1,450 \pm 0,300* p=0,0303	2,102 \pm 0,331** p=0,0012	157,113 \pm 17,585	2,003 \pm 0,324* p=0,0114
	Verapamil 1 mg/kg	Diltiazem 2,5 mg/kg	Azitromicin 3,6mg/kg	Klaritromicin 7mg/kg
Koncentracija lekova u plazmi (μ g/L)	0,085 \pm 0,022	0,026 \pm 0,009	13,988 \pm 1,759	1,092 \pm 0,184
Koncentracija lekova u mozgu (μ g/kg)	0,645 \pm 0,109	0,547 \pm 0,110	115,09 \pm 16,573	5,525 \pm 1,093

+ - statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju leka zabeležena bez ivermektina.

Koncentracija klaritromicina u plazmi dostigla je 2,067 \pm 0,696 μ g/L posle kombinovane primene sa ivermektinom, što je u poređenju sa samostalnom primenom dvostruko viša koncentracija

(1,092±0,184 µg/L). Međutim, u mozgu je koncentracija klaritromicina bila signifikantno niža (2,003±0,324 µg/kg) u poređenju sa koncentracijom koju je proizvela samostalna primena (5,525±1,093 µg/kg; p=0,0114).

Ovi rezultati imaju značajnu kliničku vrednost i ukazuju da kombinacije sa ivermektinom kod na CNS mogu zahtevati prilagođavanje doza kako bi se izbegli neželjeni efekti. Na primer, povećana akumulacija verapamila i diltiazema može uticati na srčanu funkciju, dok povećanje makrolida u mozgu može izazvati neurotoksične efekte.

Rezultati iz tabele 21 pokazuju da kombinacija ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom značajno utiče koncentracije koje ovi lekovi dostižu u plazmi i moždanom tkivu.

5.3.5. Tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom za ispitivanje koncentracije ivermektina davanog u kombinaciji sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Ispitivanje koncentracija ivermektina nakon primene samostalno i u kombinaciji sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom kod pacova pokazalo je značajne promene u koncentraciji leka u plazmi i moždanom tkivu (Tabela 22). Rezultati ukazuju da istovremena primena ovih lekova značajno menja koncentracije ivermektina u plazmi i tkivu mozga.

Posle samostalne primene ivermektina u dozi od 1,2 mg/kg, zabeležena je koncentracija u plazmi od 32,717±4,671 µg/L, dok je koncentracija u moždanom tkivu iznosila 3,783±0,930 µg/kg. Kombinacija ivermektina sa verapamilom (1,0 mg/kg) nije značajno promenila koncentraciju leka u plazmi (34,605±4,736 µg/L), ali je dovela do statistički značajnog povećanja koncentracije ivermektina u mozgu (6,63±0,775 µg/kg, p=0,0399). Ovaj rezultat ukazuje na potencijalnu inhibiciju P-gp, što omogućava veći prolazak ivermektina kroz KMB.

Kombinacija ivermektina sa diltiazemom (2,5 mg/kg) rezultirala je značajnim povećanjem koncentracije ivermektina u plazmi (52,285±6,515 µg/L, p=0,0347) i mozgu (14,115±1,677 µg/kg, p=0,0003). Ovi rezultati sugerišu sinergistički efekat diltiazema, koji može biti posledica inhibicije metaboličkih enzima (poput citohroma P450) i transportnih proteina uključenih u kinetiku ivermektina.

Primena azitromicina (3,6 mg/kg) u kombinaciji sa ivermektinom nije značajnije uticala na koncentraciju leka u plazmi (31,223± 5,484 µg/L), ali je dovela do povećanja njegove koncentracije u mozgu (8,418±1,035 µg/kg, p=0,0075). Slično tome, klaritromicin (7,0 mg/kg) u kombinaciji sa ivermektinom doveo je do značajnog povećanja koncentracije leka u mozgu (7,113±0,775 µg/kg, p 0,0202), dok je koncentracija ivermektina u plazmi čak i opala na 21,302±3,131 µg/L.

Tabela 22. Srednje vrednosti (± SE, n=6) koncentracije ivermektina davanog u kombinaciji sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, u plazmi i moždanom tkivu pacova.

Parametar	Ivermektin 1,2 mg/kg	Ivermektin 1,2 mg/kg + Verapamil 1,0 mg/kg	Ivermektin 1,2 mg/kg + Diltiazem 2,5mg/kg	Ivermektin 1,2 mg/kg + Azitromicin 3,6 mg/kg	Ivermektin 1,2 mg/kg + Klaritromicin 7,0mg/kg
Koncentracija ivermektina u plazmi (µg/L)	32,717±4,671	34,605±4,736	52,285±6,515* p=0,0347	31,223±5,484	21,302±3,131
Koncentracija ivermektina u mozgu (µg/kg)	3,783±0,930	6,63±0,775* p=0,0399	14,115±1,677*** p=0,0003	8,418±1,035** p=0,0075	7,113±0,775* p=0,0202

*- statistički značajna razlika u odnosu na grupu ivermektin 1,2 mg/kg.

5.3.6. Oksidativni stres

U okviru treće faze istraživanja, analizirani su efekti kombinovane primene ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom na parametre oksidativnog stresa kod pacova, uključujući MDA, GSH, TOS, TAS i OSI (Tabela 23). Rezultati pokazuju značajne varijacije među parametrima, zavisno od primenjene kombinacije lekova, čime se naglašava potencijalna interakcija ovih lekova s ivermektinom u smislu oksidativnog statusa organizma.

Tabela 23. Srednje vrednosti (\pm SE) praćenih parametara oksidativnog stresa kod pacova nakon primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina zajedno sa ivermektinom.

Parametar	Jedinica	Ivermektin 1,2 mg/kg	Verapamil 1,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg (n=6)	Diltiazem 2,5 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg (n=6)	Azitromicin 3,6 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg (n=6)	Klaritromicin 7,0 mg/kg + Ivermektin 1,2 mg (n=6)
MDA	$\mu\text{mol/gHb}$	1,140 \pm 0,095	0,853 \pm 0,030	0,882 \pm 0,037	0,948 \pm 0,060	1,063 \pm 0,129
GSH	$\mu\text{mol/gHb}$	2,137 \pm 0,144	2,818 \pm 0,099	2,863 \pm 0,148* p=0,0429	2,430 \pm 0,202	2,415 \pm 0,230
TOS	mmol	3,167 \pm 0,193	3,402 \pm 0,078	3,173 \pm 0,082	3,115 \pm 0,051	3,508 \pm 0,065
TAS	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L	1,438 \pm 0,027	1,353 \pm 0,049	1,410 \pm 0,046	1,455 \pm 0,022	1,382 \pm 0,037
OSI	TOS/TAC odnos	2,203 \pm 0,135	2,537 \pm 0,130	2,267 \pm 0,106	2,147 \pm 0,053	2,550 \pm 0,082

*- statistički značajna razlika u odnosu na Ivermektin 1,2 mg/kg

5.3.6.1. Malondialdehid (MDA)

Nalaz MDA, kao pokazatelj lipidne peroksidacije, ukazuju na značajno smanjenje kod kombinacije verapamila i ivermektina (0,853 \pm 0,030 $\mu\text{mol/gHb}$) u poređenju sa tretmanom samo ivermektinom (1,140 \pm 0,095 $\mu\text{mol/gHb}$). Ovaj nalaz može sugerisati protektivni efekat verapamila na oksidativnu štetu lipida. Kombinacije ivermektina s diltiazemom (0,882 \pm 0,037 $\mu\text{mol/gHb}$) i azitromicinom (0,948 \pm 0,060 $\mu\text{mol/gHb}$) takođe pokazuju niže vrednosti MDA, ali ne tako izraženo kao verapamil.

5.3.6.2. Glutation (GSH)

GSH kao ključni antioksidant, pokazao je statistički značajno povećanje u grupi koja je tretirana kombinacijom diltiazema i ivermektina (2,863 \pm 0,148 $\mu\text{mol/gHb}$) u poređenju sa samostalnom primenom ivermektina (2,137 \pm 0,144 $\mu\text{mol/gHb}$, p=0,0429), što može ukazivati na povećani antioksidativni kapacitet pri ovoj kombinaciji. Kombinacija s verapamilom takođe pokazuje povišene vrednosti GSH (2,818 \pm 0,099 $\mu\text{mol/gHb}$), dok su vrednosti GSH kod kombinacija s azitromicinom (2,430 \pm 0,202 $\mu\text{mol/gHb}$) i klaritromicinom (2,415 \pm 0,230 $\mu\text{mol/gHb}$) bile slične vrednostima zabeleženim kod pacova tretiranih samo ivermektinom.

5.3.6.3. Ukupni oksidativni status (TOS)

TOS je pokazao je blago povišene vrednosti kod kombinacije klaritromicina i ivermektina (3,508 \pm 0,065 mmol) u poređenju sa ostalim tretmanima, što može ukazivati na pojačan oksidativni potencijal pri ovoj kombinaciji. Vrednosti TOS kod drugih kombinacija nisu ispoljile značajna odstupanja u odnosu na ivermektin (3,167 \pm 0,193 mmol), što sugerise da verapamil, diltiazem i azitromicin ne izazivaju značajan porast oksidativnog potencijala kada se kombinuju sa ivermektinom.

5.3.6.4. Ukupni antioksidativni status (TAS)

Vrednost TAS bila je vrlo sličan među grupama, bez statistički značajnih razlika, sa prosečnim vrednostima u rasponu od $1,353 \pm 0,049$ do $1,455 \pm 0,022$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L. Ova stabilnost TAS-a ukazuje da kombinacije tetsiranih lekova s ivermektinom nisu značajno uticale na ukupni antioksidativni kapacitet organizma.

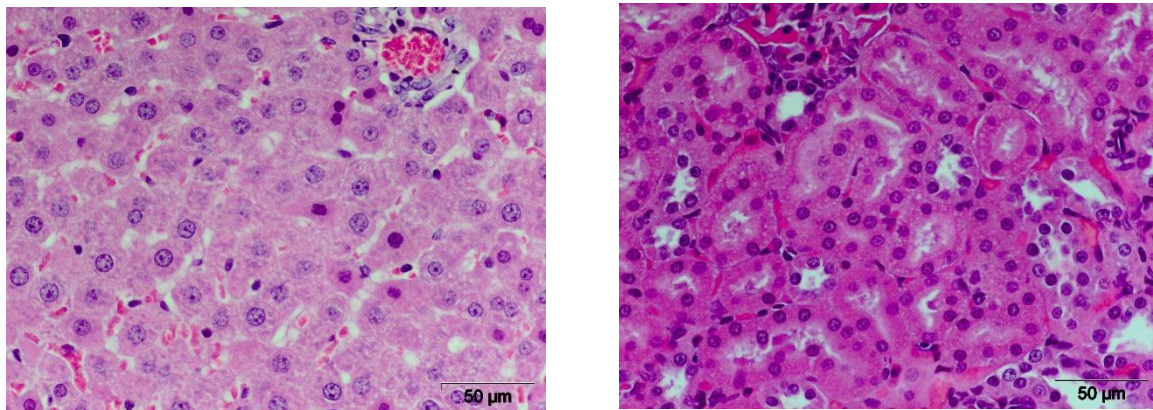
5.3.6.5. Oksidativni indeks stresa (OSI)

OSI kao pokazatelj ukupnog oksidativnog stresa, pokazao je najvišu vrednost kod kombinacije klaritromicina i ivermektina ($2,550 \pm 0,082$), što se može tumačiti kao pojačano oksidativno opterećenje u ovoj grupi. Kombinacije verapamila ($2,537 \pm 0,130$) i diltiazema ($2,267 \pm 0,106$) s ivermektinom takođe su pokazale blago povišene vrednosti OSI, dok je kombinacija s azitromicinom imala najniže vrednosti OSI ($2,147 \pm 0,053$), sugerišući manji oksidativni stres pri ovoj kombinaciji.

Kombinacija verapamila i diltiazema sa ivermektinom pokazuje potencijal za smanjenje lipidne peroksidacije i povećanje antioksidativnog kapaciteta kroz nivoe GSH, dok kombinacija klaritromicina ukazuje na povećan oksidativni stres. Kombinacija s azitromicinom ima najmanji uticaj na parametre oksidativnog stresa, što može biti korisno pri izboru terapije gde je oksidativno opterećenje klinički značajno.

5.3.7. Makroskopska i histopatološka analiza tkiva pacova

Makroskopske promene nisu zabeležene kod tretiranih pacova, ali kombinovana primena ivermektina s verapamilom izazvala je značajne histopatološke promene. U jetri, kod polovine pacova uočen je fokalni mononuklearni infiltrat a intracelularni edem kod dva pacova. U bubrezima je intersticijalno krvavljenje bilo prisutno kod pet pacova, dok su pojedinačni slučajevi skleroze glomerula i intersticijalnog nefritisa uočeni kod po jednog pacova; dilatacija tubula i intracelularni edem zabeleženi su kod dva pacova. U mozgu većine pacova (5/6) uočeno je fokalno krvavljenje, dok je jedan pacov imao i edem. U testisima je degeneracija germinativnog epitela semenih kanalića primećena kod dva pacova.



Slika 13. a) Intracelularni edem i vakuolarna degeneracija hepatocita pacova tretiranih kombinacijom diltiazem i ivermektin; **b)** Intracelularni edem ćelija bubrega.

Kombinacija diltiazema i ivermektina dovela je do fokalne mononuklearne infiltracije i intracelularnog edema u jetri većine pacova (5/6), dok je kod jednog pacova primećen intracelularni edem i vakuolarna degeneracija hepatocita (Slika 13a). U bubrezima su svi pacovi imali intracelularni edem (Slika 13b) i intersticijalno krvavljenje, dok su skleroza glomerula i degeneracija tubula sporadično zabeleženi (2/6). Fokalno krvavljenje u mozgu nađeno je kod polovine pacova, dok su edem i gliozu uočeni samo kod jedne životinje. Degeneracija germinativnog epitela semenih kanalića i epididimisa primećena je kod polovine tretiranih pacova.

Tretman kombinacijom azitromicina i ivermektina izazvao je fokalnu mononuklearnu infiltraciju i intracelularni edem u jetri kod 4/6 pacova, dok su intracelularni edem i vakuolarna degeneracija (na periferiji lobusa) bili prisutni kod polovine tretiranih životinja. U bubrezima je dominirao intracelularni edem, dok su dilatacija tubula i intersticijalno krvavljenje primećeni kod samo manjeg broja životinja. Sve tretirana životinja (6/6) imale su fokalna krvavljenja u meningama mozga. Promene u testisima nisu zabeležene.

Kod pacova tretiranih kombinacijom klaritromicina i ivermektina, intracelularni edem dominirao je u jetri, uz fokalnu mononuklearnu infiltraciju kod tri pacova, dok su intracelularni edem i vakuolarna degeneracija bili prisutni samo kod jedne životinje. U bubrezima je uočeno intersticijalno krvavljenje kod 4/6 pacova, a skleroza glomerula i intracelularni edem kod po dva pacova. U mozgu su dve životinje imale fokalno krvavljenje, a kod jedne je zabeležen edem. Promene u testisima nisu zabeležene.

6. DISKUSIJA

Ovakvih istraživanja nije bilo u dostupnoj literaturi jer je ivermektin isključivo indikovano za lečenje parazitskih infekcija, kada se primenjuje jednokratno u dozi od 0,2 mg/kg telesne mase. U skladu sa ovakvim doziranjem i režimom doziranja bila su urađena predkliničke i kliničke studije bezbednosti. Takođe, mi smo ispitali interakciju ivermekina, primenjenog istovremeno sa inhibitorima enzima P-450 i inhibitorima P-gp transportera, lekovima kalcijumskim antagonistima (verapamilom i diltiazemom) i makrolidnim antibioticima (azitromicinom i klaritromicinom). Ni ovakve potencijalne interakcije nisu bile opisane, jer petodnevna primena ivermektina u visokim dozama nije bila primenjivana u praksi. Dobijeni rezultati istraživanja su ukazali na značajne farmakodinamske i farmakokinetičke interakcije koje utiču na hematološke, biohemijske i patohistološke poremećaje kod pacova, kao i parametre oksidativnog stresa, što omogućava bolje razumevanje mehanizama potenciranja toksičnosti ivermektina u kombinovanoj terapiji.

U prvoj fazi ispitivanja testirali smo efekte visokih oralnih doza ivermektina danih pacovima tokom 5 dana. Najčešće primenjivana, preporučena antiparazitska doza ivermektina u humanoj i veterinarskoj medicini iznosi 0,2 mg/kg telesne mase (Brunton i Knollmann, 2011; Riviere i Papich, 2018). Međutim, na osnovu podataka iz Oregon poison centra (Temple i sar., 2021), opredelili smo se da primenimo oralne doze ivermektina od 0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg, što je ekvivalentno dozi 3, 6, 12 i 24 puta većoj od terapijske. Tokom petodnevnog tretmana ovim dozama, nisu primećeni klinički znaci i simptomi trovanja. Prema dostupnim podacima, oralne LD₅₀ vrednosti ivermektina kod pacova kreću se od 42,8 do 52,8 mg/kg (Merck & co., 1979) i 10 do 50 mg/kg (Lankas i Gordon, 1989). Naši rezultati pokazuju da su pacovi koji su dobijali 3, 6, 12 ili 24 puta veću dozu od terapijske tokom 5 dana, bili izloženi kumulativnoj dozi ivermektina koja je približno ¼ i ½ LD₅₀, pri čemu nisu pokazali kliničke simptome trovanja. Rota-rod test, takođe nije ukazao na poremećaj integriteta CNS-a, što ukazuje da ove visoke peroralne doze ivermektina ne ispoljavaju kliničke simptome toksičnosti. Sa druge strane Trailović i saradnici (2011) su pokazali da ivermektin remeti motornu koordinaciju kada se primeni intravenski i to sa ED₅₀ od 2,52 mg/kg posle 3 minuta, odnosno 4,21 mg/kg telesne mase, mereno posle 30 minuta. Očigledno je da posle peroralne primene čak i visokih doza, ivermektin ne ispoljava vidljiva neurotoksična dejstva zbog nižih koncentracija koje dostiže u organizmu, u odnosu na intravensku aplikaciju. Ovde treba uzeti u obzir i aktivnost P-gp pumpe u enterocitima, koja ispumpava ivermektin nazad u lumen creva i tako mu limitira koncentracije u organizmu (Ballent i sar., 2006).

Hematološke analize nisu otkrile značajne promene u ukupnom broju leukocita, dok su vrednosti hematokrita i hemoglobina ostale nepromenjene u odnosu na kontrolnu grupu, izuzev kod pacova tretiranih dozom od 0,6 mg/kg, kod kojih je koncentracija hemoglobina bila značajno viša. S druge strane, kod ovih pacova tretiranih dozom ivermektina od 0,6 mg/kg zabeleženo je značajno povećanje RBC u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,004$), kao i povećanje koncentracije HGB ($p=0,0072$). Ove promene mogu ukazati na povećanu produkciju eritrocita ili odgovor na hipoksiju usled primene ivermektina. Takođe, kod pacova tretiranih dozom od 0,6 mg/kg, vrednosti MCV i MCH su bile značajno niže u poređenju sa kontrolom ($p=0,0004$ i $p=0,0015$), što može ukazati na pojavu mikrocitoze - smanjenje veličine eritrocita i smanjen sadržaj hemoglobina po eritocitu, potencijalno povezane sa primenom ivermektina, ali ovaj efekat nije zavisio od doze (nije bio dozno-zavisan), odnosno nije se razlikovao između grupa u odnosu na dozu ivermektina koju su pacovi primili tokom 5 dana (Tabela 6). Kako smo gore naveli kod svih testiranih doza ivermektina zabeleženo je smanjenje vrednosti MCV i MCH, dok je kod grupa tretiranih sa 0,6 mg/kg, 1,2 mg/kg i 2,4 mg/kg vrednost MCHC bila značajno povećana ($p=0,0030$, $p=0,0038$, $p=0,0458$). Međutim, sve zabeležene vrednosti bile su u granicama fizioloških (Patel i sar., 2024) i ova pojava se može smatrati posledicom efikasnog kompenzatornog mehanizma, kao odgovor na blago smanjenje ukupnog sadržaja hemoglobina u eritrocitima.

Analiza biohemijskih parametara pokazala je značajno (skoro dvostruko) povećanje nivoa ALT, koji nije zavisio od doze i dozno-zavisno, signifikantno povećanje nivoa γ -GT (Tabela 7). Oba

povećanja su prevazilazila fiziološke vrednosti za ovaj soj i uzrast pacova (Loeb. i Quimby, 1999). Povećanje vrednosti ova dva enzima, koje ukazuje na oštećenje tkiva jetre, čak i pri najnižoj ispitivanoj dozi ivermektina, saglasno je sa histopatološkim promenama u jetri koje su zabeležene. Naši rezultati su u skladu sa morfološkim i funkcionalnim poremećajima jetre (hepatitis, oštećenje hepatocita,olestaza, povećani nivoi ALT i/ili AST, abnormalni testovi funkcije jetre), zabeleženim kod ljudi koji su tretirani ivermektinom protiv SARS-CoV-2 (Oscanoa i sar., 2022). Međutim, naši rezultati nisu u skladu sa istraživanjem Dong i saradnika (2020), gde 14-dnevna intraperitonealna primena ivermektina u dozama od 100 do 380 mg/kg nije dovela do promena u vrednostima jetrinih enzima. Ivermektin je bio u obliku mikroemulzije, pa to svakako treba uzeti u obzir. Nasuprot tome, kada su Wistar pacovi tretirani intraperitonealno 4 puta nedeljno tokom 21 dana u dozama od 0,4 i 4,0 mg/kg telesne mase, zabeleženo je povećanje vrednosti ALT, γ -GT i AST (Utu-Baku, 2009). Ovakvi rezultati su u skladu sa našim nalazima.

Ispitivanje koncentracija citohroma P-450 kod pacova tretiranih rastućim dozama ivermektina, koje su primenjivane kod ljudi tokom pandemije COVID-19, bilo je od ključnog značaja za razumevanje farmakokinetike ovog leka. Ivermektin se metaboliše pretežno putem mikrozomalnih enzima jetre, pri čemu je izoforma citohroma P-450 3A4, odgovorna za biotransformaciju leka (Rendic, 2021). Naši rezultati pokazuju da doze ivermektina koje su 3, 6 i 12 puta veće od terapijskih doza dovode do povećanja koncentracije citohroma P-450 3A4 u plazmi (Slika 9). Međutim, doza koja je 24 puta veća od terapijske nije izazvala nikakvo povećanje koncentracije ovog enzima. Poznato je da je ivermektin i supstrat i inhibitor humanih P-450 enzima (Rendic, 2021). Na osnovu naših rezultata, očigledno je da veoma visoke doze ivermektina ne dovode do povećanja koncentracije citohroma P-450, već koncentracija enzima ostaje na kontrolnom nivou. Ovo izostajanje povećanja enzimske aktivnosti može da bude jedan je od faktora koji dovode do kumulacije ivermektina u plazmi i tkivima tretiranih životinja.

U našem ispitivanju pratili smo i koncentracije ivermektina u plazmi i tkivu mozga tretiranih pacova. Koncentracije ivermektina zabeležene u plazmi pacova tretiranih rastućim dozama 5 dana bile su proporcionalne primenjenim dozama. Dvostruko povećanje doze rezultiralo je dvostrukim povećanjem koncentracije leka u plazmi, dok je najviša ispitivana doza pokazala izuzetak, pri čemu je koncentracija u plazmi bila gotovo tri puta viša u poređenju sa prethodnim nivoom doze. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa nalazima da najviša ispitivana doza ne povećava koncentraciju P-450 3A4 enzima, što direktno može da se dovede u vezu sa značajnijim porastom koncentracije ivermektina u plazmi. Pored toga, iako su ispitivane doze 3, 6, 12 i 24 puta više od terapijske antiparazitske doze, maksimalne koncentracije u plazmi koje smo zabeležili bile su daleko niže od *in vitro* IC₅₀ vrednosti potrebne za inhibiciju SARS-Co-2 virusa. Caly i saradnici (2020) su pokazali da ivermektin inhibira replikaciju SARS-CoV-2 *in vitro*, smanjujući virusnu RNK za oko 5000 puta u roku od 48 sati pri koncentraciji od 5 μ M. IC₅₀ vrednost iznosila je 1750 μ g/L, dok je u našem ispitivanju zabeležena maksimalna koncentracija od $165,317 \pm 46,450$ μ g/L, 24 sata nakon poslednje primene leka. Dobijeni rezultati ukazuju da postizanje antivirusnih koncentracija ivermektina u plazmi, čak i pri dozama koje su 24 puta veće od terapijskih, nije moguće, jer je koncentracija leka zabeležena 24h posle poslednjeg davanja ivermektina i dalje 10 puta niža od IC₅₀ za SARS-CoV-2. Takođe, primena ovako visokih doza nosi i visok rizik od ozbiljnih oštećenja organizma pacijenta. Naši rezultati su u skladu sa studijom Buonfrate i saradnika (2022), koji su koristili oralni ivermektin u dozama od 0,6 i 1,2 mg/kg kod ljudi tokom petodnevno tretmana SARS-CoV-2 infekcije. Ozbiljna neželjena dejstva (u stvari se radi o toksičnosti jer su doze bile više od odobrenih) koja su primećena, podrazumevala su oštećenje vida, bol u stomaku, dijareju, mučninu i povraćanje, artralgiiju, vrtoglavicu, glavobolju i paresteziju. Međutim, smanjenje log₁₀ virusnog opterećenja nije se razlikovalo kod netretiranih osoba i onih lečenih ivermektinom.

Naše ispitivanje pokazalo je da su koncentracije ivermektina u mozgu pacova bile proporcionalne primenjenim dozama, sa povećanjem koje je bilo direktno povezano sa veličinom doze. Kao i u plazmi, udvostručavanje doze rezultiralo je dvostrukim povećanjem koncentracije ivermektina u mozgu, osim kod najviše testirane doze, koja je proizvela petostruko povećanje koncentracije u poređenju sa prethodnom dozom (Tabela 9). Ova visoka koncentracija ivermektina u

mozgu posledica je najverovatnije nekoliko faktora. Kao prvo, visoke koncentracije u plazmi, sa jedne strane, ali može biti uslovljena i zasićenjem enzimskog P-450 sistema kao i odsustvom povećanja njegove aktivnosti (koju smo zabeležili kod nižih doza). Sa druge strane, zasićenje P-gp transportera na KMB je potencijalni uzrok tako velikog povećanja koncentracije ivermektina u mozgu (Rendic, 2021). Iako koncentracija od $33,033 \pm 6,313 \mu\text{g/kg}$ ne izaziva kliničke simptome, ona oštećuje moždano tkivo. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima Geyer i saradnika (2009) koji su pokazali da terapijska doza ivermektina kod miševa, 24 sata nakon oralne primene, dovodi do koncentracije od $2 \mu\text{g/kg}$ u mozgu, dok kod miševa sa deficitom MDR1 transportera ta koncentracija iznosi $127 \mu\text{g/kg}$. Za poređenje je relevantan slučaj pacijenta koji je primio oralnu i s.c. dozu od 12 mg ivermektina radi lečenja infekcije *Strongyloides stercoralis*. Iako je infekcija bila značajno suzbijena, pacijent je upao u komu i preminuo. Posthumna analiza pokazala je da je koncentracija ivermektina u njegovom mozgu iznosila $30 \mu\text{g/kg}$, a autori izveštaja sugerišu da je ivermektin bio glavni uzrok neurotoksičnosti, pošto su isključeni drugi potencijalni uzroci (van Westerlo i sar., 2014). Ova koncentracija je niža od one koju smo mi detektovali, što ukazuje na mogućnost individualne osetljivosti na neurotoksične efekte ivermektina.

Primena ivermektina u visokim dozama izaziva značajne oksidativne promene kod pacova, evidentirane povećanim nivoima MDA i TOS, kao i smanjenim vrednostima GSH i TAS. Povećanje nivoa MDA kod pacova tretiranih ivermektinom, posebno u dozama od $1,2 \text{ mg/kg}$ i $2,4 \text{ mg/kg}$, ukazuje na pojačanu lipidnu peroksidaciju. Ove vrednosti sugerišu da ivermektin može indukovati stres koji izaziva ROS, što vodi do lipidne peroksidacije i oštećenja ćelijskih struktura. Smanjeni nivoi GSH kod pacova koji su primali ivermektin ukazuju na oslabljenu antioksidativnu zaštitu. GSH igra ključnu ulogu u neutralizaciji ROS, a njegovo smanjenje može povećati „ranjivost“ ćelija na oksidativni stres, što može doprineti razvoju hroničnih bolesti. Takođe, zabeleženo smanjenje TAS kod pacova tretiranih ivermektinom sugeriše smanjenu sposobnost organizma da se brani od oksidativnog stresa. Ovi nalazi naglašavaju potrebu za dodatnim istraživanjima kako bi se procenili potencijalni dugoročni efekti ivermektina na zdravlje. Povećani TOS i OSI kod pacova tretiranih ivermektinom ukazuju na značajan rizik od oksidativne štete. Ovi rezultati ukazuju da primena viših doza ivermektina može doprineti razvoju različitih patoloških stanja, uključujući čak i oštećenja organa ili hronične procese posle dugotrajnije primene.

Makroskopski pregled unutrašnjih organa tretiranih pacova nije pokazao bilo kakve promene koje bi se dovele u vezu sa dejstvom ivermektina. Međutim, histopatološkom analizom utvrđene su promene u tkivu jetre kod većine tretiranih pacova. Fokalna mononuklearna infiltracija tkiva jetre uočena je kod pacova svih tretiranih grupa, ali intracelularni edem i vakuolna degeneracija hepatocita su bili češći kod životinja tretiranih sa dve najviše doze ivermektina ($2,4$ i $4,8 \text{ mg/kg}$). Fokalna nekroza hepatocita detektovana je samo kod pacova tretiranih sa $4,8 \text{ mg/kg}$ ivermektina. Takođe, zabeležene su histopatološke promene u bubrezima, mada nije bilo povišene koncentracije kreatinina i uree u krvi. Prethodna istraživanja ukazuju da ivermektin može izazvati glomerularne i tubularne disfunkcije kod ljudi, što je potvrđeno pet dana nakon tretmana protiv onhocerkoze (Burchard i sar., 1999). Slične promene u bubrezima kunića zabeležili su GabAllh i saradnici (2017), koji su primetili kongestiju renalnih krvnih sudova kunića tretiranih jednom nedeljno sa $0,8 \text{ mg/kg}$ ivermektina tokom 8 nedelja. Ove promene uključivale su tešku degeneraciju renalnih tubula, vakuolaciju citoplazme ćelija, nekrozu i deskvamaciju zahvaćenog epitela. Najviša tetsirana doza ivermektina u našem ispitivanju izazvala je degenerativne promene u tkivu testisa, što se podudara sa nalazima GabAllh i saradnika (2017) koji su slične promene posle davanja ivermektina opisali u testisima kunića. Histopatološke promene u mozgu, uključujući fokalno i perivaskularno krvarenje, primećene su samo kod pacova tretiranih sa $4,8 \text{ mg/kg}$ ivermektina, što je takođe opisano kod kunića nakon primene terapijskih i dvostrukih terapijskih doza, ali primenjivanih duži vremenski period, tokom 8 nedelja (GabAllh i sar., 2017).

Kako smo ranije opisali, istovremeno sa prvom fazom ispitivanja, u kojoj smo testirali efekte visokih doza ivermektina primenjivanih kod ljudi tokom pandemije SARS-Co-2 virusa, u drugoj fazi testirali smo dejstva terapijskih doza nekih lekova za koje je postojala mogućnost da mogu ispoljiti interakciju sa ivermektinom. Rezultati druge faze pokazali su da tretman terapijskim dozama

verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina tokom 10 dana nije izazvao promene u opštem zdravstvenom stanju tretiranih pacova. Telesna masa pacova beležila je konzistentan porast u svim grupama i na kraju ispitivanja pacovi su ispoljili prirast koji je bio u granicama fizioloških za mužjake Wistar pacova te starosti (Nistiari i sar., 2012). Ponašanje i klinički status jedinki takođe su ostali u granicama fizioloških normi, bez vidljivih neuroloških ili motoričkih poremećaja. Rota-rod test i dodatne procene neurološke funkcije potvrdile su da ovi lekovi nisu izazvali poremećaje u funkcijama centralnog nervnog sistema.

Analiza hematoloških parametara ukazala je na neke specifične efekte ispitivanih lekova na fiziološke procese u organizmu pacova (Tabela 12). Blago nesignifikantno povećanje broja leukocita zabeleženo nakon tretmana verapamilom i diltiazemom može ukazati na slabe proinflatorne efekte ovih lekova, potencijalno povezane sa njihovim farmakološkim dejstvima na ćelijske transportne i signalne puteve (Kalonija i sar., 2011). Suprotno tome, azitromicin i klaritromicin nisu izazvali promene broja leukocita što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Međutim sve navedene vrednosti bile su u fiziološkim granicama za Wistar pacove muškog pola i uzrasta koji je korišćen u ispitivanju (Cramer i sar., 2017; Patel i sar., 2024). Eritrocitni parametri (RBC, HGB i HCT) nisu ukazali da tretman ispitivanim lekovima ispoljava štetno dejstvo i sve dobijene vrednosti su bile u granicama fizioloških (Patel i sar., 2024). Smanjenje MCV kod svih tretiranih grupa može ukazivati na suptilne promene u maturaciji eritrocita ili na pojavu mikroanizocitoze. Ovo bi moglo biti povezano sa interferencijom lekova u metabolizmu gvožđa ili sintezi hemoglobina. Paralelno, sniženje MCH kod verapamila i azitromicina implicira ograničenu sposobnost eritrocita da zadrže optimalnu količinu hemoglobina, što potencijalno može biti posledica farmakodinamičkog uticaja ovih lekova. Farmakodinamičko delovanje verapamila i azitromicina može uticati na eritrocite posredno, kroz njihove ciljne mehanizme delovanja. Verapamil, kao blokator kalcijumskih kanala, može uticati na transport jona u ćelijama, uključujući eritrocite, smanjujući njihovu sposobnost da efikasno preuzimaju gvožđe ili održavaju stabilnost hemoglobina (Suwalsky i sar., 2010). To može dovesti do smanjenja sinteze hemoglobina ili njegove distribucije unutar ćelija. Azitromicin, s druge strane, može izazvati oksidativni stres što je u skladu sa rezultatima smanjenjog TAS i GSH (Tabela 16) ili promeniti mikrousluve u kojima eritrociti funkcionišu, što može ometati sintezu hemoglobina ili povećati njihovu osjetljivost na oštećenja. Međutim, sve ove promene u navedenim parametrima zabeležene u odnosu na kontrolu nisu izašle iz granica fizioloških vrednosti za soj, pol i uzrast pacova koji je tretiran. Sličan nalaz odnosio se i na MCHC, koja je pokazala značajno povećanje u odnosu na kontrolu u svim tretiranim grupama ($p < 0,0001$), sa najvišom vrednošću zabeleženom kod grupe koja je primala verapamil ($355,00 \pm 2,92$ g/l). Ovi rezultati bi mogli da ukažu na povećanu sintezu hemoglobina ili promene u strukturi eritrocita usled farmakoloških efekata ispitivanih lekova. Međutim, povećanje MCHC može biti povezano sa hiperhromijom, koja potencijalno doprinosi rigidnosti eritrocitnih membrana. Povećane vrednosti MCHC, u kombinaciji sa smanjenjem MCV potencijalno može biti povezana sa disfunkcijom u metabolizmu gvožđa ili promenama u stabilnosti eritrocitnih membrana. Ipak, presudno je da su sve dobijene vrednosti MCV i MCHC bile u granicama fizioloških vrednosti a razlike u odnosu na kontrolu mogu da budu uzrokovane i nešto višim vrednostima MCV i nižim vrednostima MCHC zabeleženim kod kontrolnih pacova (blizu fizioloških granica). Sa druge strane, smanjenje MCV uz povećanje MCHC, može biti i artefakt, posledica dejstva antikoagulantna EDTA, koji se primenjuje kao hipertonični rastvor i može izazvati dehidraciju eritrocita sa opisanim posledičnom promenom (eClinPath.com, Cornell University USA, 2024).

Primena verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina, tokom 10 dana nije dovela do promena u hematološkim parametrima tretiranih pacova koje bi mogle da se pripišu dejstvu lekova, ali neka odstupanja od kontrolnih vrednosti mogu ukazati na potrebu detaljnije analize uticaja ovih lekova na hematološke parametre, posebno posle duže primene.

Analiza biohemijskih parametara kod pacova tretiranih verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom pozala je izvesne promene koje bi ukazale na specifične efekte ovih lekova na funkciju jetre, metabolizam lipida i renalnu funkciju (Tabela 13).

Smanjene vrednosti ALT u svim tretiranim grupama sugerise odsustvo značajnog hepatocelularnog oštećenja ($p < 0,0001$). Ovi rezultati mogu reflektovati hepatoprotektivni efekat lekova (Chin i sar., 2005; Xu i sar., 2007) ili odsustvo farmakološki indukovano oksidativnog stresa na hepatocite pri primenjenim dozama. Aktivnost AST pokazala je blage varijacije između tretiranih grupa, pri čemu je azitromicin izazvao povećanje u odnosu na kontrolu, potencijalno ukazujući na prolaznu disfunkciju mitohondrija u hepatocitima ili stres povezan sa metaboličkim opterećenjem jetre. To je u skladu sa rezultatima Xu i saradnika (2024), koji sugerisu da azitromicin izaziva oštećenje jetre kod eksperimentalnih životinja, ali da je ovaj efekat prolaznog karaktera zahvaljujući regenerativnoj sposobnosti hepatocita. Hepatotoksični lekovi inače mogu izazvati oštećenje ćelijskih membrana hepatocita, što dovodi do povećane aktivnosti enzima poput AST (Kumar i sar., 2004). Kod svih primenjenih lekova zabeleženo je smanjenje aktivnosti γ -GT, ali signifikantno samo kod azitromicina ($p = 0,0094$). Međutim, sve vrednosti su bile u granicama fizioloških i pokazuju da nema ozbiljnog oštećenja jetre (Loeb i Quimby, 1999).

Blago, nesignifikantno povećanje nivoa TP zabeleženo je kod svih tretiranih grupa, kao i signifikantni porast nivoa TG ($p < 0,0001$). Međutim i ove vrednosti su bile u granicama fizioloških, a signifikantnost povećanja se može delimično objasniti veličinom kontrolne vrednosti koja ja bila na donjoj fiziološkoj granici (Loeb i Quimby, 1999).

Nivoi kreatinina su bili značajno smanjeni kod svih tretiranih grupa, što može reflektovati povećani klirens kreatinina ili smanjenje mišićne mase usled farmakoloških efekata. Povećanje nivoa uree kod verapamila i diltiazema ($p < 0,0001$) ukazalo je na potencijalno oštećenje renalne funkcije ili povećanu razgradnju proteina. S druge strane, azitromicin i klaritromicin nisu izazvali promene u ovom parametru, što može ukazivati na različite mehanizme eliminacije ovih lekova u poređenju sa blokatorima kalcijumskih kanala.

Dobijeni nalazi ukazuju da ispitivani lekovi ne izazivaju značajnije promene biohemijskih parametara kod pacova, ali su one specifične i svakako bi bilo značajno da se ispita njihova dozna zavisnost i mehanizam nastajanja.

Analiza koncentracija citohroma P-450 kod pacova nakon primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina ukazala je na odsustvo značajnih promena u odnosu na kontrolnu grupu, iako je uočeno blago povećanje koncentracije enzima kod svih tretiranih pacova (Tabela 14). Verapamil i diltiazem primarno deluju kao inhibitori citohroma P-450 (Renton, 1985), ali očigledno u primenjenim terapijskim dozama ne utiču na koncentracije enzima u plazmi.

Analiza koncentracija ispitivanih lekova u plazmi i moždanom tkivu pacova ukazuje na razlike u distribuciji, koje odražavaju njihove farmakokinetičke osobine i sposobnost prolaska kroz KMB (Tabela 15). Verapamil i diltiazem, blokatori kalcijumskih kanala, dostizali su niske koncentracije u plazmi, ali su postigli relativno visoke koncentracije u moždanom tkivu u odnosu na plazmu. Ovakav profil distribucije može biti posledica njihove lipofilnosti, što olakšava prolazak kroz KMB (European Pharmacopoeia, 2014). Sa druge strane, dobar prolazak blokatora kalcijumskih kanala u CNS i postizanje visokih koncentracija, jedan su od preduslova njihove potencijalne primene u lečenju Alchajmerove bolesti, demencije i drugih neurodegenerativnih poremećaja u čijoj je etiologiji značajna uloga kalcijumskih kanala (Alluri i sar., 2023; Popović i sar., 2020).

Azitromicin je dostigao visoke koncentracije u plazmi i moždanom tkivu, što ukazuje na njegovu sposobnost da prolazi KMB u značajnim količinama. Ovaj nalaz je u skladu sa njegovim farmakokinetičkim profilom, koji uključuje efikasnu penetraciju u tkiva i intracelularnu distribuciju (Jaruratanasirikul i sar., 1996). S obzirom na visoke koncentracije u mozgu, azitromicin bi mogao imati značajnu ulogu u terapiji infekcije CNS-a izazvanih osetljivim mikroorganizama ili po najnovijim podacima u cilju postizanja neuroprotektivnog efekta kada je u pitanju tranzitorna fokalna cerebralna ishemija (Amantea i sar., 2019).

Klaritromicin je ispoljio niže koncentracije u plazmi i moždanom tkivu u poređenju sa azitromicinom, što sugerise slabiju penetraciju kroz KMB. Ipak, njegova prisutnost u moždanom tkivu u značajnim nivoima može ukazati na specifične transportne mehanizme ili interakcije sa P-gp, koji očigledno modulira njegovu akumulaciju u CNS-u.

Dobijeni rezultati ukazuju da distribucija lekova između plazme i moždanog tkiva zavisi od njihovih fizičko-hemijskih svojstava, kao i od interakcija sa transportnim sistemima na nivou KMB. Ovi podaci su od ključnog značaja za razumevanje njihove potencijalne neurotoksičnosti ili terapijske efikasnosti, posebno kod lekova poput azitromicina koji dostiže visoke koncentracije u CNS-u.

Analiza parametara oksidativnog stresa ukazala je na promene u redoks homeostazi nakon primene ispitivanih lekova, što reflektuje njihove potencijalne prooksidativne efekte i sposobnost narušavanja ravnoteže između oksidansa i antioksidativnih odbrambenih mehanizama (Tabela 16). Povećanje nivoa MDA, markera lipidne peroksidacije, zabeleženo je kod svih tretiranih grupa, s tim što su diltiazem i verapamil pokazali značajnije povećanje u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati ukazuju da blokatori kalcijumskih kanala mogu izazvati intenzivnu lipidnu peroksidaciju, potencijalno putem interakcije sa mitohondrijalnim funkcijama i povećanja proizvodnje ROS. Smanjenje koncentracije GSH primećeno je kod svih lekova, što ukazuje na iscrpljivanje ključnog intracelularnog antioksidansa usled povećanog oksidativnog opterećenja. Gubitak GSH može imati značajan uticaj na ćelijsku redoks ravnotežu i otpornost prema oksidativnim oštećenjima, posebno u eritrocitima koji su podložni oksidativnim stresorima. TAS je bio značajno smanjen u svim tretiranim grupama ($p < 0,0001$), što odražava redukciju ukupnih antioksidativnih rezervi organizma. Paralelno s tim, povećanje TOS dodatno potvrđuje prooksidativni efekat ispitivanih lekova, sa najvišim vrednostima zabeleženim kod klaritromicina. OSI, kao pokazatelj balansa između TOS i TAS, bio je značajno povećan u svim tretiranim grupama ($p < 0,0001$), što sugerise prevalenciju oksidativnih mehanizama u poređenju s antioksidativnim odbranama. Ovi rezultati ukazuju da svi ispitivani lekovi, u različitom stepenu, doprinose povećanom oksidativnom stresu, pri čemu klaritromicin ispoljava izraženiju prooksidativnu aktivnost.

Dobijeni nalazi su od velikog značaja za razumevanje potencijalnih neželjenih efekata ispitivanih lekova, posebno u kod ponovljene ili dugotrajnije terapije. Povećani oksidativni stres može doprineti razvoju patoloških stanja indukovanih oksidativnim oštećenjima, uključujući oštećenja eritrocita i vaskularnih struktura. Dobijeni rezultati naglašavaju potrebu za opreznom primenom ovih lekova, posebno kod pacijenata koji su u riziku od oksidativnih oštećenja. Dalja istraživanja treba da ispituju potencijalnu primenu antioksidansa ili prilagođavanje doza kako bi se minimizirali ovi štetni efekti.

Rezultati histopatološke analize pokazali su prisustvo izvesnih poremećaja u tkivima jetre i bubrega pacova tretiranih verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, dok su makroskopski pregledi unutrašnjih organa bili bez značajnih nalaza. U grupi tretiranoj verapamilom, promene u jetri uključuju fokalnu infiltraciju mononuklearnim ćelijama, intracelularni edem i vakuolarnu degeneraciju, što sugerise inflamatorni odgovor i metaboličku disfunkciju hepatocita. Ovi nalazi mogu biti povezani sa poremećajem intracelularne homeostaze jona kalcijuma usled inhibicije kalcijumskih kanala. Ističemo da su promene nađene kod manje od polovine tretiranih pacova i da sve navedene promene nisu bile prisutne kod svake tretirane životinja. Inače u literaturi se nalaze brojni podaci o neželjenim dejstvima verapamila na funkciju i tkivo jetre i oni su dobro poznati (Guarascio i sar., 1984; Kumar i Colley, 1994). U bubrezima je dominirala skleroza glomerula i dilatacija tubula, uz prisustvo intracelularnog edema i intersticijalnog krvarenja, što ukazuje na moguće oštećenje vaskularnih struktura i tubularnih ćelija, verovatno kao posledica smanjene renalne perfuzije ili direktne citotoksičnosti. Poznato je da neželjeno dejstvo verapamila može da bude renalna insuficijencija i to je navedeno u sažecima karakteristike ovog leka (ALIMS, 2024).

Kod pacova tretiranih diltiazemom, najčešći nalaz u jetri bio je vakuolarna degeneracija hepatocita, uz povremenu pojavu nekroze, što ukazuje na umerena oštećenja i disfunkciju ćelijskih organela. Dobro je poznato da duža terapijska primena diltiazema može dovesti do povećanja vrednosti enzima jetre kao znaka akutnog oštećenja njene funkcije. Preporučuje se da se kod primene diltiazema parametri funkcije jetre proveravaju u pravilnim razmacima (ALIMS, 2023). Slične promene u bubrezima, uključujući intracelularni edem, potvrđuju osetljivost bubrežnog tkiva na diltiazem, dok su skleroza glomerula i dilatacija tubula bile retke.

U grupi koja je primala azitromicin, histopatološki nalazi ukazuju na dominantnu vakuolarnu degeneraciju hepatocita na periferiji lobusa, što je karakteristično za zone sa povećanim metaboličkim

opterećenjem. U literaturi je opisano da azitromicin u retkim situacijama izaziva oštećenja tkiva jetre koje obično spontano prolazi za 4 do 8 nedelja posle prestanka davanja (Dawkins i sar., 2023). Izvesna oštećenja u bubrežima, kao što su skleroza glomerula i intracelularni edem, ukazuju na potencijalnu nefrotoksičnost azitromicina, dok je dilatacija tubula zabeležena samo kod jedne tretirane životinje. Neželjena dejstva azitromicina na bubrege su opisana u literaturi (Ismael i Elsamman, 2022) i nalaze se u svim sažecima karakteristike ovog leka označena kao „povremena“ (ALIMS, 2020).

Klaritromicin je izazvao slične histopatološke promene, sa vakuolarnom degeneracijom i intracelularnim edemom hepatocita, naročito na periferiji lobusa samo kod nekih tretiranih pacova. Ovo neželjeno dejstvo je opisano i nalazi se u svim sažecima karakteristika leka za klaritromicin (ALIMS, 2020). U bubrežima je dominantan nalaz bio skleroza glomerula i fokalni intersticijalni nefritis, što može ukazati na inflamatorni proces i strukturalna oštećenja bubrežnog tkiva. Dobro je poznato da u nekim slučajevima klaritromicin može izazvati insuficijenciju bubrega i intersticijalni nefritis, što je opisano kao neželjena dejstva ovog antibiotika i navedeno u sažecima karakteristika leka (ALIMS, 2020).

Histopatološke promene u mozgu i testisima tretiranih pacova nisu uočene.

Dokazani poremećaji u krvnoj slici, biohemijskim parametrima, koncentraciji enzima P-450 kao i histopatološke promene nisu ukazale na neželjena dejstva verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina koja do sada nisu opisana i unešena u njihov farmakološki profil. Ono što se ističe je da svakako primena ovih lekova zahteva posebnu opreznost kod pacijenata koji već imaju poremećaje funkcije jetre i bubrega.

Klinički pregled pacova tretiranih kombinacijama ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, tokom celokupnog perioda ispitivanja, nije pokazao nikakve simptome toksičnosti niti odstupanja u unosu na uzimanje hrane i vode, što bi ukazalo na dobru podnošljivost ovih kombinacija. To je u saglasnosti sa prethodnim fazama istraživanja, gde su slični protokoli primene ovih lekova pokazali odsustvo kliničkih simptoma akutnih toksičnih manifestacija.

Zabeležena telesna masa tretiranih pacova koja prikazana u tabeli 17, dodatno potvrđuje izostanak vidljivih poremećaja izazvanih lekovima. Prosečne vrednosti telesne mase na početku i kraju tretmana nisu pokazale statistički značajne razlike među grupama. Takođe, nije bilo razlike u odnosu na grupe tretirane samo lekovima bez ivermektina. Kombinacija verapamila i ivermektina, na primer, nije uzrokovala signifikantne promene telesne mase (146,66 g na početku u poređenju sa 193,33 g na kraju tretmana), u odnosu na sam verapamil (145,00 g na početku i 190,00 g na kraju). Zabeleženi prirast je bio u saglasnosti sa standardima za pacove ovog pola i starosti, držane u kontrolisanim uslovima (Nistiar i., 2012). Slično je i sa ostalim kombinacijama lekova.

Procena koordinacije i ravnoteže pacova tretiranih kombinacijama ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom pruža ključne informacije o neurotoksičnim efektima ovih lekova. Rezultati dobijeni rota-rod testom, koji meri sposobnost održavanja ravnoteže na rotirajućoj šipki, nisu pokazali pad nijednog pacova u tretiranim grupama, što ukazuje na očuvanu motornu funkciju bez značajnih poremećaja koordinacije. Odsustvo depresije CNS dodatno je potvrđeno očuvanjem refleksa ispravljanja, normalnog hoda na statičnoj površini i adekvatnim reakcijama na spoljašnje stimuluse, uključujući odgovor na približavanje i taktilne nadražaje.

Ovi podaci sugerišu da, uprkos dokazima o oksidativnom stresu i histopatološkim promenama u jetri, bubrežima i mozgu koje su zabeležene u našem istraživanju, kliničke manifestacije nisu bile očigledne pri ovakvom režimu doziranja. Izostanak vidljivih simptoma može se delimično objasniti kompenzatornim mehanizmima homeostatske regulacije koji ublažavaju inicijalne štetne efekte. Ipak, prisustvo subkliničkih promena naglašava potrebu za daljim ispitivanjem kumulativne toksičnosti ovih kombinacija u produženim protokolima primene, kao i evaluaciju njihovog dugoročnog uticaja na funkciju vitalnih organa i ponašanje.

Kombinacije ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom nisu pokazale statistički značajne razlike u vrednostima WBC između različitih grupa tretmana, pri čemu su sve vrednosti ostale unutar fizioloških granica, što sugeriše da kombinacije ovih lekova nemaju značajan uticaj na ukupni broj leukocita. S druge strane, blago povećanje RBC u grupama tretiranim

kombinacijama, uz najvišu vrednost zabeleženu kod kombinacije klaritromicina i ivermektina, ukazuje na moguće stimulatívne efekte ovih kombinacija lekova na eritropoezu, mada bez statističke značajnosti. Slično tome, koncentracije HGB i HCT pokazale su trend blagog povećanja u kombinovanim tretmanima, sa najvišim vrednostima u grupama sa verapamilom i klaritromicinom, ali bez dostizanja signifikantnosti (Tabela 18).

Međutim, MCV je pokazao statistički značajno smanjenje u svim grupama tretiranim kombinacijama u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo ivermektinom ($p < 0,005$). Značajno je da je i sam ivermektin 1,2 mg/kg već izazvao signifikantno smanjenje vrednosti MCV u odnosu na kontrolu (Tabela 12), što znači da kombinovanje sa testiranim lekovima još potencira ovaj efekt. Najniža vrednost MCV zabeležena je kod kombinacije klaritromicina i ivermektina, pri čemu su ove vrednosti bile ispod fiziološkog opsega (Patel i sar., 2024). Ovakav nalaz može ukazivati na promene u veličini eritrocita, potencijalno izazvane kombinovanim efektima lekova na eritropoezu ili osmotsku stabilnost ćelija. Promene u MCV su značajne jer ukazuju na moguće prilagođavanje eritropoeze na farmakološki stres izazvan kombinacijama ovih lekova.

Za razliku od MCV, MCH nije pokazao značajne razlike između grupa, sa vrednostima koje su ostale u okviru fizioloških granica (Patel i sar., 2024). Ovo ukazuje na to da, iako dolazi do promena u zapremini eritrocita, sadržaj hemoglobina po ćeliji ostaje stabilan, što sugeriše da osnovne funkcije eritrocita u transportu kiseonika nisu kompromitovane.

MCHC je pokazala statistički značajno povećanje u svim grupama tretiranim kombinacijama lekova u poređenju sa kontrolnom grupom tretiranom samo ivermektinom ($p < 0,0001$) ali vrednosti nisu prevazišle fiziološke. Međutim, kombinacija sa ivermektinom imala je za posledicu da ovo povećanje prevaziđe fiziološke vrednosti (297,6–340,0 g/l) i dostigne najvišu nivo u grupi tretiranoj kombinacijom klaritromicina i ivermektina od $358,50 \pm 1,52$ g/l. Takav nalaz ukazuje na moguće promene u strukturi eritrocitne membrane ili njenoj propustljivosti pod uticajem ova dva leka. Povećanje MCHC može se objasniti potencijalnim uticajem kombinacije lekova na hemoglobin ili ključne strukturne proteine eritrocitne membrane, kao što su spektrin, ankirin ili band 3 protein, koji igraju ključnu ulogu u održavanju integriteta i funkcionalnosti eritrocita (Bennett i Stenbuck, 1979). Ovi efekti mogu odražavati interakciju lekova sa procesima regulacije osmotske stabilnosti eritrocita, uključujući izmene u transportu jona kroz membrane ili oksidativni stres izazvan metaboličkim promenama. Uz to, povećanje MCHC može ukazivati na povećanu koncentraciju hemoglobina unutar eritrocita usled smanjenja MCV, što je uočeno kod svih kombinacija lekova. Kombinacija klaritromicina i ivermektina, koja je pokazala najveće odstupanje, potencijalno pojačava ovu pojavu inhibicijom metaboličkih enzima ili transportnih proteina, poput P-gp i citohroma P450, što može uticati na farmakokinetiku ivermektina i dodatno doprineti oksidativnom stresu. Promene u MCHC takođe mogu imati značajne implikacije na osmoregulaciju eritrocita, što može kompromitovati njihovu sposobnost transporta kiseonika. S obzirom na to da je povećana koncentracija hemoglobina povezana sa smanjenom deformabilnošću eritrocita, ove promene bi mogle doprineti mikrovaskularnim poremećajima, naročito u organima sa visokim metabolizmom, poput mozga i bubrega.

Specifične razlike u MCV i MCHC između tretmana mogu biti povezane sa različitim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima ispitivanih lekova. Naši rezultati doprinose sveobuhvatnom razumevanju interakcija ivermektina sa inhibitorima P-gp i citohroma P450, ukazujući na potrebu za dodatnim istraživanjima usmerenim ka evaluaciji dugoročnih efekata ovih kombinacija na hematološke i druge fiziološke parametre.

Rezultati biohemijskih parametara ukazuju na kompleksne interakcije između ivermektina i lekova koji inhibiraju transportne i metaboličke sisteme, što je posebno izraženo u funkciji jetre i bubrega (Tabela 19). Aktivnost ALT bila je nešto niža u grupama tretiranim kombinacijama ivermektina sa verapamilom, azitromicinom i klaritromicinom u poređenju sa grupom tretiranom samo ivermektinom, međutim, te vrednosti su bile istovremeno znatno više nego kada su lekovi primenjivani bez ivermektina (Tabela 13). Rezultati sugerišu da kombinacija ivermektina sa ispitivanim lekovima može modulirati odgovor hepatocita, potencijalno kroz uticaj na metabolizam ivermektina ili možda kroz direktnu interakciju sa enzimima jetre.

Nasuprot tome, vrednosti AST nisu pokazale statistički značajne razlike između grupa, niti se razlikovala u odnosu na nalaz kod pacova tretiranih samo ivermektinom. Ovo može ukazivati na selektivniji efekat kombinacija na citosolne enzime (ALT) u poređenju sa mitohondrijalnim (AST). Takvo dejstvo se može povezati sa diferencijalnim mehanizmima hepatocelularnog oštećenja ili regeneracije koje zahtevaju dalju karakterizaciju.

Nalazi koji se odnose na aktivnost ALP ukazuju na značajno smanjenje u svim grupama pacova tretiranim kombinacijama lekova u poređenju sa kontrolnom grupom koja je primila samo ivermektin. I sam ivermektin je inače proizveo signifikantno smanjenje vrednosti ALP, koje je dodatno potencirano kombinacijom sa verapamilom ($p=0,0037$) i diltiazemom ($p=0,0036$) i samo donekle kada su u kombinaciji bili azitromicin i klaritromicin. Ovo smanjenje je visoko značajno ($p<0,0001$) i u poređenju sa netretiranom kontrolnom grupom što dodatno naglašava direktan uticaj kombinovanih tretmana na funkciju jetre. Smanjena aktivnost ALP može biti rezultat specifičnih farmakoloških interakcija između ivermektina i lekova koji inhibiraju P-gp i citohrom P-450. Verapamil i diltiazem, kao poznati inhibitori ovih transportnih i enzimskih sistema, mogu smanjiti metabolizam ivermektina u jetri, dovodeći do akumulacije leka ili njegovih metabolita koji utiču na enzimsku aktivnost. S obzirom na to da je ALP ključni marker hepatobilijarne funkcije, promene u njenoj aktivnosti ukazuju na potencijalne poremećaje u transportu žučnih soli, metabolizmu fosfata ili regenerativnim procesima hepatocita. Osim toga, smanjenje aktivnosti ALP može ukazivati na modulaciju oksidativnog stresa u jetri, jer kombinovani tretmani mogu uticati na redoks ravnotežu i osetljivost enzima na oksidativna oštećenja (Han i sar., 2021; Henry, 1991).

Aktivnost γ -GT, još jednog ključnog markera funkcije jetre, takođe je pokazala značajne promene, ali isključivo kod kombinacije ivermektina i verapamila ($p=0,0387$). Ostale kombinacije zadržale su nivo aktivnosti γ -GT sličan kontrolnoj grupi tretiranoj samo ivermektinom. Sniženje γ -GT nakon primene kombinacije ivermektina i verapamila bilo je statistički značajno i u poređenju sa netretiranom kontrolnom grupom ($p=0,0029$), što dodatno ukazuje na specifičnu interakciju između ova dva leka. Smanjenje aktivnosti ALP i γ -GT sugerise da kombinovane terapije lekovima mogu značajno uticati na funkciju jetre, potencijalno kroz inhibiciju ključnih enzima uključenih u metabolizam jetrenih markera. Verapamil, kao inhibitor P-gp i citohroma P-450, može doprineti smanjenju njihove aktivnosti modulacijom farmakokinetike ivermektina i modulacijom oksidativnog stresa u hepatocitima (Bansal i sar., 2009; Wang i sar., 2004). Specifična interakcija između verapamila i ivermektina, koja je evidentirana kroz smanjenje γ -GT, može ukazivati na zajednički mehanizam koji utiče na regulaciju hepatocelularne detoksikacije ili na stabilizaciju ćelijske membrane hepatocita. S obzirom na to da su i ALP i γ -GT ključni markeri hepatobilijarne funkcije, ovi rezultati imaju značajne implikacije na razumevanje potencijalnih hepatotoksičnih efekata kombinovane primene ivermektina sa blokatorima kalcijumskih kanala.

Kombinacije lekova nisu značajno uticale na koncentracije ukupnih proteina, što može ukazivati na očuvanje osnovnih funkcija sinteze proteina u jetri. Takođe, interesantno je da je ivermektin neutralisao povećanje nivoa triglicerida koje su izazvali verapamil, diltiazem, azitromicin i klaritromicin kada su primenjivani pojedinačno, što sugerise na njegov specifičan efekat na lipidni metabolizam.

Takođe su interesantni podaci o parametrima bubrežne funkcije. Dok su koncentracije kreatinina bile signifikantno smanjene posle pojedinačne primene verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina, kombinacija ovih lekova sa ivermektinom izazvala je povišenje nivoa čak i nešto iznad kontrolnog nivoa. Koncentracije uree su bile signifikantno povećane posle samostalnog davanja verapamila i diltiazema, dok je kombinacija sa ivermektinom smanjila nivoe do kontrolne vrednosti. Ovo može biti povezano sa kinetikom eliminacije uree kroz modifikaciju renalnih transportnih sistema ili sa smanjenom sintezom u jetri.

Naši nalazi ukazuju na sinergističke i potencijalno štetne efekte kombinacija ivermektina sa ispitivanim lekovima na funkciju jetre i bubrega, koji se mogu pratiti kroz promene nivoa enzima, ALT, ALP, γ -GT, kao i modifikacije lipidnog metabolizma. Takođe, funkcija bubrega bi mogla da se kontroliše kroz nivoe kreatinina i uree jer ovi parametri mogu biti ključni indikatori specifičnih interakcija između ivermektina i lekova koji utiču na P-gp i metabolizam u jetri.

Nakon primene ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom, koncentracije citohroma P-450 u plazmi pacova bile su niže u odnosu na vrednost koja je zabeležena samo sa ivermektinom ali bez statističke značajnosti. Sa druge strane, vrednosti su i dalje bile više od kontrolnog nalaza. Dobijeni nalazi jasno ilustriraju sposobnost ivermektina da značajno utiče na ekspresiju citohroma P-450, što može biti od kliničkog značaja u pogledu interakcija lekova. Istovremeno, kada se kombinuje sa lekovima koje smo testirali taj njegov indukcionni kapacitet se smanjuje. Naši nalazi sugerišu da ivermektin može značajno indukovati sintezu citohroma P-450, dok njegovo kombinovanje sa inhibitorima poput verapamila i diltiazema delimično modulira ovaj efekat. S druge strane, makrolidi azitromicin i klaritromicin, koji takođe mogu inhibirati citohrom P-450, u kombinaciji sa ivermektinom proizvode blago povećanje koncentracije enzima. Ova kompleksna interakcija ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima kako bi se identifikovali molekularni mehanizmi regulacije proteinske ekspresije citohroma P-450 pod uticajem ispitivanih lekova. Razumevanje ovih procesa može biti ključno za optimizaciju terapijskih režima i smanjenje rizika od neželjenih efekata povezanih sa predoziranjem ili toksičnošću.

Rezultati ispitivanja uticaja ivermektina na koncentracije verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina u plazmi i moždanom tkivu pokazuju značajne promene u distribuciji ovih lekova (Tabela 21). Ivermektin je udvostručio koncentraciju diltiazema i klaritromicina u plazmi tretiranih pacova, dok na koncentraciju verapamila i azitromicina nije značajnije uticao. To može da se dovede u vezu sa nekom vrstom inhibicije enzima koji učestvuju u metabolizmu ovih lekova ali i inhibicijom P-gp u sluzokoži creva a samim tim i povećanom resorpcijom supstrata (ispitivanih lekova) (Ballent i sar., 2006). Sa druge strane, kombinovana primena ivermektina sa verapamilom i diltiazemom dovela je do značajnog povećanja njihovih koncentracija u mozgu u poređenju sa samostalnom primenom. Ovo sugeriše da ivermektin može uticati na transportne sisteme poput P-gp, što smo i prethodno naveli, čime se omogućava veću penetraciju ovih lekova kroz KMB. Takva povećanja mogu imati značajne posledice, posebno u kontekstu potencijalnih kardiovaskularnih i neurotoksičnih efekata.

Suprotno, koncentracija klaritromicina u moždanom tkivu pacova, kada je on primenjivan zajedno sa ivermektinom, bila je signifikantno niža od vrednosti koju je klaritromicin samostalno postigao. Naglašavamo da mu je koncentracija u plazmi bila dvostruko viša u odnosu na postignutu posle samostalne primene. Ovakav nalaz je veoma interesantan jer su ivermektin i klaritromicin jedinjenja makrolidne strukture za koje važi da su izrazito lipofilni i da deluju kao inhibitori P-gp (Nau i sar., 2010). Jedno od mogućih objašnjenja je i uključivanje nekog drugog efluks sistema na KMB kada je P-gp zasićen, kao što je na primer neki drugi ABC transporter ili transporter iz druge SLC superfamilije (Chaves i sar., 2024).

Ovi rezultati imaju klinički značaj jer pokazuju da kombinacije ivermektina primenjenog koncentracijama višim od terapijskih sa lekovima koji utiču na P-gp ili metabolizam putem citohroma P-450 mogu izazvati neželjene efekte, posebno u centralnom nervnom sistemu. Prilagođavanje doza ovih lekova u kombinovanoj terapiji je od ključne važnosti za smanjenje rizika od kardiovaskularnih i neurotoksičnih komplikacija.

Rezultati analize koncentracija ivermektina nakon samostalne i kombinovane primene sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom otkrivaju značajne promene u distribuciji ovog leka u plazmi i mozgu. Koncentracija ivermektina u plazmi bila je signifikantno viša samo posle primene kombinacije sa diltiazemom, što može biti posledica inhibicije aktivnosti enzima koji ga metabolišu, ali i inhibicije P-gp u crevima, ali je čudno da takav efekat nije proizveo i verapamil, dokazani inhibitor P-gp (Misaka i sar., 2013).

Kombinacija ivermektina sa inhibitorima P-gp transportera, kao što su verapamil i diltiazem povećala je njegovu koncentraciju u moždanom tkivu, što ukazuje na inhibiciju funkcije ovog transportera i pojačano prolaženje ivermektina kroz KMB (Tabela 22). Diltiazem je imao najsnažniji efekat, povećavajući koncentraciju ivermektina u plazmi i mozgu za 59,8% odnosno 273%, u poređenju sa samostalnom primenom. Ovo sugeriše da diltiazem deluje ne samo na transportne proteine već verovatno i na metabolizam ivermektina, inhibicijom citohroma P450. Sličan, ali manje izražen efekat primećen je sa verapamilom, koji nije uticao na koncentracije u plazmi, ali je povećao

koncentraciju ivermektina u mozgu za 75,3%, što ukazuje na specifičnije dejstvo, verovatno samo na ABC transportere na KMB.

Makrolidni antibiotici azitromicin i klaritromicin pokazali su takođe, specifične efekte. Iako azitromicin nije značajno promenio plazmatske koncentracije ivermektina, povećao je koncentraciju u mozgu za 122,5%, što može biti posledica selektivnije interakcije sa ABC transporterima na KMB. Klaritromicin je, nasuprot tome, smanjio koncentraciju ivermektina u plazmi za 34,9%, dok je značajno povećao koncentraciju u mozgu za 88%. I ovde se očigledno radi o specifičnom dejstvu klaritromicina, gde i pored smanjenja koncentracije ivermektina u plazmi dovodi do povećanja koncentracije u moždanom tkivu. Potencijalni uzrok ovakve interakcije može da bude selektivno inhibitorno dejstvo na transportne sisteme na KMB.

Kliničke posledice ovakvih rezultata mogu biti značajne. Povećanje koncentracije ivermektina u mozgu, posebno u kombinaciji sa diltiazemom, može povećati rizik od neurotoksičnih efekata, kao što su letargija, konvulzije ili smrt, zbog potencijalnog preopterećenja centralnog nervnog sistema ivermektinom. Istovremeno, smanjenje koncentracije ivermektina u plazmi kod kombinaciji sa klaritromicinom može smanjiti njegovu efikasnost protiv parazita.

U okviru treće faze istraživanja, analizirali smo efekte kombinovane primene ivermektina sa verapamilom, diltiazemom, azitromicinom i klaritromicinom na parametre oksidativnog stresa kod pacova, uključujući koncentracije MDA, GSH, TOS, TAS i OSI (Tabela 23). Ova analiza pruža mogućnost procene farmakodinamičke interakcije između ivermektina i ispitivanih lekova sa potencijalnom za modulaciju oksidativnog stanja organizma.

MDA, pokazatelj lipidne peroksidacije, bio je značajno niži pri kombinaciji ivermektina sa verapamilom u poređenju sa tretmanom isključivo ivermektinom, što ukazuje na mogući protektivni efekat verapamila na oksidativnu štetu lipida. Slična, ali manje izražena, redukcija MDA zabeležena je kod kombinacija sa diltiazemom i azitromicinom, dok su vrednosti pri kombinaciji sa klaritromicinom bile bliže onima u grupi tretiranoj samo ivermektinom. Ovi nalazi sugerišu različit stepen inhibicije lipidne peroksidacije zavisno od korišćenih lekova. Redukcija lipidne peroksidacije pri kombinaciji verapamila i ivermektina može ukazivati na sinergistički efekat koji ograničava oksidativno oštećenje membranskih lipida.

GSH, ključni antioksidant, bio je statistički značajno povećan pri kombinaciji diltiazema i ivermektina ($p=0,0429$), ukazujući na povećanje antioksidativnog kapaciteta. Slično povećanje zabeleženo je i kod verapamila, dok su kombinacije sa azitromicinom i klaritromicinom pokazale vrednosti slične grupi tretiranoj samo ivermektinom. Rezultati ukazuju na selektivnu modulaciju antioksidativne odbrane zavisno od farmakodinamičkih svojstava leka, gde diltiazem i verapamil mogu pojačati intracelularnu sintezu glutaciona ili smanjiti njegovo trošenje.

TOS je bio blago povišen kod kombinacije klaritromicina i ivermektina, što ukazuje na povećan oksidativni potencijal pri ovoj kombinaciji. Ostale kombinacije nisu značajno uticale na TOS u poređenju sa ivermektinom, što sugeriše da verapamil, diltiazem i azitromicin ne povećavaju oksidativno opterećenje. Klaritromicin, koji dostiže veće koncentracije u plazmi kada se koristi sa ivermektinom, može doprineti intenzivnijoj oksidativnoj aktivnosti zbog povećane koncentracije reaktivnih vrsta kiseonika.

TAS nije pokazao statistički značajne razlike između ispitivanih grupa, što ukazuje na očuvanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta nezavisno od kombinacije lekova. Ovaj rezultat može odražavati relativno stabilnu aktivnost ukupnih antioksidativnih sistema koji nisu značajno modulirani kratkotrajnim tretmanom kombinacijama lekova.

OSI, kao odnos TOS i TAS, bio je najviši kod kombinacije klaritromicina i ivermektina, što odražava povećano oksidativno opterećenje. Kombinacije verapamila i diltiazema s ivermektinom takođe su pokazale povišene vrednosti OSI, dok je kombinacija sa azitromicinom imala najnižu vrednost, sugerišući manji oksidativni stres. Visoke vrednosti OSI kod klaritromicina mogu biti indikativne za potencijalne toksične efekte povezane s indukcijom oksidativnog stresa, što bi moglo ograničiti njegovu sigurnu primenu u kombinaciji sa ivermektinom.

Kombinacije ivermektina sa verapamilom i diltiazemom pokazale su značajnu redukciju lipidne peroksidacije i povećanje nivoa GSH, što ukazuje na protektivne efekte kombinacije ovih lekova u

ublažavanju oksidativnog stresa izazvanog ivermektinom. Verapamil i diltiazem, kao inhibitori P-gp, mogu doprineti povećanoj intracerebralnoj koncentraciji ivermektina, što može pojačati oksidativni stres u tkivu mozga, ali i istovremeno aktivirati mehanizme antioksidativne odbrane. Nasuprot tome, kombinacija sa klaritromicinom rezultirala je povećanim oksidativnim opterećenjem, što može imati kliničke implikacije, naročito u kontekstu neurotoksičnosti i kardiovaskularnog rizika. Kombinacija azitromicina i ivermektina imala je najmanji uticaj na parametre oksidativnog stresa, što je relevantno za terapijske režime gde je kontrola oksidativnog opterećenja prioritet.

Makroskopski pregled nije otkrio bilo kakve promene na organima tretiranih pacova, ali histopatološka analiza je pokazala značajne promene tkiva. Kombinovana primena ivermektina i verapamila rezultirala je upadljivim histopatološkim promenama u više organa. U jetri, kod polovine tretiranih pacova dokazan je fokalni mononuklearni infiltrat, dok je intracelularni edem bio prisutan kod dve životinje. U odnosu na pacove tretirane samo ivermektinom 1,2 mg/kg intracelularni edem je dodatna promena i ona je viđena i posle tretmana verapamilom, ali samo kod jednog od 6 tretiranih pacova. U bubrezima su dominirali znaci intersticijalnog krvavljenja kod pet pacova, a pojedinačni su bili slučajevi skleroze glomerula i intersticijalnog nefritisa, koji ukazuju na ozbiljna oštećenja bubrežnog tkiva. Skleroza glomerula je uočena i kod nekih od pacova koji su dobijali samo verapamil. Takođe, ove promene su zabeležene i kod pacova koji su dobijali samo ivermektin. Dilatacija tubula i intracelularni edem zabeleženi su kod dva pacova ali su ove promene viđene i kao posledica davanja samog ivermektina. Generalno, sve promene su bile učestalije posle primene kombinacije ivermektina sa verapamilom nego kod njihove pojedinačne primene. U mozgu većine životinja primećeno je fokalno krvavljenje, sa edemom kod jednog pacova. Ove promene potencijalno odražavaju neurotoksične efekte kombinacije, jer nisu viđene kod pacova koji su dobijali samo ivermektin u dozi od 1,2 mg/kg, već posle primene najviše testirane doze ivermektina od 4,8 mg/kg. Slično je uočeno i sa degenerativnim promenama u testisima, koji su uključivali degeneraciju semenih kanalića, a nisu zabeležene posle davanja samo ivermektina 1,2 mg/kg niti verapamila.

Kombinacija diltiazema i ivermektina dovela je do sličnih patoloških promena. U jetri je primećena fokalna mononuklearna infiltracija i intracelularni edem kod većine pacova, a vakuolarna degeneracija hepatocita uočena je kod jedne životinje, što ukazuje na dodatno oštećenje ćelijske strukture (Slika 13a). Ovakve promene su zabeležene i kod pacova tretiranih samo ivermektinom 1,2 mg/kg, međutim intracelularni edem i vakuolarna degeneracija hepatocita uglavnom su bili nalaz kod pacova tretiranih sa dve više doze ivermektina (2,4 i 4,8 mg/kg). Sam diltiazem je kod većine pacova doveo do vakuolarne degeneracije. U bubrezima je intracelularni edem bio prisutan kod svih pacova (Slika 13b), dok su intersticijalno krvavljenje i skleroza glomerula zabeleženi kod pojedinih životinja. Slične promene u bubrezima je izazvao i sam diltiazem ali kod manjeg broja životinja u odnosu na ovu grupu. U mozgu je uočeno fokalno krvavljenje kod polovine pacova, dok su edem i gliozna nađeni kod jedne životinje, što dodatno potvrđuje neurotoksične efekte ove kombinacije. Promene u testisima uključivale su degeneraciju germinativnog epitela semenih kanalića i epididimisa kod polovine pacova, što svakako može uticati na reproduktivnu funkciju. Promene u tkivu mozga i testisa posle samostalne primene diltiazema nisu zapažene.

Kombinacija azitromicina i ivermektina rezultirala je fokalnom mononuklearnom infiltracijom i intracelularnim edemom u jetri većine pacova, dok su vakuolarna degeneracija i edem primećeni kod polovine tretiranih životinja. Ovakve promene izazvao je i ivermektin primenjen samostalno, ali dominantno posle viših doza (2,4 i 4,8 mg/kg), što ukazuju na značajnije oštećenje jetre posle primene njegove kombinacije sa azitromicinom. Sa druge strane, kod pacova koji su dobijali samo azitromicin jedino je vakuolarna degeneracija hepatocita na periferiji lobulusa jetre bio dominantan nalaz. U bubrezima su intracelularni edem i dilatacija tubula bili dominantni, uz ređe prisustvo intersticijalnog krvavljenja. Ovaj nalaz je sličan nalazu kod pacova koji su dobijali samo ivermektin, dok su skleroza glomerula i intracelularni edem bili nalaz u bubrezima pacova tretiranih samo azitromicinom. Sve tretirane životinje imale su fokalna krvavljenja u meningama mozga, što može imati posledice po neurološke funkcije. Promene u testisima nisu zabeležene, što ukazuje na izostanak negativnog uticaja ove kombinacije.

Histopatološke promene kod kombinacije klaritromicina i ivermektina uključivale su izražen intracelularni edem u jetri sa fokalnom mononuklearnom infiltracijom kod tri pacova, dok su vakuolarna degeneracija i edem zabeleženi samo kod jedne životinje. Ovakav nalaz ukazuje na slabije izraženu hepatotoksičnost primenjene kombinacije. U bubrezima su intersticijalno krvavljenje i intracelularni edem bili učestali, dok su skleroza glomerula i dilatacija tubula sporadično primećeni. Slične promene su zabeležene i posle pojedinačne primene ivermektina i klaritromicina. U tkivu mozga zabeleženo je fokalno krvavljenje kod dve životinje, uz edem kod jedne. Ovakve promene nisu zabeležene posle pojedinačnih primena ivermektina i klaritromicina. Najverovatnije su promene u mozgu posledica povišenih koncentracija ivermektina (dvostruko viša od koncentracije posle davanja samog ivermektina 1,2 mg/kg), jer je koncentracija klaritromicina istovremeno bila dvostruko niža od koncentracije posle samostalne primene ovog makrolida. Histopatoloških promena u testisima tretiranih pacova nije bilo.

Naša istraživanja su pokazala da visoke doze ivermektina koje su primenjivane kod ljudi tokom COVID-19 pandemije dovode do značajnih poremećaja u organizmu tretiranih pacova, oštećenja jetre i bubrega, koje se mogu pratiti kroz promene u koncentracijama enzima jetre, ali i histopatoloških promena u mozgu i testisima posle najviše testirana doze od 4,8 mg/kg. Interesantno je da uticaj na funkciju CNS-a, niti bilo koji drugi klinički simptomi trovanja nisu uočeni. Značajan nalaz je da čak i najviša testirana doza ivermektina (4,8 mg/kg), tokom 5 dana proizvodi koncentracije u plazmi i mozgu daleko niže od publikovane IC₅₀ za replikaciju SARS-Co-2 virusa, protiv koga je primenjivana. Značajan je nalaz da ivermektin dozno-zavisno stimuliše sintezu citohroma P-450 koji ga metaboliše, ali samo do najviše primenjene doze koja ne ispoljava ovakav efekt. Generalno možemo zaključiti da primenjene doze ivermektina 3, 6, 12 i 24 puta više od terapijske antiparazitske doze ne proizvode antivirusne koncentracije dokazane *in vitro*, ali mogu dovesti do ozbiljnih oštećenja organizma tretiranih pacova.

Desetodnevna primena terapijskih doza verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina nije imala za posledicu poremećaje opšteg zdravstvenog stanja pacova, nije uticala na funkcije CNS-a i motoronu koordinaciju, nije dovela do značajnih promena u hematološkim parametrima i nije uticala na koncentracije enzima citohroma P-450 u plazmi. Značajno je da su svi tretirani pacovi imali signifikantno povećane koncentracije triglicerida a pacovi tretirani verapamilom i diltiazemom i povećanje koncentracije uree u plazmi. Značajno je i to da su verapamil, diltiazem i azitromicin u mozgu dostizali koncentracije 10 i više puta veće od koncentracija u plazmi. Ovo je posebno važno jer se kalcijumski antagonisti sve češće spominju u prenameni za lečenje i nekih degenerativnih bolesti mozga, a za azitromicin je ovaj naš nalaz značajan zbog njegove primene u lečenju infekcija CNS-a. Analizirajući patohistološke promene u jetri i bubrezima tretiranih pacova, možemo zaključiti se one uklapaju u već opisana prolazna neželjena dejstva testiranih lekova i da kvalitativno nove neželjene efekte, koji do sada nisu opisani, nismo ustanovili.

Kombinovana primena ivermektina u dozi od 1,2 mg/kg i terapijskih doza inhibitora aktivnosti enzima citohroma P-450, odnosno inhibitora P-gp nije uticala na telesnu masu, uzimanje hrane i vode niti su uočeni bilo kakvi simptomi toksičnosti uključujući i promene u funkciji CNS-a. U hematološkom nalazu izdvaja se jedino signifikantno smanjenje MCV i povećanje MCHC koja nisu zabeležena posle primene ivermektina i mogu se pripisati interakciji sa primenjenim lekovima. Kao posledicu interakcije ivermektina sa verapamilom, diltiazemom i klaritromicinom možemo da označimo i povećanje nivoa ALT i smanjivanje koncentracije ALP, dok je interakcija ivermektina sa verapamilom dovela do smanjenja vrednosti γ -GT. Ovi parametri mogu biti značajni za praćenje potencijalnih štetnih interakcija ivermektina sa lekovima na funkcije jetre. Interesantne su i pozitivne interakcije, naime kombinacija ivermektina sa testiranim lekovima imala je za posledicu snižavanje nivoa triglicerida u odnosu na rezultat koji je dobijen kada su lekovi primenjeni samostalno, kao i koncentraciju uree, koja je čak bila niža kod svih kombinacija u odnosu na samostalnu primenu lekova i ivermektina. Interakcija lekova sa ivermektinom imala je za posledicu sniženje koncentracije citohroma P-450 u odnosu na samostalnu primenu ivermektina i bila je blizu nalaza kod netretirane kontrole. Kombinacija sa ivermektinom je udvostručila koncentracije diltiazema i klaritromicina u plazmi i signifikantno povećala i do 4 puta koncentracije verapamila i diltiazema a dvostruko smanjila

Diskusija

koncentraciju azitromicina u mozgu pacova. Očigledno da ivermektin ispoljava dejstvo na metabolizam i distribuciju testiranih lekova. Sa druge strane, samo je diltiazem povećao koncentraciju ivermektina u plazmi, dok su svi lekovi signifikantno povećali koncentraciju ivermektina u moždanom tkivu. Histopatološke promene u jetri i bubrezima su bile iste kao i kod samostalne primene ivermektina, samo učestalije i intenzivnije, dok je kvalitativno novi nalaz bio krvavljene u mozgu i degenerativne promene u testisima koje su viđene samo kod najviše doze ivermektina od 4,8 mg/kg i očigledno su posledica interakcije.

7. ZAKLJUČCI

Istraživanja koja smo sprovedeli imala su za cilj da analiziraju toksične efekte ivermektina kod pacova, primenjenog u dozama koje su više od antiparazitskih terapijskih doza i koje su primenjivane duže vreme, a korišćene su tokom COVID-19 pandemije kod ljudi u takvom režimu doziranja. Takođe, ispitali smo interakciju ivermektina, primenjenog istovremeno sa lekovima inhibitorima enzima citohroma P-450 (kalcijumskim antagonistima verapamilom i diltiazemom) i inhibitorima P-glikoproteinskih transportera (makrolidnim antibioticima azitromicinom i klaritromicinom).

Na osnovu definisanih ciljeva i ostvarenih rezultata u sprovedenim istraživanjima mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Petodnevni tretman ivermektinom, u dozama koje su 3, 6, 12 i 24 puta više od antiparazitske terapijske doze (0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg):
 - a. Ne dovodi do uginuća niti pojave kliničkih znakova toksičnosti, ne utiče na ponašanje, unos hrane i vode i telesnu masu pacova, ne izaziva depresiju CNS-a niti poremećaje neuromišićne koordinacije na roda-rod testu.
 - b. Ne utiče na ukupan broj leukocita, koncentraciju hemoglobina niti hematokrit, međutim dovodi do dozno-nezavisnog smanjenja hematoloških indeksa MCV i MCH i povećanja MCHC kod svih tretiranih pacova. Ipak ove vrednosti nisu izašle iz referentnih fizioloških granica.
 - c. Izaziva povećanje aktivnosti ALT koje nije dozno-zavisno i dozno-zavisno povećanje aktivnosti γ -GT, pri čemu su vrednosti više od fizioloških i ukazuju na poremećaj funkcije jetre već pri najnižoj testiranoj dozi ivermektina.
 - d. Dozno-zavisno povećava koncentraciju enzima P-450 izoforme 3A4 posle doza do 12 puta viših od terapijske (0,6; 1,2 i 2,4 mg/kg), dok najviša testirana doza ivermektina (4,8 mg/kg) ne izaziva promene u odnosu na netretiranu kontrolu i očigledno ne stimuliše sintezu enzima.
 - e. Dozno-zavisno povećava koncentraciju ivermektina u plazmi i mozgu tretiranih pacova, pri čemu udvostručenje doze ivermektina rezultira proporcionalnim povećanjem koncentracije u plazmi i mozgu, osim pri najvišoj testiranoj dozi (4,8 mg/kg), gde koncentracija u mozgu petostruko nadmašuje prethodni dozni nivo što može da se tumači intezivnijim prolaskom ivermektina u moždano tkivo zbog inhibicije transportnih sistema na KMB.
 - f. Rezultira dostizanjem koncentracija ivermektina u plazmi koje su i posle primene najviše doze (4,8 mg/kg) i dalje deset puta niže od publikovanih vrednosti IC₅₀ ivermektina za replikaciju SARS-Co-2 virusa.
 - g. Ima za posledicu dostizanje koncentracija ivermektina u mozgu za koje postoje dokazi da ispoljavaju toksična dejstva na moždano tkivo.
 - h. U višim dozama (1,2 i 2,4 mg/kg) ispoljava značajan uticaj na oksidativni stres, povećava nivo MDA, smanjuje GSH i TAS (1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg) i povećava TOS (2,4 i 4,8 mg/kg) i OSI (0,6; 1,2; 2,4 i 4,8 mg/kg). Ovi nalazi ukazuju da ivermektin primenjivan u visokim dozama i duži vremenski period može doprineti oksidativnom oštećenju tkiva.
 - i. Dovodi od histopatoloških promena u jetri (fokalna mononuklearna infiltracija, intraceularni edem i vakuolarna degeneracija posle dve najviše doze ivermektina) i bubrezima (dilatacija tubula, intracelularni edem i krvarenje u intersticijumu), a najviša primenjena doza ivermektina (4,8 mg/kg) dovela je i do histopatoloških promena u mozgu (fokalno i perivaskularno krvavljenje) i testisima tretiranih pacova (degeneracija germinativnog epitela semenih kanalića i epitela epididimisa i smanjenje i odsustvo spermatogeneze).

2. Desetodnevna primena terapijskih doza verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina:
 - a. Ne izaziva klinički izražene toksične efekte niti ispoljava dejstva na motornu koordinaciju i funkciju CNS-a tretiranih pacova.
 - b. Dovodi do nesignifikantnih promena u hematološkim i biohemijskim parametrima, izuzev statistički značajnog povećanja koncentracije triglicerida, kod svih tretiranih pacova, ali ove vrednosti su i dalje u granicama fizioloških vrednosti.
 - c. Ima za posledicu signifikantno povećanje koncentracije uree u plazmi ali samo posle primene verapamila i diltiazema, pri čemu su zabeležene vrednosti bile iznad maksimalne referentne.
 - d. Ne utiče na koncentraciju citohroma P-450 izoforme 3A4 u plazmi pacova.
 - e. Ima za posledicu dostizanje relativno visokih koncentracija verapamila, diltiazema i azitromicina u mozgu u odnosu na serumske koncentracije, što opravdava potencijalnu prenamenu kalcijumskih antagonista za lečenje poremećaja CNS koji se dovode u vezu sa funkcijom kalcijumskih kanala.
 - f. Pojačava intezitet oksidativnog oštećenja, smanjuje ukupni antioksidativni kapacitet i povećava lipidnu peroksidaciju, pri čemu je klaritromicin pokazao najizraženiji prooksidativni efekat.
 - g. Dovodi do histopatoloških promena u jetri i bubrezima sa znacima vakuolarne degeneracije hepatocita i skleroza glomerula posle primene verapamila i diltiazema, dok su azitromicin i klaritromicin izazvali slične promene ali kod manjeg broja životinja, sa izraženijim oštećenjem bubrežnog tkiva posle primene klaritromicina.
 - h. Ne dovode do histopatoloških promena u mozgu i testisima.
 - i. Sva zabeležena neželjena dejstva su već opisana, označena kao retka i reverzibilna i uneta u Sažetke karakteristike leka.

3. Kombinovana primena ivermektina (1,2 mg/kg) i terapijskih doza verapamila, diltiazema, azitromicina i klaritromicina:
 - a. Ne dovodi do ispoljavanja kliničkih znakova toksičnosti, promena u unosu hrane, vode i telesnoj masi, ne dovodi ni do promena u motornoj koordinaciji i funkciji CNS-a.
 - b. Ne utiče značajnije na ukupan broj leukocita, eritrocita, koncentraciju hemoglobina i hematokritsku vrednost, ali izaziva signifikantno smanjenje MCV koji je ispod fiziološke granice i najizraženiji je kod kombinacije ivermektina sa klaritromicinom, kao i statistički značajno povećanje MCHC koje je prevazišlo maksimalne fiziološke vrednosti a bilo je naveće kod kombinacije ivermektina i klaritromicina, što ukazuje na poremećaj osmotske rezistencije eritrocita.
 - c. Dovodi do povećanja aktivnosti ALT u grupama koje su dobijale ivermektin sa verapamilom, azitromicinom i klaritromicinom u odnosu na netretiranu kontrolnu vrednost ali i izvesnog smanjenja u odnosu na dejstvo samog ivermektina, dok je aktivnost ALP i γ -GT bila smanjena posle primene kombinacija ivermektina sa verapamilom i diltiazemom a koncentracija triglicerida povećana u grupi tretiranoj kombinacijom azitromicina i ivermektina. Ove promene mogu biti dovedene u vezu sa dejstvom primenjenih lekova.
 - d. Smanjuje koncentraciju citohroma P-450 izoforme 3A4 u odnosu na sam ivermektin, ali su vrednosti bile nešto više u odnosu na netretiranu kontrolu, što govori da primenjeni lekovi najvećim delom neutrališu stimulatorno dejstvo ivermektina na sintezu enzima.
 - e. Nema za posledicu značajnije promene koncentracija verapamila i azitromicina, ali gotovo udvostručuje koncentracije diltiazema i klaritromicina u plazmi. Sa druge strane signifikantno povećava koncentracije verapamila i diltiazema, nesignifikantno povećava koncentraciju azitromicina a smanjuje koncentraciju klaritromicina u tkivu mozga. Ovakavi rezultati ukazuju da ivermektin može direktno da utiče na farmakokinetiku lekova sa kojima se u isto vreme primenjuje.

- f. Ukazuje da jedino diltiazem signifikantno povećava koncentraciju ivermektina u plazmi, što se može pripisati inhibiciji biotransformacije, dok su svi primenjeni lekovi signifikantno povećali koncentraciju ivermektina u tkivu mozga, što sa druge strane ukazuje na potencijalnu inhibiciju transportnih sistema na KMB.
- g. Pokazuje da verapamil i diltiazem a donekle i azitromicin ispoljavaju protektivno dejstvo na oksidativni stres izazvan ivermektinom.
- h. Pojačava intezitet i učestalost histopatoloških promena u tkivu jetre i bubrega u odnosu na pojedinačnu primenu testiranih lekova, dok se kvalitativno nove histopatološke promene nalaze u mozgu (fokalna krvarenja) i testisima (degeneracija germinativnog epitela semenih kanalića) tretiranih pacova. Ove promene nisu prethodno uočene kod pojedinačne primene ivermektina u dozi od 1,2 mg/kg ili lekova, ali su primećene kod doze ivermektina od 4,8 mg/kg, pa se mogu označiti kao posledica interakcije.

Naša istraživanja pokazuju da visoke doze ivermektina korišćene protiv SARS-CoV-2 mogu izazvati ozbiljna oštećenja organizma pacova a da interakcija ivermektina sa kalcijumskim antagonistima i makrolidnim antibioticima takva oštećenja potencira. Takođe, naši rezultati ukazuju da visoke doze ivermektina primenjivane 5 dana ne obezbeđuju njegove efikasne antivirusne koncentracije, čime se postavlja pitanje opravdanosti ovakve primene.

8. LITERATURA

1. 2002/657/EC. (2002). Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*.
2. Abd-Elsalam, S., Noor, R. A., Badawi, R., Khalaf, M., Esmail, E. S., Soliman, S., Esmat, G. (2021). Clinical study evaluating the efficacy of ivermectin in COVID-19 treatment: A randomized controlled study. *Journal of Medical Virology*, 93(10), 5833–5838. <https://doi.org/10.1002/jmv.27122>
3. Alberici, F., Pagani, L., Ratti, G., Viale, P. (2000). Ivermectin alone or in combination with benzyl benzoate in the treatment of human immunodeficiency virus-associated scabies. *British Journal of Dermatology*, 142(5), 969–972. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03480.x>
4. ALIMIS. (2020, 2023, 2024). www.alims.gov.rs.
5. Alluri, R., Kilari, E. K., Pasala, P. K., Kopalli, S. R., Koppula, S. (2023). Repurposing Diltiazem for Its Neuroprotective Anti-Dementia Role against Intra-Cerebroventricular Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease-Type Rat Model. *Life*, 13(8), 1688. <https://doi.org/10.3390/life13081688>
6. Alvinerie, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J. F., Lespine, A. (2008). Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Veterinary Parasitology*, 157(1–2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.017>
7. Amantea, D., Petrelli, F., Greco, R., Tassorelli, C., Corasaniti, M. T., Tonin, P., Bagetta, G. (2019). Azithromycin Affords Neuroprotection in Rat Undergone Transient Focal Cerebral Ischemia. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01256>
8. Ameen, M., Arenas, R., Villanueva-Reyes, J., Ruiz-Esmenjaud, J., Millar, D., Domínguez-Dueñas, F., Rodríguez-Álvarez, M. (2010). Oral Ivermectin for Treatment of Pediculosis Capitis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(11), 991–993. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181e63f5f>
9. Ashour, D. S. (2019). Ivermectin: From theory to clinical application. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54, 134–142. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.05.003>
10. Audus, K. L., Knaub, S. R., Guillot, F. L., Schaeffer, J. M. (1992). The effect of protein binding on ivermectin uptake by bovine brain microvessel endothelial cells. *Veterinary Research Communications*, 16(5), 365–377. <https://doi.org/10.1007/BF01839186>
11. Azeem, S., Ashraf, M., Rasheed, M. A., Anjum, A. A., Hameed, R. (2015). Evaluation of cytotoxicity and antiviral activity of ivermectin against Newcastle disease virus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 597–602.
12. Azithromycin Tablets Prescribing Information. (2024). <https://www.drugs.com/pro/azithromycin-tablets.html>
13. Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(3), 457–463. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.007757>
14. Bansal, T., Mishra, G., Jaggi, M., Khar, R. K., Talegaonkar, S. (2009). Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(4–5), 580–590. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.12.005>
15. Baraka, O. Z., Mahmoud, B. M., Marschke, C. K., Geary, T. G., Homeida, M. M. A., Williams, J. F. (1996). Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50(5), 407–410. <https://doi.org/10.1007/s002280050131>

16. Barrows, N. J., Campos, R. K., Powell, S. T., Prasanth, K. R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., Garcia-Blanco, M. A. (2016). A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, 20(2), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.004>
17. Belizario VY, Amarillo ME, de Leon WU, de los Reyes AE, Bugayong MG, Macatangay BJ (2003). A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. *Bull World Health Organ*. 81(1):35-42. Epub 2003 Mar 11. PMID: 12640474; PMCID: PMC2572315.
18. Bennett, V., Stenbuck, P. J. (1979). The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature*, 280(5722), 468–473. <https://doi.org/10.1038/280468a0>
19. Bomze, D., Sprecher, E., Geller, S. (2022). Severe cutaneous adverse reactions associated with systemic ivermectin: A pharmacovigilance analysis. *Journal of Dermatology*, 49(8), 769–774. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.16398>
20. Bradley, G., Juranka, P. F., Ling, V. (1988). Mechanism of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 948(1), 87–128. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(88\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0304-419X(88)90006-6)
21. Brander, G. C., Pugh D.M., Bywater R.J., Jenkins W.L. (1991). *Veterinary applied pharmacology and therapeutics* (5th ed). Bailliere Tindali, London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.
22. Brunton, L. L., Knollmann, B. C. (2011). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed.). Inc. USA,: The McGraw-Hill Companies.
23. Buonfrate, D., Chesini, F., Martini, D., Roncaglioni, M. C., Ojeda Fernandez, M. L., Alvisi, M. F., Bisoffi, Z. (2022a). High-dose ivermectin for early treatment of COVID-19 (COVER study): a randomised, double-blind, multicentre, phase II, dose-finding, proof-of-concept clinical trial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(2), 106516. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106516>
24. Burchard, G. D., Kubica, T., Tischendorf, F. W., Kruppa, T., Brattig, N. W. (1999). Analysis of renal function in onchocerciasis patients before and after therapy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(6), 980–986. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.980>
25. Burg, R. W., Stapley, E. O. (1989). *Isolation and Characterization of the Producing Organism*. Springer, New York, pp. 24–32.
26. Caly, L., Druce, J. D., Catton, M. G., Jans, D. A., Wagstaff, K. M. (2020). The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Research*, 178. Article number 104787 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>
27. Campbell, W. C. (1989). *Ivermectin and Abamectin*. Springer Verlag.
28. Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schönberg, G, Jacob, T. A. (1983), Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 221(4613), 823-8. doi: 10.1126/science.6308762. PMID: 6308762
29. Campbell, W.C., Benz, G. W. (1984). Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1984.tb00872.x>
30. Campbell, W. C. (1981). An Introduction to the Avermectins. *New Zealand Veterinary Journal*, 29(10), 174–178. <https://doi.org/10.1080/00480169.1981.34836>
31. Campbell, W. C. (1993). Ivermectin, an antiparasitic agent. *Medicinal Research Reviews*, 13(1), 61–79. <https://doi.org/10.1002/med.2610130103>
32. Campillo, J. T., Boussinesq, M., Bertout, S., Faillie, J. L., Chesnais, C. B. (2021). Serious adverse reactions associated with ivermectin: A systematic pharmacovigilance study in sub-saharan africa and in the rest of the world. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009354>

33. Canga, A. G., Prieto, A. M. S., Diez Liébana, M. J., Martínez, N. F., Sierra Vega, M., García Vieitez, J. J. (2008). The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans - A mini-review. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10, 42–46. <https://doi.org/10.1208/s12248-007-9000-9>
34. Cataldi, M. (2015). Diltiazem. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.07804-1>
35. Chabala, J. C., Mrozik, H., Tolman, R. L., Eskola, P., Lusi, A., Peterson, L. H., Ostlind, D. A. (1980). Ivermectin, a New Broad-Spectrum Antiparasitic Agent. In *Journal of Medicinal Chemistry*, 23(10), 1134–1136. doi: 10.1021/jm00184a014. PMID: 6893469.
36. Chaves, J. C. S., Dando, S. J., White, A. R., Oikari, L. E. (2024). Blood-brain barrier transporters: An overview of function, dysfunction in Alzheimer's disease and strategies for treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1870(2), 166967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166967>
37. Chen, W. J. (2016). Honoring antiparasitics: The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomedical Journal*, 39, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2016.04.002>
38. Chin, S., Ikeda, M., Ozaki, M., Kameoka, S. (2005). Protective Effect of Diltiazem on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Improving Liver Tissue Blood Flow. *Transplantation Proceedings*, 37(10), 4556–4559. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.11.028>
39. Chiu, S. H. L., Green, M. L., Baylis, F. P., Eline, D., Rosegay, A., Meriwether, H., Jacob, T. A. (1990). Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2072–2078. <https://doi.org/10.1021/jf00101a015>
40. Chiu, S. H. L., Taub, R., Sestokas, E., Lu, A. Y. H., Jacob, T. A. (1987). Comparative in Vivo and in Vitro Metabolism of Ivermectin in Steers, Sheep, Swine, and Rat. *Drug Metabolism Reviews*, 18(2–3), 289–302. <https://doi.org/10.3109/03602538708998309>
41. Clarithromycin prescribing information. (2024). <https://www.drugs.com/pro/clarithromycin.html>
42. Cole, S. P. C., Deeley, R. G. (1998). Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *BioEssays*, 20(11), 931–940. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199811\)20:11<931::AID-BIES8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199811)20:11<931::AID-BIES8>3.0.CO;2-J)
43. Collins, A. B., Zhao, L., Zhu, Z., Givens, N. T., Bai, Q., Wakefield, M. R., Fang, Y. (2022). Impact of COVID-19 on Male Fertility. *Urology*, 164, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2021.12.025>
44. Cramer, C. L., Patterson, A., Alchakaki, A., Soubani, A. O. (2017). Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician. *Postgraduate Medicine*, 129(5), 493–499. <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1285677>
45. Cross, H., Bronsvort, B., Wahl, G., Achu-Kwi, D., Trees, A. (1997). The entry of ivermectin and suramin into *Onchocerca ochengi* nodules. *Annals of Tropical Medicine And Parasitology*, 91(4), 393–402. <https://doi.org/10.1080/00034989761012>
46. Crump, A. (2017). Ivermectin: Enigmatic multifaceted “wonder” drug continues to surprise and exceed expectations. *Journal of Antibiotics*, 70, 495–505. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.11>
47. Crump, A., Omura, S. (2011). Ivermectin, “Wonder drug” from Japan: The human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 87, 13–28. <https://doi.org/10.2183/pjab.87.13>
48. Dawkins, M., Fishkin, T., Berman, G., Wang, A., Saidman, J., Partiula, B. (2023). Severe Azithromycin-Induced Liver Injury With Vanishing Bile Duct Syndrome Necessitating Liver Transplantation. *Annals of Internal Medicine: Clinical Cases*, 2(12). <https://doi.org/10.7326/aimcc.2023.0251>

49. Demeule, M., Régina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., Béliveau, R. (2002). Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood–brain barrier. *Vascular Pharmacology*, 38(6), 339–348. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00201-X)
50. Dickinson, R., White, I., Lieb, W. R., Franks, N. P. (2000). Stereoselective Loss of Righting Reflex in Rats by Isoflurane. *Anesthesiology*, 93(3), 837–843. <https://doi.org/10.1097/00000542-200009000-00035>
51. Didier, A., Loor, F. (1996). The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anti-Cancer Drugs*, 7(7), 745–751. <https://doi.org/10.1097/00001813-199609000-00005>
52. Difficult-to-treat scabies: oral ivermectin. (2014). *National Institute for Health and Care Excellence*. Retrieved May 26, 2024, from <https://www.nice.org.uk/advice/esuom29/chapter/Key-points-from-the-evidence>
53. Dong, J., Song, X., Lian, X., Fu, Y., Gong, T. (2016). Subcutaneously injected ivermectin-loaded mixed micelles: formulation, pharmacokinetics and local irritation study. *Drug Delivery*, 23(7), 2220–2227. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.956849>
54. Dong, Z., Xing, S.-Y., Zhang, J.-Y., Zhou, X.-Z. (2020). 14-Day Repeated Intraperitoneal Toxicity Test of Ivermectin Microemulsion Injection in Wistar Rats. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 598313. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.598313>
55. Draper, H. H., Hadley, M. (1990). [43]Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. *Methods of Enzymology*, 186, 421–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I)
56. Dunham, N. W., Miya, T. S. (1957). A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice**College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 46(3), 208–209. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>
57. eClinPath.com Cornell University USA. (2024). eClinPath.com.
58. Edwards, G., Dingsdale, A., Helsby, N., Orme, M. L. E., Breckenridge, A. M. (1988). The relative systemic availability of ivermectin after administration as capsule, tablet, and oral solution. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 35(6), 681–684. <https://doi.org/10.1007/BF00637608>
59. Elkassaby, M. H. (1991). Ivermectin uptake and distribution in the plasma and tissue of Sudanese and Mexican patients infected with *Onchocerca volvulus*. *Tropical Medicine and Parasitology: Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft Fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 42(2), 79–81.
60. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
61. El-Tahtawy, A., Glue, P., Andrews, E. N., Mardekian, J., Amsden, G. W., Knirsch, C. A. (2008). The effect of azithromycin on ivermectin pharmacokinetics - A population pharmacokinetic model analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(5): e236. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000236>
62. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
63. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
64. European Pharmacopoeia (8th ed.). (2014). *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)*. Retrieved from www.edqm.eu

65. Eweas, A. F., Alhossary, A. A., Abdel-Moneim, A. S. (2021). Molecular Docking Reveals Ivermectin and Remdesivir as Potential Repurposed Drugs Against SARS-CoV-2. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592908>
66. FDA. (2016). Verapamil. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugsatfda>
67. FDA. (2017). Sklice (ivermectin) Lotion, 0.5%, for topical use. Retrieved from www.fda.gov/medwatch.
68. FDA. (2018). Moxidectin tablets, for oral use. In *Moxidectin tablets, for oral use*. Retrieved from www.fda.gov/medwatch.
69. FDA. (2022a). Soolantra™ (ivermectin) cream, 1%, for topical use. Retrieved from www.fda.gov/medwatch.
70. FDA. (2022b). *Stromectol*® (ivermectin). Retrieved from <https://www.fda.gov/drugsatfda>
71. Fiese, E. F., Steffen, S. H. (1990). Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin A. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25, 39-47. doi: 10.1093/jac/25.suppl_a.39.
72. Fink, D. W., Porras, A. G. (1989). Pharmacokinetics of Ivermectin in Animals and Humans. In Campbell, W. C. (Ed.), *Ivermectin and abamectin*. 113–130. New York: Springer-Verlag.
73. GabAllh, M., El-mashad, A., Amin, A., Darweish, M. (2017). Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits. *Benha Veterinary Medical Journal*, 32(1), 104–112. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2017.31162>
74. Galan, L. E. B., Santos, N. M. dos, Asato, M. S., Araújo, J. V., de Lima Moreira, A., Araújo, A. M. M., da Fonseca, A. J. (2021). Phase 2 randomized study on chloroquine, hydroxychloroquine or ivermectin in hospitalized patients with severe manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Pathogens and Global Health*, 115(4), 235–242. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1890887>
75. Gardon, J., Boussinesq, M., Kamgno, J., Gardon-Wendel, N., Demanga-Ngangue, Duke, B. O. (2002). Effects of standard and high doses of ivermectin on adult worms of *Onchocerca volvulus*: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 360(9328), 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09456-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09456-4)
76. Geyer, J., Gavrilova, O., Petzinger, E. (2009). Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp* - deficient knockout mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), 87–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.01007.x>
77. Golden, P. L., Pollack, G. M. (2003). Blood–Brain Barrier Efflux Transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(9), 1739–1753. <https://doi.org/10.1002/jps.10424>
78. González, P., González, F. A., Ueno, K. (2012). Ivermectin in Human Medicine, An Overview of the Current Status of Its Clinical Applications. In *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1103-1109. doi: 10.2174/138920112800399248.
79. Greene, B. M., Taylor, H. R. (1989). The Status of Ivermectin in the Treatment of Human Onchocerciasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(4), 460–466. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.460>
80. Guarascio, P., D'Amato, C., Sette, P., Conte, A., Visco, G. (1984). Liver damage from verapamil. *British Medical Journal*, 288(6414), 362–363. <https://doi.org/10.1136/bmj.288.6414.362-a>
81. Guzzo, C. A., Furtek, C. I., Porras, A. G., Chen, C., Tipping, R., Clineschmidt, C. M., Lasseter, K. C. (2002). Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(10), 1122–1133. <https://doi.org/10.1177/009127002237994>
82. Haas, N., Lindemann, U., Frank, K., Sterry, W., Lademann, J., Katzung, W. (2002). Rapid and preferential sebum secretion of ivermectin: a new factor that may determine drug responsiveness in patients with scabies. *Archives of Dermatology*, 138(12), 1618–1619. <https://doi.org/10.1001/archderm.138.12.1618>

83. Halley, B. A., Nessel, R. J., Lu, A. Y. H., Roncalli, R. A. (1989). The environmental safety of ivermectin: An overview. *Chemosphere*, 18(7–8), 1565–1572. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90046-5)
84. Halley; B.A., Narasimhan, N. I., Ventaraman, K., Taub, R., Erwin, M. L. G., Andrew, N. W., Wislocki, P. G. (1992). Ivermectin and abamectin metabolism (Differences and similarities). *ACS Symposium Series*, 203–216.
85. Han, Y. N., Lee, Y. J., Kim, K. J., Lee, S. J., Choi, J. Y., Moon, S.-H., Rhie, J. W. (2021). Nitric Oxide Produced by the Antioxidant Activity of Verapamil Improves the Acute Wound Healing Process. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(1), 179–186. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00308-x>
86. He, X. J., Zhao, L. M., Qiu, F., Sun, Y. X., Li-Ling, J. (2009). Influence of ABCB1 gene polymorphisms on the pharmacokinetics of azithromycin among healthy Chinese Han ethnic subjects. *Pharmacological Reports*, 61(5), 843–850. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70140-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70140-9)
87. Henry, P. D. (1991). Antiperoxidative actions of calcium antagonists and atherogenesis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 18(1), S6-10.
88. Hoang, R., Temple, C., Correia, M. S., Clemons, J., Hendrickson, R. G. (2022). Characteristics of ivermectin toxicity in patients taking veterinary and human formulations for the prevention and treatment of COVID-19. *Clinical Toxicology*, 60(12), 1350–1355. <https://doi.org/10.1080/15563650.2022.2134788>
89. Hogg, A. (1984). Eradication of sarcoptic mange in swine with ivermectin. *8th International Pig Vet. Congr. Gent.*, 206.
90. Huffam, S. E., Currie, B. J. (1998). Ivermectin for *Sarcoptes scabiei* hyperinfestation. *International Journal of Infectious Diseases*, 2(3), 152–154. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(98\)90118-7](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(98)90118-7)
91. Ismael, Z. M., Elsamman, W. N. (2022). Evaluation of the Effects of Azithromycin on the Kidney of Adult Albino Rats and the Possible Protective Role of Vitamin C Using Histological and Immuno-Histochemical Studies. *SVU-International Journal of Medical Sciences*, 5(2), 484-500. doi: 10.21608/svuijm.2022.155478.1374
92. Jacob, T. A., Bush, R. P., Carlin, J. R., Chiu, S. H. L., Miwa, G. T., Rosegay, A. (1983). The metabolism and tissue residue profile of ivermectin.. *Of the MSD AGVET Symposium on Recent Developments in the Control of Animal Parasites, XXII World Congress. Australia.*
93. Jaruratanasirikul, S., Hortiwakul, R., Tantisarasart, T., Phuenpathom, N., Tussanasunthornwong, S. (1996). Distribution of azithromycin into brain tissue, cerebrospinal fluid, and aqueous humor of the eye. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(3), 825–826. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.3.825>
94. Jollow, D. J., Mitchell, J. R., Zampaglione, N., Gillette, J. R. (1974). Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite. *Pharmacology*, 11(3), 151–169. <https://doi.org/10.1159/000136485>
95. Kalonia, H., Kumar, P., Kumar, A. (2011). Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats. *Brain Research*, 1372, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.060>
96. Kinjo, N., Kishimoto, K., Fujita, J., Hokama, A., Zaha, O., Hirata, T., Kinjo, F. (2006). Impairment of host immune response against strongyloides stercoralis by human t cell lymphotropic virus type 1 infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(2), 246–249. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.246>
97. Klotz, U., Ogbuokiri, J. E., Okonkwo, P. O. (1990). Ivermectin binds avidly to plasma proteins. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 39(6), 607–608. <https://doi.org/10.1007/BF00316107>

98. Koch, E., Clark, J. M., Cohen, B., Meinking, T. L., Ryan, W. G., Stevenson, A., Yoon, K. S. (2016). Management of Head Louse Infestations in the United States—A Literature Review. *Pediatric Dermatology*, 33, 466–472. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/pde.12982>
99. Krishna, D. R., Klotz, U. (1993). Determination of ivermectin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Arzneimittel-Forschung*, 43(5), 609–611.
100. Kumar, G., Banu, G. S., Pappa, P. V., Sundararajan, M., Pandian, M. R. (2004). Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.009>
101. Kumar, K. L., Colley, C. A. (1994). Verapamil-induced hepatotoxicity. *The Western Journal of Medicine*, 160(5), 485–486.
102. Kwei, G. Y., Alvaro, R. F., Chen, Q., Jenkins, H. J., Hop, C. E., Keohane, C. A., Umbenhauer, D. R. (1999). Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 27(5), 581–587.
103. Laing, R., Gillan, V., Devaney, E. (2017). Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33, 463–472. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>
104. Lankas, G. R., Gordon, L. R. (1989). Ivermectin and Abamectin. *Toxicology*. In: Campbell WC, ed (pp. 89–112). New York: Springer.
105. Lim, S. C. L., Hor, C. P., Tay, K. H., Mat Jelani, A., Tan, W. H., Ker, H. B., Seman, N. (2022). Efficacy of Ivermectin Treatment on Disease Progression Among Adults With Mild to Moderate COVID-19 and Comorbidities. *JAMA Internal Medicine*, 182(4), 426. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2022.0189>
106. Lin, J. H., Yamazaki, M. (2003). Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1), 59–98. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342010-00003>
107. Liu, X. (2019). Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions and Their Significance. In: Liu, X., Pan, G. (eds) *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_5
108. Lo, P.-K. A., Fink, D. W., Williams, J. B., Blodinger, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin: Effects of formulation. *Veterinary Research Communications*, 9(1), 251–268. <https://doi.org/10.1007/BF02215150>
109. Loeb, W. F., Quimby, F. (1999). *Clinical Chemistry of Laboratory Animals* (2nd ed.).
110. López-Medina, E., López, P., Hurtado, I. C., Dávalos, D. M., Ramirez, O., Martínez, E., Caicedo, I. (2021). Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms among Adults with Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 325(14), 1426–1435. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3071>
111. López-Olvera, J. R., Höfle, U., Vicente, J., Fernández-de-Mera, I. G., Gortázar, C. (2006). Effects of parasitic helminths and ivermectin treatment on clinical parameters in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Parasitology Research*, 98(6), 582–587. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0099-2>
112. Ismail, M.M., Jayakody, R.L. (1999). Efficacy of albendazole and its combinations with ivermectin or diethylcarbamazine (DEC) in the treatment of *Trichuris trichiura* infections in Sri Lanka. *Annals of Tropical Medicine And Parasitology*, 93(5), 501–504. <https://doi.org/10.1080/00034989958230>
113. Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14–nsp10 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9436–9441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508686112>

114. Maizels, R. M., Lawrence, R. A. (1991). Immunological tolerance: The key feature in human filariasis? *Parasitology Today*, 7(10), 271–276. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90093-4)
115. Marjanović, V., Medić, D., Marjanović, Đ. S., Andrić, N., Petrović, M., Francuski Andrić, J., Trailović, S. M. (2024). High Doses Of Ivermectin Cause Toxic Effects After Shortterm Oral Administration in Rats. *Slovenian Veterinary Research* 61(4), 281-290. <https://doi.org/10.26873/SVR-2069-2024>
116. Marty, F. M., Lowry, C. M., Rodriguez, M., Milner, D. A., Pieciak, W. S., Sinha, A., Baden, L. R. (2005). Treatment of Human Disseminated Strongyloidiasis with a Parenteral Veterinary Formulation of Ivermectin. *Clinical Infectious Diseases*, 41(1), e5–e8. <https://doi.org/10.1086/430827>
117. Ménez, C., Sutra, J.-F., Prichard, R., Lespine, A. (2012). Relative Neurotoxicity of Ivermectin and Moxidectin in Mdr1ab (–/–) Mice and Effects on Mammalian GABA(A) Channel Activity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1883. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001883>
118. MERCK CO., INC. (1979). Acute oral toxicity study in rats. TT #78–3087. *Unpublished Study*.
119. Meyers, J. I., Gray, M., Kuklinski, W., Johnson, L. B., Snow, C. D., Black, W. C., Foy, B. D. (2015). Characterization of the target of ivermectin, the glutamate-gated chloride channel, from *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*, 218(10), 1478–1486. <https://doi.org/10.1242/jeb.118570>
120. Misaka, S., Müller, F., Fromm, M. F. (2013). Clinical relevance of drug efflux pumps in the gut. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.010>
121. Mody, V., Ho, J., Wills, S., Mawri, A., Lawson, L., Ebert, M. C. C. J. C., Taval, S. (2021). Identification of 3-chymotrypsin like protease (3CLPro) inhibitors as potential anti-SARS-CoV-2 agents. *Communications Biology*, 4(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01577-x>
122. Mohan, A., Tiwari, P., Suri, T. M., Mittal, S., Patel, A., Jain, A., Guleria, R. (2021). Single-dose oral ivermectin in mild and moderate COVID-19 (RIVET-COV): A single-centre randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(12), 1743–1749. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.08.021>
123. Molento, M. B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C., Prichard, R. (2004). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, 92(2), 121–127. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1022-3>
124. Moncayo, A. L., Vaca, M., Amorim, L., Rodriguez, A., Erazo, S., Oviedo, G., Cooper, P. J. (2008). Impact of Long-Term Treatment with Ivermectin on the Prevalence and Intensity of Soil-Transmitted Helminth Infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e293. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000293>
125. Mordi, I. R., Chan, B. K., Yanez, N. D., Palmer, C. N. A., Lang, C. C., Chalmers, J. D. (2020). Genetic and pharmacological relationship between P-glycoprotein and increased cardiovascular risk associated with clarithromycin prescription: An epidemiological and genomic population-based cohort study in Scotland, UK. *PLOS Medicine*, 17(11), e1003372. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003372>
126. Moreno, Y., Nabhan, J. F., Solomon, J., Mackenzie, C. D., Geary, T. G. (2010). Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 20120–20125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011983107>
127. Munić, V., Kelnerić, Ž., Mikac, L., Eraković Haber, V. (2010). Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-

- 123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1), 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.016>
128. Naggie, S., Boulware, D. R., Lindsell, C. J., Stewart, T. G., Gentile, N., Collins, S., Zaleski, N. (2022). Effect of Ivermectin vs Placebo on Time to Sustained Recovery in Outpatients With Mild to Moderate COVID-19. *JAMA*, 328(16), 1595-1603. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.18590>
129. Naggie, S., Boulware, D. R., Lindsell, C. J., Stewart, T. G., Slandzicki, A. J., Lim, S. C., Passamani, G. (2023). Effect of Higher-Dose Ivermectin for 6 Days vs Placebo on Time to Sustained Recovery in Outpatients With COVID-19. *JAMA*, 329(11), 888-897. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.1650>
130. Nakanishi, T., Tamai, I. (2015). Interaction of Drug or Food with Drug Transporters in Intestine and Liver. *Current Drug Metabolism*, 16(9), 753–764. <https://doi.org/10.2174/138920021609151201113537>
131. National Institutes of Health. (2023). *Ivermectin, COVID-19 Treatment Guidelines*. Retrieved from <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/miscellaneous-drugs/ivermectin/>
132. Nau, R., Sörgel, F., Eiffert, H. (2010). Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 858–883. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-10>
133. Nguyen, C., Burton, T., Kuklinski, W., Gray, M., Foy, B. (2015). Ivermectin for the Control of West Nile Virus Transmission. *New Horizons in Translational Medicine*, 2, 127. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2015.07.043>
134. Niedowicz, D. M., Daleke, D. L. (2005). The Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(2), 289–330. <https://doi.org/10.1385/CBB:43:2:289>
135. Niemi, M., Neuvonen, P. J., Kivistö, K. T. (2001). The cytochrome P4503A4 inhibitor clarithromycin increases the plasma concentrations and effects of repaglinide. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70(1), 58–65. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.116511>
136. Nistiar, F., Racz, O., Lukacinova, A., Hubkova, B., Novakova, J., Lovasova, E., Sedlakova, E. (2012). Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(9), 1224–1233. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.672071>
137. Nofal, A. (2009). Variable response of crusted scabies to oral ivermectin: report on eight Egyptian patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23(7), 793–797. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03177.x>
138. Nogrado, K., Adisakwattana, P., Reamtong, O. (2023). Human gnathostomiasis: A review on the biology of the parasite with special reference on the current therapeutic management. *Food and Waterborne Parasitology*, 33. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2023.e00207>
139. Ochs, H. R., Knfichel, M. (1984). Klinische Wochen-schrift Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability of Diltiazem in Humans* **. In *Klin Wochenschr*, 2, 62(7), 303-306. <https://doi.org/10.1007/BF01716446>
140. Ogbuokiri, J. E., Ozumba, B. C., Okonkwo, P. O. (1994). Ivermectin levels in human breast milk. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 46(1), 89-90. <https://doi.org/10.1007/BF00195923>
141. Okonkwo, P. O., Ogbuokiri, J. E., Ofoegbu, E., Klotz, U. (1993). Protein binding and ivermectin estimations in patients with onchocerciasis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 53(4), 426–430. <https://doi.org/10.1038/clpt.1993.46>

142. Oksanen, A., Norberg, H., Nieminen, M., Bernstad, S. (1995). Influence of route of administration on the plasma concentrations of ivermectin in reindeer. *Research in Veterinary Science*, 58(3), 286–287. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90120-5)
143. Omura, S. (2008). Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(2), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.08.023>
144. Omura, S., Crump, A. (2014). Ivermectin: Panacea for resource-poor communities? *Trends in Parasitology*, 30, 445–455. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.005>
145. Omura, S., Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin — a success story. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 984–989. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1048>
146. Oscanoa, T. J., Amado, J., Romero-Ortuno, R., Carvajal, A. (2022). Hepatic disorders associated with the use of Ivermectin for SARS-CoV-2 infection in adults: a pharmacovigilance study in VigiBase. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 15(4), 426–429. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v15i4.2383>
147. Ottesen, E. A., Campbell, W. (1994). Ivermectin in human medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34(2), 195–203. <https://doi.org/10.1093/jac/34.2.195>
148. Papich, M. G. (2021). *Papich Handbook of Veterinary Drugs* (5th ed.). Elsevier.
149. Patel, S., Patel, S., Kotadiya, A., Patel, S., Shrimali, B., Joshi, N., Jain, M. (2024). Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats. *Laboratory Animal Research*, 40(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s42826-024-00194-7>
150. Paul, A. J., Tranquilli, W. J., Seward, R. L., Todd, K. S., DiPietro, J. A. (1987). Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, 48(4), 684–685.
151. Paul, A. J., Tranquilli, W. J., Todd, K. S., Wallace, D. H., Soll, M. (1991). Evaluating the safety of administering high doses of a chewable ivermectin tablet to Collies. *Veterinary Medicine*, 623–625.
152. Peña-Silva, R., Duffull, S. B., Steer, A. C., Jaramillo-Rincon, S. X., Gwee, A., Zhu, X. (2021). Pharmacokinetic considerations on the repurposing of ivermectin for treatment of COVID-19. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87, 1589–1590. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bcp.14476>
153. Perloff, M. D., Störmer, E., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J. (2003). Rapid assessment of P-glycoprotein inhibition and induction in vitro. *Pharmaceutical Research*, 20(8), 1177–1183. <https://doi.org/10.1023/A:1025092829696>
154. Pinto, A. G., Horlander, J., Chalasani, N., Hamman, M., Asghar, A., Kolwankar, D., Hall, S. D. (2005). Diltiazem inhibits human intestinal cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in vivo without altering the expression of intestinal mRNA or protein. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 59(4), 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02343.x>
155. Pinto, A. G., Wang, Y. H., Chalasani, N., Skaar, T., Kolwankar, D., Gorski, J. C., Hall, S. D. (2005). Inhibition of human intestinal wall metabolism by macrolide antibiotics: Effect of clarithromycin on cytochrome P450 3A4/5 activity and expression. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 77(3), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.10.002>
156. Plumb, D. C. (2008). *Plumb's Veterinary Drug Handbook* (6th ed.). Vancouver: Blackwell Publishing.
157. Popović, N., Morales-Delgado, N., Vidal Mena, D., Alonso, A., Pascual Martínez, M., Caballero Bleda, M., Popović, M. (2020). Verapamil and Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00562>
158. Radostits, O. M., Blood, D. C., Gay, C. C. (1994). *Veterinary Medicine, a Text Book of the Disease of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses* (8th ed.). London,: Bailliere, Tindall,.

159. Ranque, S., Chippaux, J. P., Garcia, A., Boussinesq, M. (2001). Follow-up of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in children living in a community treated with ivermectin at 3-monthly intervals. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol*, 95(4):389-93. doi: 10.1080/00034980120065822. PMID: 11454248.
160. Ravikirti, Roy, R., Pattadar, C., Raj, R., Agarwal, N., Biswas, B., Sarfaraz, A. (2021). Evaluation of Ivermectin as a Potential Treatment for Mild to Moderate COVID-19: A Double-Blind Randomized Placebo Controlled Trial in Eastern India. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 24, 343–350. <https://doi.org/10.18433/jpps32105>
161. Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews*, 34(1–2), 83–448. <https://doi.org/10.1081/DMR-120001392>
162. Rendic, S., Guengerich, F. P. (2020). Metabolism and Interactions of Chloroquine and Hydroxychloroquine with Human Cytochrome P450 Enzymes and Drug Transporters. *Current Drug Metabolism*, 21(14), 1127–1135. <https://doi.org/10.2174/1389200221999201208211537>
163. Rendic, S. (2021). Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. *Archives of Toxicology*, 95, 1535–1546. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03025-z>
164. Renton, K. W. (1985). Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by the calcium channel blockers diltiazem and verapamil. *Biochemical Pharmacology*, 34(14), 2549–2553. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90541-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90541-6)
165. Riviere, J. E., Papich, M. G. (1995). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. The Iowa State University Press. Ames.
166. Riviere, J. E., Papich, M. G. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (10th ed.). Inc. USA: JohnWiley & Sons.
167. Rodvold, K. A. (1999). *Clinical Pharmacokinetics of Clarithromycin*. Chicago, Illinois, USA.
168. Ronacalli, R. A., Sutherland, I. H. (1986). The use of ivermectin indictable against *Psoroptes ovis*, in sheep. *31st Annual Meeting American Association of Vet. Parsitol.*,.
169. Roncalli, R. A. (1984). The biology and the control of , the tropical warble-fly of Latin America. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1–4), 569–578. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90103-X](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90103-X)
170. Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*, 97(11), 2517–2524. <https://doi.org/10.1172/JCI118699>
171. Simunovic, S., Jankovic, S., Baltic, T., Nikolic, D. D.-S., Lukic, M., Parunovic, N. (2019). Histamine in Canned and Smoked Fishery Products Sold in Serbia. *Meat Technology*, 60(1), 8–16. <https://doi.org/10.18485/meattech.2019.60.1.2>
172. Stephen G. Aller, Jodie Yu, Andrew Ward, Yue Weng, Srinivas Chittaboina, Rupeng Zhuo, Geoffrey Chang. (2009). Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 323, 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/science.1112596>
173. Strickland, R. K., Gerrish, R. R. (1987). Infestivity of *Psoroptes ovis* on ivermectin-treated cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 48(3), 342–344.
174. Strycharz, J. P., Berge, N. M., Alves, A.-M., Clark, J. M. (2011). Ivermectin Acts as a Posteclosion Nymphicide by Reducing Blood Feeding of Human Head Lice (Anoplura: Pediculidae) That Hatched From Treated Eggs. *Journal of Medical Entomology*, 48(6), 1174–1182. <https://doi.org/10.1603/ME11051>

175. Suckow, M., Weisbroth, S., Franklin, C. (2006). *The Laboratory Rat, A volume in American College of Laboratory Animal Medicine* (Second Edition). Elsevier Inc. . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-074903-4.X5000-6>
176. Sugie, M., Asakura, E., Zhao, Y. L., Torita, S., Nadai, M., Baba, K., Hasegawa, T. (2004). Possible Involvement of the Drug Transporters P Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Mrp2 in Disposition of Azithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 809–814. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.809-814.2004>
177. Suputtamongkol, Y., Premasathian, N., Bhumimuang, K., Waywa, D., Nilganuwong, S., Karuphong, E., Silpasakorn, S. (2011). Efficacy and Safety of Single and Double Doses of Ivermectin versus 7-Day High Dose Albendazole for Chronic Strongyloidiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1044. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001044>
178. Suwalsky, M., Muñoz, M., Mennickent, S., Sotomayor, C. P., Bolognin, S., Zatta, P. (2010). Structural effects of verapamil on cell membranes and molecular models. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(1). <https://doi.org/10.4067/S0717-97072010000100002>
179. Swargiary, A. (2020). Ivermectin as a promising RNA-dependent RNA polymerase inhibitor and a therapeutic drug against SARS-CoV2: Evidence from in silico studies. *Research square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-73308/v1>
180. Takahashi, Y., Matsumoto, A., Seino, A., Ueno, J., Iwai, Y., Omura, S. (2002). *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2163–2168. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2163>
181. Temple, C., Hoang, R., Hendrickson, R. G. (2021). Toxic Effects from Ivermectin Use Associated with Prevention and Treatment of Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 385(23), 2197–2198. <https://doi.org/10.1056/nejmc2114907>
182. Tiphara, P., Kobylinski, K. C., Godejohann, M., Hanboonkunupakarn, B., Roth, A., Adams, J. H., Tarning, J. (2021). Identification of the metabolites of ivermectin in humans. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/prp2.712>
183. Toutain, P. L., Campan, M., Galtier, P., Alvinerie, M. (1988). Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of dairy cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11(3), 288–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1988.tb00155.x>
184. Trailović S. M. (2001). Ispitivanje mehanizama neurotoksičnog delovanja ivermektina. (*doktorska disertacija*). Fakultet veterinarske medicine. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
185. Trailović, S.M., Ivanović, S.R., Varagić, V.M. (2011). Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.016>
186. Turner, M.J., Schaeffer, J.M. (1989). Mode of Action of Ivermectin. In: Campbell, W.C. (eds) *Ivermectin and Abamectin*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_5
187. Utu-Baku, A. B. (2009). Effect of Therapeutic and Toxic Doses of Ivermectin (Mectizan) on Total Serum Proteins and Hepatic Enzymes of Wistar Albino Rats. *International Journal of Biological Chemistry*, 142–147.
188. Van Westerloo, D. J., Landman, G. W., Prichard, R., Lespine, A., Visser, L. G. (2014). Persistent Coma in Strongyloides Hyperinfection Syndrome Associated With Persistently Increased Ivermectin Levels. *Clinical Infectious Diseases*, 58(1), 143–144. <https://doi.org/10.1093/cid/cit656>
189. Varagić, V., Milošević, M. (2001). *Farmakologija* (16th ed.). Beograd: Elit, Medica.

190. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155–170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
191. Tolan, J. W., Eskola, P., W. Fink, D., Mrozik, H., Zimmerman, L. A. (1980). Determination of avermectins in plasma at nanogram levels using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 190(2), 367–376. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88241-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88241-2)
192. Wang, L., Sun, Y. (2020). Efflux mechanism and pathway of verapamil pumping by human P-glycoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 696. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108675>
193. Wang, Y. H., Jones, D. R., Hall, S. D. (2004). Prediction of cytochrome p450 3a inhibition by verapamil enantiomers and their metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, 32 (2), 259–266.
194. Weil, G. J., Bogus, J., Christian, M., Dubray, C., Djuardi, Y., Fischer, P. U., Subramanian, S. (2019). The safety of double- and triple-drug community mass drug administration for lymphatic filariasis: A multicenter, open-label, cluster-randomized study. *PLOS Medicine*, 16(6), e1002839. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002839>
195. Whelan, M., Kinsella, B., Furey, A., Moloney, M., Cantwell, H., Lehotay, S. J., Danaher, M. (2010). Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *Journal of Chromatography A*, 1217(27), 4612–4622. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.007>
196. Wolstenholme AJ, Rogers AT (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 31, S85-95. doi: 10.1017/S0031182005008218. PMID: 16569295.
197. World Health Organisation. (2022). Onchocerciasis. Retrieved May 25, 2024, from World Health Organisation website: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/onchocerciasis>
198. World Health Organisation. (2023). Lymphatic filariasis. Retrieved May 25, 2024, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>
199. Wright, F. C., Guillot, F. S. (1984). Effect of ivermectin in heifers on mortality and egg production of *Psoroptes ovis*. *American Journal of Veterinary Research*, 45(10), 2132–2134.
200. Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
201. Xu, D., Wu, Y., Liao, Z.-X., Wang, H. (2007). Protective effect of verapamil on multiple hepatotoxic factors-induced liver fibrosis in rats. *Pharmacological Research*, 55(4), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.12.003>
202. Xu, Q., Zhang, C., Lu, J., Qian, H., Wang, X., Guo, W., Cheng, H. (2024). Azithromycin induces liver injury in mice by targeting the AMPK/Nrf2 pathway. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 46(6), 850–860. <https://doi.org/10.1080/08923973.2024.2415115>
203. Yagisawa, M., Foster, P. J., Hanaki, H., Omura, S. (2021). Global trends in clinical studies of ivermectin in COVID-19. *The Japanese Journal of Antibiotics* 77, 1, 45-92 https://doi.org/10.11553/antibiotics.77.1_45
204. Zeng, Z., Andrew, N. W., Arison, B. H., Luffer-Atlas, D., Wang, R. W. (1998). Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica*, 28(3), 313–321. <https://doi.org/10.1080/004982598239597>

BIOGRAFIJA

Vladimir Marjanović upisao je studijski program farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu u školskoj 2005/2006. godini, gde je stekao čvrstu osnovu u oblasti farmaceutskih nauka. Nakon uspešno završenih osnovnih studija, master akademske studije okončao je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,39. Njegova dalja edukacija obuhvatila je specijalističke akademske studije „Industrijska farmacija“ na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, koje je završio 2013. godine, kao i specijalističke akademske studije iz Kozmetologije, okončane 2017. godine, dodatno obogaćujući svoje znanje i veštine u ovoj dinamičnoj oblasti. Stručni ispit položio je 2014. godine u Ministarstvu zdravlja, što mu je omogućilo da aktivno doprinosi svojoj profesiji.

Tokom školske 2019/2020. godine, upisao je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, čime je pokazao svoju ambiciju za daljim usavršavanjem i istraživačkim radom.

Od 20. maja 2014. godine, zaposlen je u Veterinarskom specijalističkom institutu “Niš”, gde obavlja funkciju stručnog saradnika za distribuciju vakcina i lekova u Odeljenju za distribuciju bioloških proizvoda i lekova. Tokom perioda od 2014. do 2017. godine, vršio je funkciju saradnika za kvalitet, a od oktobra 2017. godine do danas, obavlja dužnost predstavnika rukovodstva za sistem menadžmenta, gde se fokusirao na kontinuirano unapređenje sistema menadžmenta kvalitetom.

U izazovnom periodu 2020. godine, učestvovao je u organizovanju poslova dijagnostikovanja virusa Covid-19, značajno doprinosivši javnozdravstvenim naporima u pružanju adekvatne zdravstvene zaštite građanima. Njegova karijera obeležena je izvanrednom posvećenošću, profesionalizmom i stručnim doprinosom u oblastima farmacije i veterinarske medicine, čime se afirmisao kao značajan član svoje profesionalne zajednice.

Otac je Arsenija i Iline.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani **Vladimir Z. Marjanović**
Broj upisa 2019/5007

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

Interakcija ivermektina sa lekovima modulatorima aktivnosti P-glikoproteinskih transportnih sistema i enzima citohroma P450 kao uzrok ispoljavanja njegove toksičnosti

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.03.2025. god.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Vladimir Z. Marjanović**

Broj upisa **2019/5007**

Studijski program **Doktorske akademske studije**

Naslov rada **Interakcija ivermektina sa lekovima modulatorima aktivnosti P-glikoproteinskih transportnih sistema i enzima citohroma P450 kao uzrok ispoljavanja njegove toksičnosti**

Mentor 1. **Dr Saša M. Trailović, redovni profesor**

Mentor 2. **Dr Nenad D. Andrić, vanredni profesor**

Potpisani **Vladimir Z. Marjanović**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 26.03.2025. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Interakcija ivermektina sa lekovima modulatorima aktivnosti P-glikoproteinskih transportnih sistema i enzima citohroma P450 kao uzrok ispoljavanja njegove toksičnosti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priloziima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 26.03.2025. god.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.