



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu



Filip Štrbac, dr vet. med.

**ANTIHELMINTIČKA EFIKASNOST ODABRANIH ETARSKIH
ULJA PROTIV GASTROINTESTINALNIH NEMATODA
OVACA**

- Doktorska disertacija -

Novi Sad, 2022.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Departman za veterinarsku medicinu



**ANTIHELMINTIČKA EFIKASNOST ODABRANIH ETARSKIH
ULJA PROTIV GASTROINTESTINALNIH NEMATODA
OVACA**

- Doktorska disertacija -

Mentor:

Prof. dr Dragica Stojanović

Kandidat:

Filip Štrbac, dr vet. med.

Novi Sad, 2022.

ZAHVALNICA

Ponekad u životu je teško pronaći prave reči. Pokušaću da se ovim putem zahvalim svima koji su na bilo koji način pomogli i doprineli realizaciji eksperimentalnog dela, kao i samoj izradi doktorske disertacije. Puno ljudi iz nekoliko institucija je učestvovalo, te se unapred izvinjavam ukoliko nekog zaboravim...

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

- Prof. dr Dragici Stojanović, mom mentoru ali i prijatelju, koja me je vodila kroz ove doktorske studije i dala svoj maksimalni doprinos uspešnoj realizaciji ove naučne avanture;

- Prof. dr Nikolini Novakov i prof. dr Nadi Plavši, na savetima, sugestijama i nesebičnom doprinosu završetku izrade ove disertacije.

Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Srbija

- dr Radomiru Ratajcu, komentoru, na svim nesebičnim savetima, sugestijama, pomoći i podršci tokom svih faza ovog doktorata;

- dr Ivanu Pušiću, koji je inicijalno omogućio kontakt sa kolegama iz Italije i put u Napulj;

- dr Jasni Prodanov-Radulović, na savetima prilikom aplikacije za COST akciju KOMBAR.

Departman za veterinarsku medicinu i animalnu proizvodnju, Univerzitet u Napulju Federiko II, kao i Regionalni centar za praćenje parazitoza KREMOPAR, Eboli (SA), Italija

- Prof. dr Lauri Rinaldi na omogućavanju sprovođenja in vitro, in vivo eksperimenta, studija toksičnosti i koprokulture kao i na svim savetima;

- Prof. dr Đuzepe Kringoliju, na omogućavanju sprovođenja istraživanja i obezbeđivanju adekvatnih uslova;

- dr Antoniu Bosku, dragom kolegi na pomoći u praktično svim fazama eksperimentalnog dela disertacije, kao i na nesebičnom deljenju praktičnog znanja;

- Ostalim kolegama, naučnicima, istraživačima, doktorandima i zaposlenima iz Regionalnog centra KREMOPAR: Mireli, Davidu, Paoli, Fabiu, Đuzepeu, Mariu, Frančesku, Sari, Eleni, Mariji-Paoli...

Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

- Prof. dr Nataši Simin, na pomoći prilikom nabake etarskih ulja, kao i pri analizi njihovog hemijskog sastava, ali i na svim drugim savetima pruženim tokom mojih doktorskih studija;

- Prof. dr Dejanu Orčiću, na pomoći prilikom nabave etarskih ulja, kao i pri analizi njihovog hemijskog sastava.

Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Srbija

- dr Slobodanu Krnjajiću, na pomoći prilikom nabavke etarskih ulja, kao i na savetima i sugestijama tokom eksperimentalnog dela disertacije.

COST Akcija COMBAR (Combating Anthelmintic Resistance in Ruminants), CA16230

- Hvala i svim ljudima iz ove COST akcije koji su mi omogućili prvo istraživanje u Italiji, odnosno realizaciji kratkoročne naučne misije pod imenom (STSM): „Metodologija dijagnostike parazitskih infekcija i metode za procenu efikasnosti antiparazitskih lekova“

- dr María Martínez-Valladares, STSM koordinatoru koja je odobrila ovaj STSM

- dr Smaro Sotiraki, na odobravanju finansijske podrške za realizaciju STSM-a

- dr Johannes Charlier, predsedavajućem COST akcije

Ministarstvu Prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

- Hvala Ministarstvu na obezbeđivanju finansijske podrške tokom čitavih mojih doktorskih studija u vidu stipendije za doktorande, ali i na drugim konkretnim stvarima poput sufinansiranja mog drugog boravka u Italiji.

Ali.... Posebno hvala najbližima...

Mojoj porodici, sinu Kostu i supruzi Tijani, na velikom razumevanju i podršci.

Roditeljima Anici i Peri i sestri Mirni, na podršci ne samo tokom ovog perioda, već i tokom čitavog života.

Ženinoj porodici odnosno Nebojši, Seleni, Borisu i baka Džamili, kao i

Prijateljima pre svih Strahinji, ali i svim drugim dragim prijateljima i kolegama iz različitih oblasti.

Hvala Vam svima na nesebičnoj podršci tokom svih ovih godina. Bez vas ovo ne bi bilo moguće!

„Obrazovanje je najmoćnije oružje koje možete upotrebiti da promenite svet“ - Nelson Mandela

Doktorat posvećujem sinu Kostu i majci Anici.

ACKNOWLEDGEMENT

Sometimes in life, it is hard to find the right words. I will try to thank everyone who, in different ways, helped me and contributed to the realization of the experimental part, as well as to the preparation of the doctoral dissertation. A lot of people from several institutions participated, so I apologize in advance if I forget someone...

Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Serbia

- Prof Dragica Stojanović, my supervisor but also a friend, who guided me through these PhD studies and gave her maximum contribution to the successful realization of this scientific adventure;

- Prof Nikolina Novakov and Prof Nada Plavša, for their advice, suggestions and selfless contribution to the completion of this dissertation.

Scientific Institute of Veterinary Medicine, Novi Sad, Serbia

- Dr Radomir Ratajac, the co-supervisor, for all his unselfish advice, suggestions, help and support during all phases of this PhD;

- Dr Ivan Pušić, who initially facilitated contact with colleagues from Italy and the trip to Naples;

- Dr Jasna Prodanov-Radulović, on advice during the application for the COST action COMBAR.

Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Naples Federico II, as well as the Regional Center for the Monitoring of Parasitosis CREMOPAR, Eboli (SA), Italy

- Prof Laura Rinaldi for facilitating the implementation of in vitro, in vivo experiments, toxicity and coproculture studies, as well as for all advice;

- Prof Giuseppe Cringoli, for facilitating the conduction of studies and providing adequate conditions;

- Dr Antonio Bosco, dear colleague, for his help in practically all phases of the experimental part of the PhD, as well as for selflessly sharing practical knowledge;

- To other colleagues, scientists, researchers, PhD students and employees from the CREMOPAR Regional Center: Mirela, David, Paola, Fabio, Giuseppe, Mario, Francesco, Sarah, Elena, Maria-Paola...

Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Science, University of Novi Sad, Serbia

- Prof Nataša Simin, for the help with the procurement of essential oils, as well as with the analysis of their chemical composition, but also for all the other advice provided during my PhD studies;

- Prof Dejan Orčić, for the help with the procurement of essential oils, as well as with the analysis of their chemical composition.

Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Serbia

- Dr Slobodan Krnjajić, for the help with the procurement of essential oils, as well as for advice and suggestions during the experimental part of the dissertation.

COST Action COMBAR (Combating Anthelmintic Resistance in Ruminants), CA16230

- Thanks to all the people from this COST action who made possible my first research in Italy, i.e. the realization of a short-term scientific mission (STSM) entitled: "The methodology of the diagnostics of parasitic infections and methods for evaluating the efficacy of antiparasitic drugs"

- Dr María Martínez-Valladares, STSM coordinator for approving this STSM;
- Dr Smaro Sotiraki, for approving financial support for the realization of this STSM;
- Dr Johannes Charlier, MC Chair of the COST action.

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia

- Thanks to the Ministry for providing me financial support throughout my PhD studies in the form of a scholarship for PhD students, but also for other certain things such as co-financing my second trip to Italy.

But.... Special thanks to the

*My family, son Kosta and wife Tijana, for their great understanding and support;
My parents, Anica and Pero and sister Mirna, for their support not only during this period but also throughout life;*

*Wife's family, namely Nebojša, Selena, Boris and grandmother Jamila, as well as
All of my friends, Strahinja above all, but also other dear friends and colleagues from different fields.*

Thank you all for your selfless support during all these years. Without you, this would not be possible!

"Education is the most powerful weapon you can use to change the world" - Nelson Mandela

I dedicate my PhD to my son Kosta and mother Anica

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

ОБРАЗАЦ – 5а

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Филип Штрбац
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Драгица Стојановић, редовни професор, Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Антихелминтичка ефикасност одабраних етарских уља против гастроинтестиналних нематода оваца
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 128 Поглавља 9 Референци 224 Табела 14 Слика 18 Графикона 15 Прилога 0
Научна област:	Ветеринарске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фармакологија и токсикологија
Кључне речи / предметна одредница:	Етарска уља, Гастроинтестиналне нематодe оваца, Антихелминтичка резистенција, Интегрисана контрола
Резиме на језику рада:	Гастроинтестиналне нематодe (ГИН) у данашње време представљају једног од највећих здравствених и економских проблема код малих преживара. Контрола ових паразита се углавном заснива на примени комерцијалних препарата. Међутим, њихова нерационална употреба у смислу учесталих третмана, ниских или високих доза или континуиране употребе једног лека је довела до развоја антихелминтичке резистенције (АР). Савремене стратегије борбе против АР подразумевају рационалну употребу ових лекова, уз коришћење различитих алтернатива попут ботаничких антихелминтика. Циљеви ових истраживања су били испитати антихелминтичку активност одабраних етарских уља (EOs) против ГИН оваца и сигурност њихове примене, одредити факторе који утичу на активност, као и оценити могућност примене испитиваних формулација у ветеринарској пракси као алтернативне методе у борби против АР. Испитивање је вршено у две фазе (истраживања), током 2019. и 2021. године, при чему је у првом испитано 12 узорака уља а у другом

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не коришће се са тезом.

	<p>11 (од чега су три иста као и у претходној фази, односно два од истог произвођача, једно од другог). Хемијски састав уља је одређен помоћу гасне хроматографије и масене спектрометрије (<i>GC-MS</i> анализе). <i>In vitro</i> овицидна активност је испитана уз помоћ теста излегања ларви (енг. <i>egg hatch test, EHT</i>), у првом истраживању при шест различитих концентрација за свако испитано уље (50, 12,5, 3,125, 0,781, 0,195 и 0,049 мг/мл), а у другом су поред наведених додате још две ниже концентрације (0,025 и 0,0125 мг/мл). За прво <i>in vivo</i> истраживање су одабрани уље тимијана (тип 1) и синергистичка комбинација линалоол:естрагол, а за друго уље оригана, питоме нане и ртањског чаја. Ефикасност уља је испитана уз помоћ теста редукције броја јаја у фецесу (енг. <i>faecal egg count reduction test, FECRT</i>), при чему су <i>EOs</i> разблажена у сунцокретовом уљу а формулације апликоване једнократно, перорално животињама у различитим групама, у првом истраживању при дози од 100 мг/кг, а у другом 150 мг/кг. Токсични ефекти <i>in vivo</i> примењених формулација су испитани путем клиничког прегледа тестираних животиња, а у другом истраживању и анализом хематолошких и биохемијских параметара крви у циљу процене ефеката на крвну слику, функцију јетре и бубрега. За огледе су коришћене две фарме у јужној Италији, где је у оба истраживања путем копрокултуре одређено присуство ГИН код оваца, а присутни родови идентификовани уз помоћ одговарајућих кључева детерминације. Резултати <i>GC-MS</i> анализа су показали сложен хемијски састав тестираних етарских уља са једињењима чији се број кретао од 10-35, и која припадају различитим хемијским групама (терпени, терпеноиди и фенилпропаноидна једињења). Највишу овицидну активност на <i>EHT</i> су у првом истраживању показала уља оригана, ртањског чаја и морача са максималним инхибиторним ефектом на излегање ларви (100%) при свим тестираним концентрацијама, а поред њих и чубар (99,3-100%), оба узорка тимијана (тимијан 1, 95,3-100% и тимијан 2, 98,5-100%), клека (81-96,8%) и питома нана (72,5-99,8%). У другом истраживању је због нешто другачије припреме концентрација (методом разблаживања) ефекат био знатно више дозно-завистан, али је уље оригана било поново најефикасније (71,3-93,3%), а потом милодух (42,7-91,3%), коријандер (29-92,7%), босиљак (23,3-93,3%), питома (20-90,3%) и дивља нана (13-92,7%). Када је у питању <i>FECRT</i>, у првом истраживању постигнут је одређен антихелминтички ефекат са укупном редукцијом броја јаја нематода од 25,23% и 24,42% (тимијан) и 24,91% и 25,90% (линалоол:естрагол), али је ефекат био бољи код уља из другог истраживања с обзиром на апликацију формулација директно у румен животиња, односно 43,21% и 60,13% (оригано), 26,86 и 46,04% (питома нана) и 15,66% и 33,00% (ртањски чај), 7. и 14. дана након третмана. Ни за једно од примењених уља, при тестирањем дозама, нису забележени никакви нежељени или токсични ефекти приликом клиничког прегледа односно хематолошких и биохемијских анализа крви, што говори у прилог безбедности њихове употребе код оваца. Показана ефикасност испитаних уља потиче од једињења која улазе у њихов састав, односно пре свих карвакрола, анетола, тимола, р-цимена, γ-терпинена, карвона, линалоола, ментола, α-тујона и цис-пинокамфона, имајући у виду њихову заступљеност код најефикаснијих уља. Копрокултуром је при томе на испитиваним фармама у оба истраживања идентификовано присуство четири рода ГИН оваца, <i>Haemonchus</i>, <i>Trichostrongylus</i>, <i>Teladorsagia</i> и <i>Chabertia</i>, чија се процентуална заступљеност у одређеној мери мењала након третмана. Примена биљних формулација укључујући <i>EOs</i> у циљу контроле паразита има више предности. То укључује сложен хемијски састав са биоактивним супстанцама из различитих хемијских</p>
--	--

	<p>група, који доводи до њихове високе антихелминтичке активности, као и потенцијално нижег степена развоја резистенције. Технике инкапсулације или вишеструка примена током неколико узастопних дана при томе нуде могућност додатног повећања ефикасности у теренским условима. Са друге стране, природно порекло ових формулација може допринети и њиховој нижој токсичности за животиње, мањим количинама резидуа у меду и млеку и бољој еколошкој прихватљивости у поређењу са комерцијалним препаратима. У сваком случају, добијени резултати говоре у прилог могућности коришћења испитаних <i>EOs</i> у пракси, посебно оригана, у интегрисаном приступу контроле у циљу смањења употребе комерцијалних препарата и успоравања развоја резистенције.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	26.07.2021.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Ментор: Проф. др Драгица Стојановић</p> <p>Председник: Проф. др Нада Плавша</p> <p>Члан: Проф. др Николина Новаков</p> <p>Члан: др Радомир Ратајац</p> <p>Члан: др Иван Пушић</p>
Напомена:	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Filip Štrbac
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr Dragica Stojanović, full professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Thesis title:	Anthelmintic efficacy of selected essential oils against gastrointestinal nematodes of sheep
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages 128 Chapters 9 References 224 Tables 14 Illustrations 18 Graphs 15 Appendices 0
Scientific field:	Veterinary medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Pharmacology and toxicology
Subject, Key words:	Sheep gastrointestinal nematodes, Anthelmintic resistance, Essential oils, Integrated control
Abstract in English language:	Gastrointestinal nematodes (GINs) nowadays represent one of the biggest health and economic issues in small ruminants. The control of these parasites is almost exclusively based on the application of commercial drugs. However, their irrational use in terms of frequent treatments, low or high doses or continuous use of one drug has led to the development of anthelmintic resistance (AR). Modern strategies for combating AR are based on the rational use of these drugs, along with the use of various alternatives such as botanical anthelmintics. The aims of these studies were to examine the anthelmintic activity of selected essential oils (EOs) against sheep GINs and the safety of their application, to determine the factors that influence the activity, as well as to evaluate the possibility of applying examined formulations in veterinary practice as an alternative method in combatting AR. The research was conducted in two phases (studies), in 2019. and 2021., whereby 12 oil samples were examined in the first and 11 in the second study (of which three are the same as in the previous study, two from the same manufacturer and one from the other). The chemical composition of the oils was determined by gas

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

chromatography and mass spectrometry (GC-MS analysis). *In vitro* ovicidal activity was tested using the egg hatch test (EHT), in the first instance at six different concentrations for each tested oil (50, 12.5, 3.125, 0.781, 0.195 and 0.049 mg/ml), and in the second, in addition to the above, two lower concentrations (0.025 and 0.0125 mg/ml) were added. Thyme oil (type 1) and the synergistic combination of linalool:estragole in the first, and the oils of oregano, mint and winter savory in the second study were selected for further *in vivo* testing. The efficacy was tested using the faecal egg count reduction test (FECRT), whereby the EOs were diluted in sunflower oil and the formulations were applied once, perorally to animals in different groups, in the first case at a dose of 100 mg/kg and in the second at 150 mg/kg. The toxic effects of the *in vivo* applied formulations were examined through clinical observation of the tested animals, and in the second study also by analyzing the haematological and biochemical blood parameters in order to assess the side effects on the blood count, liver and kidney function. Two farms in southern Italy were used for the experiments, whereby the presence of GINs was determined by coproculture examination, and the present genera were identified with suggested determination keys. The results of GC-MS analyses showed the complex chemical composition of the tested EOs with the number of compounds varying from 10-35, which belong to different chemical groups (terpenes, terpenoids and phenylpropanoid compounds). The highest ovicidal effect in the first EHT was shown by the oils of oregano, winter savory and fennel with the maximum inhibitory effect on the egg hatchability (100%), along with summer savory (99.3-100%), both samples of thyme (sample 1, 95.3-100% and sample 2, 98.5-100%), juniper (81-96.8%) and mint (72.5-99.8%). In the second study, due to a different preparation of concentrations (dilution method), the effect was significantly more dose-dependent, but the most effective oil was again oregano (71.3-93.3%) along with hyssop (42.7-91.3%), coriander (29-92.7%), basil (23.3-93.3%), mint (20-90.3%) and wild mint (13-92.7%). In the first FECRT, a certain anthelmintic effect was achieved with a total reduction in the number of nematode eggs of 25.23% and 24.42% (thyme) and 24.91% and 25.90% (linalool:estragole), but due to the application of the formulations directly in the rumen of animals, the effect was better with oils from the second study, i.e. 43.21% and 60.13% (oregano), 26.86 and 46.04% (mint) and 15.66% and 33.00% (winter savory) on Days 7 and 14, respectively. No toxic or side effects to the sheep were observed for any of the applied oils at the tested doses, neither during the clinical examination of animals nor during haematological and biochemical blood tests, suggesting the safety of their use in sheep. The demonstrated efficacy of the tested oils is related to the compounds that are included in their composition, i.e. above all carvacrol, anethole, thymol, p-cymene, γ -terpinene, carvone, linalool, menthol, α -thujone and cis-pinocamphon, considering their presence in the most effective oils. Four genera of sheep GIN were identified by coproculture examination in both studies, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* and *Chabertia*, whose percentage representation changed to some extent after the treatments. The use of herbal formulations including EOs in parasite control has numerous advantages. That includes a complex chemical composition with bioactive substances from different chemical groups, which leads to high anthelmintic activity, as well as potentially lower susceptibility to AR development. Furthermore, encapsulation techniques or multiple applications over several consecutive days offer the possibility of further increasing the efficacy in field conditions. On the other hand, the natural origin of these formulations may contribute to lower toxicity for animals and smaller amounts of residues in meat and milk, as well as better environmental acceptability in comparison with commercial drugs. The obtained results suggest the possibility of using the tested EOs in practice,

	especially oregano, in an integrated control approach designed to reduce the use of commercial drugs and slow down the development of resistance.
Accepted on Scientific Board on:	26.07.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>Supervisor: Prof. dr Dragica Stojanović _____</p> <p>President: Prof. dr Nada Plavša _____</p> <p>Member: Prof. dr Nikolina Novakov _____</p> <p>Member: Dr Radomir Ratajac _____</p> <p>Member: Dr Ivan Pušić _____</p>
Note:	

REZIME

Gastrointestinalne nematode (GIN) u današnje vreme predstavljaju jednog od najvećih zdravstvenih i ekonomskih problema kod malih preživara. Kontrola ovih parazita se uglavnom zasniva na primeni komercijalnih preparata. Međutim, njihova neracionalna upotreba u smislu učestalih tretmana, niskih ili visokih doza ili kontinuirane upotrebe jednog leka je dovela do razvoja antihelmintičke rezistencije (AR). Savremene strategije borbe protiv AR podrazumevaju racionalnu upotrebu ovih lekova, uz korišćenje različitih alternativa poput botaničkih antihelmintika. Ciljevi ovih istraživanja su bili ispitati antihelmintičku aktivnost odabranih etarskih ulja (EOs) protiv GIN ovaca i sigurnost njihove primene, odrediti faktore koji utiču na aktivnost, kao i oceniti mogućnost primene ispitivanih formulacija u veterinarskoj praksi kao alternativne metode u borbi protiv AR. Ispitivanje je vršeno u dve faze (istraživanja), tokom 2019. i 2021. godine, pri čemu je u prvom ispitanom 12 uzoraka ulja a u drugom 11 (od čega su tri ista kao i u prethodnoj fazi, odnosno dva od istog proizvođača, jedno od drugog). Hemijski sastav ulja je određen pomoću gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC-MS analize). *In vitro* ovicidna aktivnost je ispitana uz pomoć testa izleganja larvi (eng. *egg hatch test*, EHT), u prvom istraživanju pri šest različitih koncentracija za svako ispitano ulje (50, 12,5, 3,125, 0,781, 0,195 i 0,049 mg/ml), a u drugom su pored navedenih dodate još dve niže koncentracije (0,025 i 0,0125 mg/ml). Za prvo *in vivo* istraživanje su odabrani ulje timijana (tip 1) i sinergistička kombinacija linalool:estragol, a za drugo ulje origana, pitome nane i rtanjskog čaja. Efikasnost ulja je ispitana uz pomoć testa redukcije broja jaja u fecesu (eng. *faecal egg count reduction test*, FECRT), pri čemu su EOs razblažena u suncokretovom ulju a formulacije aplikovane jednokratno, peroralno životinjama u različitim grupama, u prvom istraživanju pri dozi od 100 mg/kg, a u drugom 150 mg/kg. Toksični efekti *in vivo* primenjenih formulacija su ispitani putem kliničkog pregleda testiranih životinja, a u drugom istraživanju i analizom hematoloških i biohemijskih parametara krvi u cilju procene efekata na krvnu sliku, funkciju jetre i bubrega. Za oglede su korišćene dve farme u južnoj Italiji, gde je u oba istraživanja putem koprokulture određeno prisustvo GIN kod ovaca, a prisutni rodovi identifikovani uz pomoć odgovarajućih ključeva determinacije. Rezultati GC-MS analiza su pokazali složen hemijski sastav testiranih etarskih ulja sa jedinjenjima čiji se broj kretao od 10-35, i koja pripadaju različitim hemijskim grupama (terpeni, terpenoidi i fenilpropanoidna jedinjenja). Najvišu ovicidnu aktivnost na EHT su u prvom istraživanju pokazala ulja origana, rtanjskog čaja i morača sa maksimalnim inhibitornim efektom na izleganje larvi (100%) pri svim testiranim koncentracijama, a pored njih i čubar (99,3-100%), oba uzorka

timijana (timijan 1, 95,3-100% i timijan 2, 98,5-100%), kleka (81-96,8%) i pitoma nana (72,5-99,8%). U drugom istraživanju je zbog nešto drugačije pripreme koncentracija (metodom razblaživanja) efekat bio znatno više dozno-zavistan, ali je ulje origana bilo ponovo najefikasnije (71,3-93,3%), a potom miloduh (42,7-91,3%), korijander (29-92,7%), bosiljak (23,3-93,3%), pitoma (20-90,3%) i divlja nana (13-92,7%). Kada je u pitanju FECRT, u prvom istraživanju postignut je određen antihelmintički efekat sa ukupnom redukcijom broja jaja nematoda od 25,23% i 24,42% (timijan) i 24,91% i 25,90% (linalool:estragol), ali je efekat bio bolji kod ulja iz drugog istraživanja s obzirom na aplikaciju formulacija direktno u rumen životinja, odnosno 43,21% i 60,13% (origano), 26,86 i 46,04% (pitoma nana) i 15,66% i 33,00% (rtanjski čaj), 7. i 14. dana nakon tretmana. Ni za jedno od primenjenih ulja, pri testiranim dozama, nisu zabeleženi nikakvi neželjeni ili toksični efekti prilikom kliničkog pregleda odnosno hematoloških i biohemijskih analiza krvi, što govori u prilog bezbednosti njihove upotrebe kod ovaca. Pokazana efikasnost ispitanih ulja potiče od jedinjenja koja ulaze u njihov sastav, odnosno pre svih karvakrola, anetola, timola, p-cimena, γ -terpinena, karvona, linaloola, mentola, α -tujona i cis-pinokamfona, imajući u vidu njihovu zastupljenost kod najefikasnijih ulja. Koprokulturom je pri tome na ispitivanim farmama u oba istraživanja identifikovano prisustvo četiri roda GIN ovaca, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* i *Chabertia*, čija se procentualna zastupljenost u određenoj meri menjala nakon tretmana. Primena biljnih formulacija uključujući EOs u cilju kontrole parazita ima više prednosti. To uključuje složen hemijski sastav sa bioaktivnim supstancama iz različitih hemijskih grupa, koji dovodi do njihove visoke antihelmintičke aktivnosti, kao i potencijalno nižeg stepena razvoja rezistencije. Tehnike inkapsulacije ili višestruka primena tokom nekoliko uzastopnih dana pri tome nude mogućnost dodatnog povećanja efikasnosti u terenskim uslovima. Sa druge strane, prirodno poreklo ovih formulacija može doprineti i njihovoj nižoj toksičnosti za životinje, manjim količinama rezidua u mesu i mleku i boljoj ekološkoj prihvatljivosti u poređenju sa komercijalnim preparatima. U svakom slučaju, dobijeni rezultati govore u prilog mogućnosti korišćenja ispitanih EOs u praksi, posebno origana, u integrisanom pristupu kontrole u cilju smanjenja upotrebe komercijalnih preparata i usporavanja razvoja rezistencije.

Ključne reči: Etarska ulja, Gastrointestinalne nematode ovaca, Antihelmintička rezistencija, Integrisana kontrola

ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes (GINs) nowadays represent one of the biggest health and economic issues in small ruminants. The control of these parasites is almost exclusively based on the application of commercial drugs. However, their irrational use in terms of frequent treatments, low or high doses or continuous use of one drug has led to the development of anthelmintic resistance (AR). Modern strategies for combating AR are based on the rational use of these drugs, along with the use of various alternatives such as botanical anthelmintics. The aims of these studies were to examine the anthelmintic activity of selected essential oils (EOs) against sheep GINs and the safety of their application, to determine the factors that influence the activity, as well as to evaluate the possibility of applying examined formulations in veterinary practice as an alternative method in combatting AR. The research was conducted in two phases (studies), in 2019. and 2021., whereby 12 oil samples were examined in the first and 11 in the second study (of which three are the same as in the previous study, two from the same manufacturer and one from the other). The chemical composition of the oils was determined by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS analysis). *In vitro* ovicidal activity was tested using the egg hatch test (EHT), in the first instance at six different concentrations for each tested oil (50, 12.5, 3.125, 0.781, 0.195 and 0.049 mg/ml), and in the second, in addition to the above, two lower concentrations (0.025 and 0.0125 mg/ml) were added. Thyme oil (type 1) and the synergistic combination of linalool:estragole in the first, and the oils of oregano, mint and winter savory in the second study were selected for further *in vivo* testing. The efficacy was tested using the faecal egg count reduction test (FECRT), whereby the EOs were diluted in sunflower oil and the formulations were applied once, perorally to animals in different groups, in the first case at a dose of 100 mg/kg and in the second at 150 mg/kg. The toxic effects of the *in vivo* applied formulations were examined through clinical observation of the tested animals, and in the second study also by analyzing the haematological and biochemical blood parameters in order to assess the side effects on the blood count, liver and kidney function. Two farms in southern Italy were used for the experiments, whereby the presence of GINs was determined by coproculture examination, and the present genera were identified with suggested determination keys. The results of GC-MS analyses showed the complex chemical composition of the tested EOs with the number of compounds varying from 10-35, which belong to different chemical groups (terpenes, terpenoids and phenylpropanoid compounds). The highest ovicidal effect in the first EHT was shown by the oils of oregano, winter savory and fennel with the maximum inhibitory effect on the egg hatchability

(100%), along with summer savory (99.3-100%), both samples of thyme (sample 1, 95.3-100% and sample 2, 98.5-100%), juniper (81-96.8%) and mint (72.5-99.8%). In the second study, due to a different preparation of concentrations (dilution method), the effect was significantly more dose-dependent, but the most effective oil was again oregano (71.3-93.3%) along with hyssop (42.7-91.3%), coriander (29-92.7%), basil (23.3-93.3%), mint (20-90.3%) and wild mint (13-92.7%). In the first FECRT, a certain anthelmintic effect was achieved with a total reduction in the number of nematode eggs of 25.23% and 24.42% (thyme) and 24.91% and 25.90% (linalool:estragole), but due to the application of the formulations directly in the rumen of animals, the effect was better with oils from the second study, i.e. 43.21% and 60.13% (oregano), 26.86 and 46.04% (mint) and 15.66% and 33.00% (winter savory) on Days 7 and 14, respectively. No toxic or side effects to the sheep were observed for any of the applied oils at the tested doses, neither during the clinical examination of animals nor during haematological and biochemical blood tests, suggesting the safety of their use in sheep. The demonstrated efficacy of the tested oils is related to the compounds that are included in their composition, i.e. above all carvacrol, anethole, thymol, p-cymene, γ -terpinene, carvone, linalool, menthol, α -thujone and cis-pinocamphon, considering their presence in the most effective oils. Four genera of sheep GIN were identified by coproculture examination in both studies, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* and *Chabertia*, whose percentage representation changed to some extent after the treatments. The use of herbal formulations including EOs in parasite control has numerous advantages. That includes a complex chemical composition with bioactive substances from different chemical groups, which leads to high anthelmintic activity, as well as potentially lower susceptibility to AR development. Furthermore, encapsulation techniques or multiple applications over several consecutive days offer the possibility of further increasing the efficacy in field conditions. On the other hand, the natural origin of these formulations may contribute to lower toxicity for animals and smaller amounts of residues in meat and milk, as well as better environmental acceptability in comparison with commercial drugs. The obtained results suggest the possibility of using the tested EOs in practice, especially oregano, in an integrated control approach designed to reduce the use of commercial drugs and slow down the development of resistance.

Keywords: Essential oils, Sheep gastrointestinal nematodes, Anthelmintic resistance, Integrated control

SADRŽAJ:

1.0. UVOD.....	1
2.0. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Gastrointestinalne nematode ovaca.....	3
2.1.1. Pregled najznačajnijih rodova.....	3
2.1.2. Razvojni ciklus.....	5
2.1.3. Prevalenca i epidemiologija.....	6
2.1.4. Klinička slika i ekonomski značaj.....	7
2.1.5. Dijagnostika.....	8
2.1.6. Terapija i prevencija.....	9
2.2. Antihelmintička rezistencija	10
2.2.1. Definicija i značaj.....	10
2.2.2. Mehanizam razvoja.....	11
2.2.3. Faktori koji doprinose razvoju rezistencije.....	12
2.2.4. Metode za ispitivanje efikasnosti antihelminatika i monitoring rezistencije.....	13
2.3. Savremene strategije kontrole gastrointestinalnih nematoda ovaca	16
2.3.1. Racionalna upotreba antihelminatika.....	17
2.3.2. Alternativne strategije.....	20
2.4. Etarska ulja.....	27
2.4.1. Definicija i opšte osobine.....	27
2.4.2. Hemijski sastav.....	28

2.4.3. Primena etarskih ulja u veterinarskoj medicini.....	31
2.4.3.1. Antihelmintička efikasnost etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca.....	34
2.4.4. Biološke osobine odabranih etarskih ulja.....	38
3.0. CILJEVI, ZADACI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	45
4.0. MATERIJAL I METODE.....	47
4.1. Etarska ulja i hemijske analize njihovog sastava.....	47
4.2. Test izleganja larvi (EHT).....	49
4.3. Test redukcije broja jaja nematoda u fecesu (FECRT).....	51
4.4. Studije toksičnosti.....	54
4.5. Koprokultura.....	55
4.6. Statistička analiza.....	56
5.0. REZULTATI.....	57
5.1. Analize hemijskog sastava etarskih ulja.....	57
5.1.1. Prvo istraživanje.....	57
5.1.2. Drugo istraživanje.....	60
5.2. Test izleganja larvi (EHT).....	63
5.2.1. Prvo istraživanje.....	63
5.2.2. Drugo istraživanje.....	67
5.3. Test redukcije broja jaja nematoda u fecesu (FECRT).....	71
5.3.1. Prvo istraživanje.....	71
5.3.2. Drugo istraživanje.....	73
5.4. Studije toksičnosti.....	77

5.4.1. Klinički pregled.....	77
5.4.2. Analiza hematoloških parametara krvi.....	77
5.4.3. Analiza biohemijskih parametara krvi.....	80
5.5. Koprokultura.....	81
6.0. DISKUSIJA.....	85
6.1. <i>In vitro</i> ispitivanje antihelmintičke efikasnosti.....	85
6.2. <i>In vivo</i> ispitivanje antihelmintičke efikasnosti.....	90
6.3. Bioaktivne supstance od značaja za antihelmintičku efikasnost.....	93
6.3. Studije toksičnosti.....	97
6.4. Koprokultura.....	99
6.5. Prednosti i nedostaci antihelmintičke primene etarskih ulja	100
7.0. ZAKLJUČAK.....	104
8.0. LITERATURA.....	106
9.0. BIOGRAFIJA KANDIDATA.....	127

1.0. UVOD

Domaća ovca (lat. *Ovis aries*) predstavlja veoma rasprostranjenu vrstu domaće životinje koja se prvenstveno uzgaja zbog vune, mesa, mleka i kože. Selekcijom je dobijeno mnogo rasa prilagođenih za uzgajanje u mnogim sredinama širom sveta, od hladnih i vlažnih planinskih oblasti severne Evrope, do sušnih oblasti Afrike i Azije. Ovce su prvenstveno životinje na ispaši, a gaje se u širokom spektru proizvodnih sistema širom sveta u zavisnosti od preovlađujućih uslova životne sredine i društveno-ekonomskog konteksta [1,2]. Gajenje ovaca i koza se razlikuje od gajenja ostalih domaćih životinja po tome što je ono najčešće ekstenzivno, odnosno zahteva relativno niska ulaganja u objekte, opremu i ostala potrebna sredstva. Naime, ovce poseduju veliku moć adaptacije i veliku izdržljivost, pri čemu su veoma praktične za gajenje u pogledu smeštaja i upravo je zbog toga ovčarstvo najzastupljenije u onim regionima gde je poljoprivreda najekstenzivnija [3].

Procena je da danas u svetu ima oko milijardu ovaca, pri čemu se glavna područja za uzgoj ovaca nalaze na geografskim širinama 35-55° severno u Evropi i Aziji i između 30-45° južno u Južnoj Americi, Australiji i na Novom Zelandu. Postoje tri glavna sistema upravljanja ovčarskom proizvodnjom, a to su ekstenzivna proizvodnja vune i mesa, intenzivna proizvodnja mleka i tradicionalno ovčarstvo. Generalno, različiti proizvodni sistemi imaju kapacitet da obezbede dobrobit životinja, pod uslovom adekvatnih resursa i uzgoja (npr. dopunska hrana i veterinarska nega kada je to potrebno) [4]. U Republici Srbiji, poslednjih godina se zapaža mali trend porasta broja ovaca (0,6% 2021. godine u odnosu na 2020.), iako se broj većine drugih domaćih životinja konstantno smanjuje [5]. Pri tome je broj grla po jednom gazdinstvu mali, najčešće ispod 10, iako je prosečan broj grla u EU na farmama oko 200 [3]. U svakom slučaju, ovčarstvo se danas kako u svetu tako i kod nas suočava sa brojnim problemima.

Gastrointestinalne nematode predstavljaju jedne od najčešćih prouzrokovaca infekcija kod domaćih životinja [6]. U današnje vreme one predstavljaju značajan problem u mnogim granama veterinarske medicine, što se posebno odnosi na životinje kojima pašnjaci predstavljaju glavni izvor hrane. Pri tome, gubici u proizvodnji koje prouzrokuju ovi paraziti su ogromni i predstavljaju veliku opasnost kako za ekonomiju na globalnom i nacionalnom nivou, tako i za same farmere [7]. Zbog toga se sve više čine naponi u potrazi za inovacijama pre svega na polju

kontrole ovih parazita. Kada je u pitanju gajenje ovaca, gastrointestinalne nematode se navode kao jedan od najvećih problema kako sa zdravstvenog i proizvodnog (ekonomskog) aspekta, tako i sa aspekta dobrobiti. Danas su ovi paraziti rašireni u mnogim delovima sveta, naročito u regionima sa tropskom i suptropskom klimom [8], a prevalenca i distribucija određenih rodova zavisi od geografskih i klimatskih prilika [9]. Takođe, predstavljaju i značajne uzročnike infekcija i oboljenja kod ovaca i na našim farmama, npr. u regionu istočne Srbije i Vojvodine [10,11]. Negativan efekat parazitizma se ogleda na različite načine, poput izazivanja bolesti različitog intenziteta i kliničke slike, smanjenje proizvodnje, nižeg fertiliteta, troškova lečenja i smrti životinja, što sve zajedno dovodi do velikih ekonomskih gubitaka.

Kontrola gastrointestinalnih nematoda kod malih preživara se i dalje gotovo isključivo oslanja na komercijalne antihelmintičke lekove poput benzimidazola, makrocikličnih laktona i imidazotiazola [12]. Međutim, slično kao i kod antibiotika, rastući problem antihelmintičke rezistencije usled neracionalne upotrebe lekova pričinjava sve veće ekonomske gubitke u mnogim delovima sveta, što ugrožava održivost gajenja ovaca. U potrazi za novim rešenjima, sve veći broj istraživača ispituje nove strategije u pristupu lečenja ovih infekcija, a koje se oslanjaju na racionalnu upotrebu antihelmintika uz pronalazak odgovarajućih alternativa [13]. Iste imaju za cilj smanjenje upotrebe antihelmintika i usporavanje razvoja rezistencije sa jedne, uz postizanje odgovarajuće efikasnosti u terapiji i/ili profilaksi sa druge strane. Ovaj integrisani pristup [14,15] nudi mogućnost održive kontrole ovih parazita, a samim tim i ovčarstva i stočarstva u globalu. U tom kontekstu, čovečanstvo se sve više ponovo oslanja na prirodu i upotrebu njenih preparata za različite medicinske svrhe, što je podstaklo potragu za novim farmakološkim supstancama od strane industrije lekova. Upotreba biljaka odnosno fitoterapija je praksa koja datira od početka ljudske civilizacije, a danas su biljke i njihovi produkti važan deo farmakopeje u mnogim delovima sveta. Sa obećavajućim rezultatima u vezi sa antiparazitskom aktivnošću, fitoterapija koja uključuje i upotrebu etarskih ulja se namentula kao posebno obećavajuća alternativa za buduću kontrolu gastrointestinalnih nematoda kod ovaca [16,17], što čini ovu temu atraktivnom, aktuelnom i inovativnom koja privlači sve veći pažnju.

2.0. PREGLED LITERATURE

2.1. Gastrointestinalne nematode ovaca

2.1.1. Pregled najznačajnijih rodova

Gastrointestinalne nematode predstavljaju veoma značajne parazite kod malih preživara i jedan od najvećih zdravstvenih i ekonomskih problema kod ovih životinjskih vrsta [16]. Danas su ovi paraziti rašireni u mnogim delovima sveta, naročito u regionima sa tropskom i suptropskom klimom [8]. Termin gastrointestinalne nematode uključuje brojne rodove i vrste parazitskih helminata kod ovaca i drugih životinja, a koji parazitiraju u različitim delovima digestivnog trakta [18,19]. Najvažnije nematode koje parazitiraju u abomazumu su *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* i *Trichostrongylus axei*. Pri tome, *Haemonchus* je najčešći u tropskim i suptropskim krajevima ili u onima sa kišnim letima, dok su ostale napomenute vrste češće u regionima sa hladnim i kišnim zimama. Zbog toga ove vrste preovlađuju u regionima sa umerenom klimom [9].

H. contortus predstavlja jednu od najpatogenijih i najplodnijih nematoda kod malih preživara. Odrasle ženke su sposobne da proizvedu hiljade jaja dnevno, što može dovesti do brze kontaminacije pašnjaka i tzv. pikova hemonkoze. Ove nematode su kratkog veka i preživljavaju u svojim domaćinima samo nekoliko meseci. Međutim, posledice parazitizma mogu biti ogromne, pri čemu su glavni patogeni efekti prouzrokovani aktivnošću hranjenja krvlju što rezultira anemijom koja obično postaje očigledna posle dve nedelje infekcije. Bolest kod životinja prolazi u peraktunoj, akutnoj i hroničnoj formi i u zavisnosti od toga mogu se javiti tamno obojen izmet, edem, slabost, smanjena proizvodnja a ponekad i iznenadna smrt [20].

Teladorsagia circumcincta se ne hrani krvlju, a glavni patogeni efekat je prouzrokovan njenim larvenim oblicima i uzrokovanim deficitom proteina. Naime, razvoj larvi se odvija u želudačnim žlezdama, što dovodi do formiranja čvorova u sluzokoži abomazusa i do velikog oštećenja parijetalnih ćelija. To ima za posledicu smanjenu proizvodnju hipohlorne kiseline, deficitno konvertovanje pepsinogena u pepsin i smanjeno varenje proteina. Parazitiranje obično rezultira umerenim infekcijama sa simptomima dijareje, slabog prirasta, gubitka telesne mase i smanjene proizvodnje vune, a u težim slučajevima može doći i do uginuća [20,21].

Trichostrongylus axei takođe parazitira u abomazumu, mada su infekcije obično slabijeg intenziteta. Ostale vrste ovog roda, *T. colubriformis*, *T. vitrinus* i *T. rugatus* parazitiraju u intestinumu. Generalno, ove vrste predstavljaju važne parazite malih preživara na ispaši i uglavnom ispoljavaju svoje patogene efekte kod jagnjadi i zalučenih životinja, a poznato je i da izazivaju značajno smanjenje rasta vune kod starijih jedinki. Infekcije niskog intenziteta je ponekad teško razlikovati od neuhranjenosti, dok infekcije visokog intenziteta izazivaju dijareju koja stvara mrlje na zadnjim ekstremitetima, a pored toga se javljaju anoreksija i gubitak telesne mase. Značajnu patologiju izaziva *T. vitrinus*, odnosno njen L₃ oblik koji se uvlači između crevnih resica što može dovesti do malapsorpcije, maldigestije, hipoproteinemije i znakova generalizovanog enteritisa [9,20].

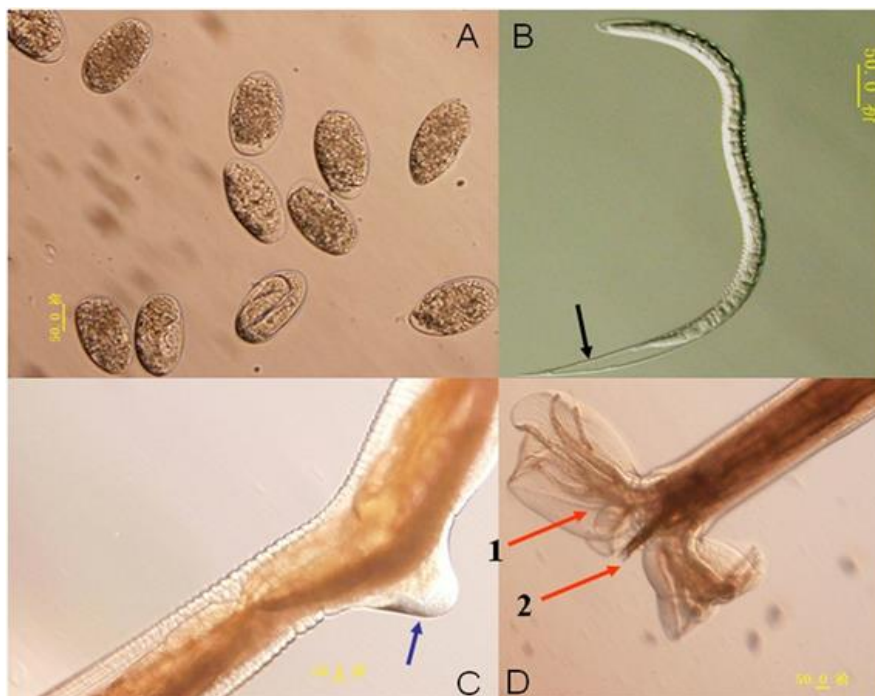
Od ostalih rodova nematoda koje parazitiraju u tankom crevu kod ovaca, potrebno je istaći rodove *Bunostomum*, *Nematodirus* i *Cooperia*. Adulti *B. trigonocephalum* se nalaze u tankom crevu, uglavnom jejunumu ovaca, gde se vezuju za sluzokožu i sisaju krv izazivajući anemiju i brz gubitak telesne mase. Pored toga, javlja se dijareja ili konstipacija koji se mogu smenjivati, a može biti prisutan i hipoproteinijski edem [22]. Vrste roda *Nematodirus* poput *N. battus* su morfološki nešto veće od ostalih gastrointestinalnih nematoda i mogu biti veoma patogene jer se veliki broj larvi izleže u kratkom periodu kada mlada jagnjad počnu uzimati veće količine trave. Bolest je često povezana sa razvojnim stadijuma larvi, pri čemu se obično javlja u kasno proleće u umerenim klimatima, a karakteriše je iznenadni početak, obilna dijareja i izražena dehidracija sa mogućim fatalnim ishodom [9]. Najznačajnija vrsta roda *Cooperia* koja parazitira kod ovaca je *C. curticei*, mada se generalno vrste ovog roda smatraju manje patogenima u poređenju sa vrstama iz drugih rodova. Međutim, veliki broj parazita može dovesti do smanjene proizvodnje kod životinja, prilikom čega je infekcija povezana sa inapetencom i smanjenim prirastom [23].

U debelom crevu, prevashodno u cekumu i kolonu parazitiraju vrste rodova *Oesophagostomum*, *Chabertia* i *Trichuris*. Infekcije sa *O. columbianum* se karakterišu stvaranjem nodula, pri čemu adulti naseljavaju mukožu i sisaju krv, što dovodi do perniciozne anemije i značajnog gubljenja telesne mase. Sa druge strane, penetracija mukoze od strane larvi može prouzrokovati jaku dijareju koja se obično javlja druge nedelje infekcije, sa crno-zelenim fecesom koji sadrži mukus i krv [9,24]. Odrasli oblici *C. ovina* uzrokuju oštećenja sluzokože

kolona, što dovodi do kongestije, ulceracije i manjih krvavljenja. Izmet je mekan, sadrži dosta sluzi, a ponekad i primese krvi. Međutim, imunitet se brzo razvija pa se epidemije primećuju samo u uslovima jakog stresa. Teške infekcije sa *T. ovis* nisu uobičajene, ali se mogu videti kod veoma mladih jagnjadi ili tokom sušnih perioda kada se ovce hrane žitom na zemlji. Jaja ovog parazita su veoma otporna, a uočava se konstipacija i edem sluzokože cekuma, praćen dijarejom [9].

2.1.2. Razvojni ciklus

Većina vrsta gastrointestinalnih nematoda ima jednostavan, direktan razvojni ciklus (slika 1). Tipično, ženke polažu jaja u gastrointestinalnom traktu životinja, a njihov broj zavisi od roda i vrste parazita. Jaja se potom putem fecesa izbacuju u spoljašnju sredinu, pri čemu se u fecesu izlegu i prvo razvijaju do L₁ stadijuma larvi, a zatim preko L₂ do infektivnog L₃ stadijuma. U pojedinim slučajevima kao što je kod roda *Nematodirus*, razvoj do L₃ stadijuma se obavlja unutar jajeta. U svakom slučaju, infektivni stadijum nakon toga migrira iz balege i kontaminira spoljašnju sredinu [7]. Infekcija se prenosi ingestijom kontaminirane trave, najčešće na paši, unošenjem infektivnih larvi u digestivni trakt domaćina gde se one, u zavisnosti od roda, u različitim delovima razvijaju do adultnog oblika (abomazum, tanko ili debelo crevo). Infekcija obično nastaje oko dve nedelje nakon unosa larvi, a patologija nastaje ili kao posledica migracije larvi, ili parazitiranja adultnih oblika. Prepatentni period za većinu vrsta iznosi oko 2 meseca, nakon čega se u spoljašnju sredinu ponovo izbacuju jaja i razvijaju infektivne larve, te se razvojni ciklus parazita kontinuirano nastavlja [18,19].



Slika 1. Razvojni stadijum *H. contortus*. A - jaja ; B - L₃ oblik ; C - vulvalni režanj kod odrasle ženke ; D1 - kopulatorna burza mužjaka, D2 - spikule koje se koriste da drže genitalni organ ženki otvorenim (Izvor: El-Ashram i Suo, 2017 [25])

2.1.3. Prevalenca i epidemiologija

Kao što je već napomenuto, prisustvo različitih rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca se danas beleži u mnogim delovima sveta. Prevalenca i distribucija određenih rodova pri tome zavisi od geografskih i klimatskih prilika. Generalno, *Haemonchus* i *Cooperia* spp. su više zastupljene u suptropskom i tropskom klimatu, *Teladorsagia* i *Nematodirus* spp. u umerenim regionima, dok su *Trichostrongylus* vrste zastupljene širom sveta [26]. Kada je u pitanju naša zemlja, ovi paraziti takođe predstavljaju značajne uzročnike infekcije i oboljenja kod ovaca. U istraživanju sprovedenim na nivou Vojvodine [11], infekcija različitim gastrointestinalnim parazitima je zabeležena kod čak 81,22% ovaca, a kada su u pitanju nematode, detektovana su jaja od: *Nematodirus* spp. (71,22%), *Teladorsagia* spp. (69,22%), *Trichostrongylus* spp. (66,55%), *Haemonchus* spp. (64,55%), *Chabertia ovina* (60,11%), *Oesophagostomum* spp. (36,77%), *Cooperia* spp. (27,88%) i *Bunostomum* sp. (23,97%), uz neke druge parazite poput malog metilja (*Dicrocoelium dendriticum*), plućnog crva (*Dictyocaulus* spp.) i pantljičare iz roda *Moniezia*.

Rezultati pomenutog istraživanja jasno ukazuju da infekcije helmintima predstavljaju značaj problem u našoj pokrajini. Pri tome, stopa infektivnosti svakog od ovih parazita pokazuje da je većina njih pratila isti obrazac sa pikovima u proleće i jesen koji su odvojeni padovima tokom vrelog letnjeg sušnog perioda, kada je stopa zaraze bila niska. Rezultati su takođe pokazali da je intenzitet infekcije bio viši kod starijih životinja u poređenju sa mlađim, što može biti rezultat duže ekspozicije jajima i larvama parazita tokom nekoliko pašnih sezona. Zbog toga odrasle jedinke zapravo predstavljaju potencijalni izvor infekcije i kontaminacije pašnjaka [11]. Sa druge strane, u istraživanju u regionu istočne Srbije, prevalenca različitih rodova gastrointestinalnih nematoda je bila sledeća: *Haemonchus* (46.91%), *Oesophagostomum* (40.73%), *Trichostrongylus* (39.85%), *Nematodirus* (35.88%), *Chabertia* (32.79%), *Teladorsagia* (25.88%), *Bunostomum* (23.97%), *Marshallagia* (21.91%), *Strongyloides* (17.06%), *Cooperia* (14.12%) i *Trichuris* (10.88%), ukazujući na njihov značaj kod pašnih ovaca i na ovom području. Pri tome, najveći broj ispitanih životinja (51,87%) je imao srednji intenzitet infekcije, dok je niski intenzitet imalo 40,63%, a visoki 7,50%. Takođe, zabeležena je veća prevalenca infekcije kod ženki ($p < 0,01$), kao i kod odraslih životinja ($p < 0,001$) [10]. Veliki broj i raširenost parazita na ovom području se može objasniti ekstenzivnim načinom gajenjem životinja u regionu istočne Srbije.

2.1.4. Klinička slika i ekonomski značaj

Kao što je navedeno, gastrointestinalne nematode mogu prouzrokovati različite kliničke simptome koji variraju u zavisnosti od različitih faktora, ali najviše od vrste nematoda i stepena infekcije odnosno broja parazita. U tom kontekstu se javlja različita klinička slika, od gubitka telesne mase i smanjenog unosa hrane, pa sve do anoreksije, dijareje, digestivnih problema, anemije, velikog gubitka proteina, smanjenog imuniteta i fertiliteta, a u težim slučajevima može doći i do smrti životinja [27-31]. Ipak, najčešće se javlja subklinička forma sa gubitkom težine i opadanjem proizvodnje mleka, mesa i vune [30,31]. Zbog svega napomenutog, ovi paraziti na različite načine mogu ugroziti zdravlje i dobrobit životinja, a sami ekonomski gubici nastaju usled smrti životinja, smanjene proizvodnje, nižeg fertiliteta i troškova lečenja [7]. Veliki broj rodova i vrsta koji izazivaju infekciju, njihova visoka prevalenca i incidenca, kao i pojava mešanih infekcija dovode do značajnih ekonomskih gubitaka koje je teško kvantifikovati, s

obzirom na pomenute načine na koje ih mogu prouzrokovati. Ipak, smatra se da su ovi paraziti odgovorni za štetu koja se meri u milijardama eura na godišnjem nivou u Evropi [6].

2.1.5. Dijagnostika

Pravilna i pravovremena dijagnostika infekcija prouzrokovanih gastrointestinalnim nematodama je veoma važna kako sa epizootiološkog aspekta, tako i sa aspekta određivanja i postavljanja terapije. S obzirom da ne postoji idealan dijagnostički test, danas se u praksi ante-mortem dijagnostika uglavnom bazira na mikroskopskoj detekciji jaja ili larvi nematoda u fecesu životinja, odnosno njihovom brojanju i identifikaciji pomoću različitih tehnika flotacije i koprokulture [29,32]. Pri tome, kvantifikacija i izražavanje broja određenih parazitskih oblika, npr. broj jaja po gramu fecesa životinja (eng. *eggs per gram*, EPG), pomaže u određivanju stepena infekcije kod životinja i važna je za međusobno poređenje životinja i farmi, kao i prilikom ispitivanja efikasnosti antihelmintika. Na ovaj način su i postavljene različite skale gde se, na primer, životinje sa 50-799 EPG klasifikuju kao niske, sa 800-1200 kao srednje, a 1200 i više EPG kao visoko inficirane [10].

Uz pomoć odgovarajućih ključeva determinacije, najčešće korišćenjem L₃ stadijuma larvi [18,33,34], može se specifično odrediti prisutnost i zastupljenost pojedinih rodova, što doprinosi preciznoj dijagnostici. Pored napomenutog, mogu se koristiti i druge metode poput fizičkog posmatranja životinja i njihovog ponašanja, merenja gubitka krvi kod parazita koji se hrane krvlju, fekalni miris, merenja gubitaka na težini itd., a razvijeni su i različiti imunološki dijagnostički markeri za detekciju infekcija poput serumskih antitela, fekalnih antitela, antitela u pljuvački, eozinofilije u krvi itd. [32]. Post-mortem dijagnoza se bazira na nekropsiji i koristi se za određivanje broja nematoda prisutnih u gastrointestinalnom traktu odnosno za određivanje intenziteta infekcije, a takođe je veoma bitna sa aspekta epidemioloških studija i procene efikasnosti antihelmintika [20].

2.1.6. Terapija i prevencija

S obzirom na značaj i štetu koju izazivaju gastrointestinalne nematode ovaca, strategije kontrole su veoma važne, ali ih nije lako postaviti. Prema određenim literaturnim izvorima, održiva kontrola ovih parazita podrazumeva dobro upravljanje pašnjacima, upotrebu različitih antihelmintičkih supstanci i mere biološke kontrole [7]. Ovom spisku mera se mogu dodati i genetska selekcija prirodno rezistentnih životinja, prilagođavanje ishrane, razvoj vakcina, ali i upotreba različitog lekovitog bilja [13,35]. Glavna mera u današnje vreme i godinama unazad je ipak još uvek upotreba antihelmintičkih lekova, koja često predstavljaju jednostavnu, bezbednu i u nekim slučajevima najjeftiniju opciju [36]. Pri tome se najčešće koriste lekovi iz tri klase, odnosno benzimidazoli (npr. albendazol, fenbendazol, mebendazol), makrociklični laktoni (npr. avermektini - ivermektin i milbemicini - moksidektin) i imidazotiazoli tj. holinergički agonisti (npr. levamizol, tetramizol) [12,37] (Tabela 1).

Tabela 1. Najznačajniji lekovi koji se koriste protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca, spektar dejstva, doza i način primene [38]

Lek	Spektar dejstva	Doza	Način primene
Albendazol	Više od 90% protiv <i>Haemonchus</i> spp., <i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Ostertagia</i> spp., <i>Nematodirus</i> spp., <i>Bunostomum</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp., <i>Chabertia</i> spp., i više od 60% protiv <i>Trichuris</i> spp.	5 mg/kg	Peroralno u vidu bolusa ili suspenzije za peroralnu primenu u obliku drenča
Fenbendazol	Efikasan protiv većine značajnijih vrsta nematoda digestivnog trakta, ubija i odrasle i larvene oblike parazita	5 mg/kg	Peroralno i najčešće jednokratno u hrani, ali se bolji efekti postižu ako se ukupna dnevna doza podeli i primeni u više pojedinačnih dnevnih doza
Ivermektin	<i>Haemonchus</i> spp., <i>Ostertagia</i> spp., <i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Cooperia</i> spp., <i>Bunostomum</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp., <i>Nematodirus</i> spp., <i>Chabertia</i> spp., <i>Trichuris</i> spp., <i>Oesophagostomum</i> spp.	0,2 mg/kg	Peroralno ili subkutano, jednokratno

Levamisol	<i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Haemonchus</i> spp., <i>Ostertagia</i> spp., <i>Nematodirus</i> spp., <i>Cooperia</i> spp., <i>Bunostomum</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp., <i>Oesophagostomum</i> spp., <i>Chabertia</i> spp., <i>Trichuris</i> spp.	5-10 mg/kg	Parenteralno (subkutano ili intramuskularno) ili peroralno kao levamisol-hlorid
-----------	---	------------	---

Ipak, preveniranje parazitoza je mnogo bolje i lakše nego njihovo lečenje. Generalno, ono se postiže sprovođenjem određenih postupaka odnosno sledećih mera: ishranom bogatom vitaminima i mineralima, dobrim držanjem i negom životinja, sprovođenjem higijensko-sanitarnih mera (mehaničko čišćenje, pranje, dezinfekcija objekata u kojima borave životinje), uništavanje neinfektivnih oblika parazita koji pod dejstvom toplote i vlage mogu da pređu u infektivne oblike, neškodljivo uklanjanje đubrišta (spaljivanje, zatrpavanje u zemlju i tretiranje hemijskim sredstvima), uništavanje infektivnih oblika parazita u stajama i na pašnjacima, itd. [38].

2.2. Antihelmintička rezistencija

2.1. Definicija i značaj

Upravljanje i kontrola infekcija izazvanih gastrointestinalnim nematodama kod ovaca nije lak zadatak i, kao što je već rečeno, trenutno se gotovo isključivo oslanja na upotrebu komercijalnih antihelmintičkih lekova [39]. Ovi lekovi su se uspešno koristili decenijama unazad u kontroli različitih helminata kod životinja, dostižući nivo od 53% ukupno korišćenih veterinarskih lekova u praksi [40]. Međutim, njihova neracionalna upotreba u smislu učestalih i intenzivnih tretmana, visokih ili niskih doza, ili npr. korišćenja samo jednog antihelmintika je dovela do razvoja rezistencije kod mnogih vrsta nematoda [29,35,39]. Prema Smernicama Udruženja za unapređenje veterinarske parazitologije, antihelmintička rezistencija se može definisati kao sposobnost parazita da preživi doze leka koje bi inače eliminisale parazite iste vrste i istog stadijuma razvoja [41]. Njen razvoj je u svakom slučaju doveo do opadanja efikasnosti lekova, posebno najčešće upotrebljivanih poput benzimidazola i makrocikličnih laktona, dovodeći do još većih ekonomskih gubitaka u smislu smanjene proizvodnje kod životinja i uginuća usled parazitizma, a koji ugrožavaju održivost gajenja ovaca [39,42].

Kada je u pitanju aktuelna situacija, postoji mnogobrojni dokazi o razvoju rezistencije i njenom širenju kod helminata na utvrđene grupe antihelmintika (benzimidazoli, imidazotiazoli i makrociklični laktoni) u različitim delovima sveta. Tako je 2012. godine prijavljena raširena incidenca multi-rezistentnih populacija *H. contortus*, *Teladorsagia* i *Trichostrongylus* na pomenute lekove kod ovaca širom Evrope [43]. Da situacija bude teža, prijavljeni su i izolovani slučajevi rezistencije na novije grupe antihelmintika poput rezistencije *H. contortus* na monepantel, derivat amino-acetonitrila [44], pri čemu se smatra da vreme potrebno da se razvije rezistencija na novi lek nakon njegovog uvođenja na tržište u današnje vreme iznosi manje od 10 godina [45]. Kao što je ranije napomenuto, štete koju čine gastrointestinalne nematode kod preživara usled gubitaka u proizvodnji, troškova lečenja i uginuća su velike. Međutim, usled razvoja rezistencije ovi troškovi su još veći, prema nekim podacima dodatnih oko 40 miliona evra samo u Evropi [46], sa tendencijom rasta i u budućem periodu s obzirom na sve veće širenje rezistentnih populacija, kao i pomenutu pojavu multi-rezistentnih sojeva. Zbog svega navedenog, gastrointestinalne nematode i problem antihelmintičke rezistencije predstavljaju jednog od najvažnijih ograničavajućih faktora i prepreka sa kojima se suočava moderno ovčarstvo [27,28].

2.2.2. Mehanizam razvoja

Opšti konsenzus je da je rezistencija na antihelmintike preadaptivna nasledna pojava sa genom ili genima odgovornim za rezistenciju koji se nalaze u populaciji parazita i pre nego što se lek prvi put primeni [15]. Aleli koji kodiraju rezistenciju nastaju kao rezultat retkih mutacija i u početku su retki u populaciji, ali kako se selekcija nastavlja, njihov udeo u populaciji se povećava kao i udeo rezistentnih parazita [47]. Naime, tretmani helminata sa optimalnim dozama lekova za koje postoje rezistentni aleli daje prednosti ovim parazitima, s obzirom da će jedini helminti koji će preživeti tretman upravo biti oni koji nose gene rezistencije. U kratkom periodu, dok se životinja ponovo neinficira osetljivim parazitima sa pašnjaka, rezistentni paraziti su jedini koji polažu jaja i na taj način se povećava „genetski fond“ za rezistenciju [15,48]. Pri tome, učestalost alela koji kodiraju rezistenciju u vreme izlaganja leku je važna za brzinu razvoja rezistentne populacije [49]. Nažalost, gastrointestinalne nematode malih preživara upravo imaju genetske osobine koje promovišu brzi razvoj rezistencije, kao što su brze stope selekcije i

protoka gena i visok nivo genetske raznovrsnosti. Kao rezultat toga, ovi paraziti imaju genetski potencijal da brzo reaguju na dejstvo antihelminatika i da obezbede širenje rezistentnih alela [48].

Mehanizmi odgovorni za razvoj rezistencije kod helminata se ugrubo mogu kategorisati kao genetske promene u meti leka, promene u transportu leka ili promene u metabolizmu lekova unutar parazita [50-52]. Odnos između ovih promena i rezistencije varira između različitih vrsta helminata. Dok otpornost na benzimidazol kod nematoda može biti rezultat u kodiranju gena za ciljno mesto, čini se da ista mutacija ne izaziva otpornost na triklabendazol kod velikog metilja. Ove varijacije su zabeležene čak i unutar iste vrste helminata. Na primer, rezistencija na benzimidazol kod *H. contortus* može biti rezultat mutacije aminokiseline fenilalanin u tirozin na poziciji 200 kod izotopa 1β95 tubulin gena. Međutim, frekvencija ove mutacije može dosta varirati, čak i kod benzimidazol-rezistentnih populacija parazita, gde su otkrivene druge mutacije (npr. kodon 167). P-glikoprotein, transportni protein membrane odgovoran za transport mnogih lekova poput ivermektina, benzimidazola i derivata imidazotiazola, može biti odgovoran za pojavu višestruke rezistencije povećavajući aktivni transport lekova [50].

2.2.2. Faktori koji doprinose razvoju rezistencije

Na osnovu iznetog se može zaključiti da je pojava rezistencije neizbežna, pri čemu se uloga veterinara u ovom procesu odnosi na stepen i brzinu njenog razvoja. Većina istraživača se pri tome slaže da su glavni faktori odgovorni za selekciju rezistentnih parazita, odnosno brži razvoj antihelminitičke rezistencije visoka učestalost tretmana, subdoziranje, kontinuirana upotreba lekova iste antihelminitičke grupe tokom nekoliko godina i loše upravljanje pašnjacima [47,53-55]. U pojedinim slučajevima se ovom spisku dodaje i hiperdoziranje [35]. Kada je u pitanju visoka učestalost tretmana, primećeno je da se otpornost brže razvija u regionima gde se životinje češće dehelmintišu [15]. Na primer, u vlažnim tropskim regionima gde je prevalenca pojedinih rodova poput *H. contortus* visoka, tretmani 10-15 puta godišnje su doveli do razvoja rezistencije [56]. Međutim, on se može razviti i pri nižim učestalostima lečenja, posebno kada se isti lek koristi dugi niz godina. Tako je prijavljen razvoj rezistencije čak i kada su sprovedena samo 2-3 tretmana godišnje [57].

Subdoziranje se generalno smatra visokim faktorom rizika, s obzirom da subterapijske doze mogu omogućiti preživljavanje heterozigotnih rezistentnih parazita [58]. To doprinosi selekciji rezistentnih sojeva, zbog čega pri izboru adekvatne terapijske doze treba imati u vidu različite faktore poput varijacija u bioraspoloživosti kod različitih vrsta domaćina. Na primer, bioraspoloživost benzimidazola i levamizola je dosta niža kod koza nego kod ovaca, pa bi ovu vrstu trebalo tretirati 1,5 ili 2 puta višom dozom u odnosu na ovce [15]. Slično, neadekvatno merenje telesne mase poput samo vizuelne ocene može dovesti do subdoziranja, zbog čega u cilju obezbeđivanja tačne doze veterinari moraju odrediti telesnu masu što je preciznije moguće, po mogućnosti svake životinje individualno. Alternativno se preporučuju trake za merenje obima srca koje predstavljaju praktičan alat farmerima za određivanje telesne mase malog broja životinja [31,47].

Česta i kontinuirana upotreba jednog leka takođe dovodi do razvoja rezistencije [15]. Na primer, često se u praksi dešava da se jedan lek, koji je obično efikasan u prvim godinama, kontinuirano koristi sve dok više ne deluje. To je i potvrđeno u anketi farmera ovaca u Tenesiju, gde je svako drugo stado tretirano samo jednim antihelminnikom dok nije postao neefektivan [59]. Dugotrajna upotreba levamizola kod goveda je dovela do rezistencije, iako je godišnja učestalost tretmana bila manja i činilo se da helminti goveda sporije razvijaju rezistenciju u poređenju sa onima kod malih preživara [60]. Česta upotreba ivermektina bez smenjivanja sa drugim lekovima je takođe prijavljena kao razlog brzog razvoja rezistencije kod *H. contortus* u Južnoj Africi [61] i Novom Zelandu [62]. Zbog svega navedenog postoji široki konsenzus o potrebi da se poboljša i primeni rano otkrivanje rezistencije na osnovu aktivnog praćenja efikasnosti antihelmintika kako bi se blagovremeno odgovorilo na njen razvoj [39].

2.2.4. Metode za ispitivanje efikasnosti antihelmintika i monitoring rezistencije

Praćenje prisustva rezistencije na određenom području i globalno nije jednostavan zadatak s obzirom na kompleksne mehanizme njenog razvoja i određenu ograničenost postojećih metoda za njenu detekciju [63]. Zbog toga detekcija i određivanje stepena antihelminitičke rezistencije podrazumeva upotrebu različitih *in vitro* i *in vivo* metoda, njihovo usavršavanje i

standardizaciju, kao i ispitivanje novih metoda kao što su različite molekularne tehnike [47][64]. Na taj se može dobiti jasna slika prisustva i raširenosti rezistencije širom sveta i u određenim područjima, što je neophodno za razvoj strategija u cilju njenog suzbijanja. Kao najznačajnija metoda kod nematoda od veterinarskog značaja se navodi test smanjenja broja jaja nematoda u fecesu životinja (eng. *faecal egg count reduction test* - FECRT). FECRT predstavlja *in vivo* metodu čiji se princip zasniva na uzimanje uzoraka fecesa od određene populacije životinja i brojanju jaja parazita (eng. *faecal egg count* - FEC). Pri tome se za brojanje jaja koristi neka od standardnih tehnika poput McMaster ili Cornel-Wisconsin, ili neka od novijih tehnika poput mini-FLOTAC [39,65]. Nakon toga slede tretmani životinja ispitivanom aktivnom supstancom i posle određenog vremena u zavisnosti od supstance koja se ispituje, uzorci fecesa se ponovo uzimaju. Efikasnost leka se potom meri izračunatom redukcijom broja jaja nakon tretmana, odnosno pod uticajem leka. Prema uputstvu Svetske asocijacije za unapređenje veterinarske parazitologije (eng. *World Association for Advancement of Veterinary Parasitology*, WAAVP), dobijena vrednost redukcije ispod 90% ukazuje na prisustvo rezistencije na lek, dok je kod gastrointestinalnih nematoda ovaca granična vrednost 95% [47].

FECRT je primenljiv kod praktično svih vrsta domaćih životinja uključujući ovce, koze, goveda, konje i svinje [47,53,64]. Njegovi rezultati se smatraju dosta pouzdanim i relevantnim, a glavna prednost mu je što može biti korišćen kod praktično svih dostupnih antihelmintika. Nedostaci ove metode su što se rezistencija teže može detektovati ukoliko je prisutno više od 25% rezistentnih parazita u populaciji i što zahteva veliki broj životinja za ispitivanje, pa nije pogodna za mala stada. Takođe, dobijena vrednost FEC ne odgovara uvek stepenu infekcije adultnim oblicima kod odraslih životinja, iako kod mlađih rezultati prilično dobro koreliraju. Međutim, pored svega napomenutog, ova metoda se uspešno koristi za detekciju antihelmintičke rezistencije u mnogim zemljama sveta već 30 godina [47]. Iako se manje koristi u poređenju sa FECRT, test kontrolisane efikasnosti (eng. *controlled efficacy test*, CET) se smatra najpouzdanijim testom za ispitivanje prisutva antihelmintičke rezistencije, a bazira se na kvantifikaciji stepena zaraženosti helmintima nakon žrtvovanja životinja prethodno tretiranih antihelminticima. Takođe, test je koristan za procenu efikasnosti protiv različitih razvojnih stadijuma parazita kroz žrtvovanje životinja u određeno vreme nakon infekcije, a može biti i značajan i u potvrdi rezultata FECRT. Veoma je osetljiv ako se antihelmintici primenjuju u

odgovarajućim dozama, ali je dosta skup i zahtevan što sprečava njegovu širu primenu za rutinsku detekciju prisustva rezistencije [66].

Od *in vitro* metoda, za detekciju antihelmintičke rezistencije kod gastrointestinalnih nematoda preživara se najčešće koriste test izleganja larvi (eng. *egg hatch test* - EHT) i test razvoja larvi (eng. *larval development test* - LDT). EHT je jedan od standardizovanih testova preporučen od strane WAAVP, a primarno je razvijen u svrhu otkrivanja rezistencije na benzimidazole kod trihostrongilida [64,67]. Danas se sa uspehom koristi za rutinsku detekciju rezistencije kod gastrointestinalnih nematoda ovaca, koza, krava, konja, svinja i ljudi, a razvijen je i EHT za detekciju rezistencije na albendazol kod velikog metilja ovaca [68,69]. Kada su u pitanju nematode, koristi se tiabendazol u različitim rastućim koncentracijama, ili razblažen u predeterminisanim koncentracijama zajedno sa jajima nematoda. Nakon inkubacije od 48h, izlegla (L₁ stadijum larvi) i neizlegla jaja se broje pod mikroskopom i računa se procenat inhibisanih od ukupnog broja jaja pri svakoj koncentraciji leka [47,53,68]. S obzirom da se koriste rastuće koncentracije, test je pogodan za određivanje dozno-zavisne krive kao i farmakoloških parametara poput IC₅₀ (koncentracija koja inhibiše tačno 50% jaja), a na osnovu kojih se porede izolati i procenjuje prisustvo rezistencije. Indikator prisustva je pri tome IC₅₀ veći od 0,1 µg tiabendazola/ml [53,68]. Nedostaci EHT uključuju poteškoće prilikom detekovanja nižih nivoa rezistencije (ispod 25%) i visoku primenljivost samo kod vrsta kod kojih se jaja brzo izlegu, zbog čega je zapravo najpogodniji kod ljudskih helminata [64,67].

Jedini *in vitro* test koji omogućava detekciju rezistencije na sve grupe antihelmintika bez obzira na njihov mehanizam dejstva jeste LDT, pri čemu uspešno simulira *in vivo* efikasnost. Detektuje njeno prisustvo već kada je 10% populacije parazita rezistentno, ali je potrebno više vremena za njegovo izvođenje u poređenju sa EHT, pa se u praksi ipak najčešće koristi EHT. Prvi način izvođenja LDT podrazumeva da se nakon uzimanja uzoraka fecesa i izolacije jaja napravljene suspenzije inkubiraju u uslovima povećane vlažnosti tokom 48h, nakon čega se dodaju rastuće koncentracije leka. Nakon nove inkubacije od 5 dana, broje se L₃ u svakoj suspenziji kako bi se utvrdilo preživljavanje larvi u različitim koncentracijama. Drugi način izvođenja LDT predstavlja zapravo mikro-agarni LDT (eng. *micro-agar larval development test*, MALDT), gde se osnovni rastvori lekova pripremaju njihovim rastvaranjem u dimetil-sulfoksidu (DMSA), a zatim razblažuju u destilovanoj vodi. Izolovana jaja se, zajedno sa navedenim

rastvorima rastućih koncentracija leka, kao i sa kulturnim medijumom koji sadrži ekstrakte kvasca i rastvora soli, inkubiraju tokom 7 dana nakon čega se pod mikroskopom broje neizlegla jaja i L₁-L₃ larve [47].

Da bi se povećala senzitivnost i EHT i LDT testa i smanjio broj potrebnih koncentracija leka, preporučuje se korišćenje doze razgraničenja (ED₉₉), uz pomoć koje je moguće otkriti relativno niski procenat rezistentnih jaja i larvi u populaciji (2-3%) [47,53]. Naime, ovi testovi polaze od činjenice da je potrebna veća koncentracija leka za inhibiciju kod rezistentnih parazita u odnosu na osetljive [66]. Zbog toga, procenat jaja koja se izlegu (EHT), odnosno larve koje se razviju do L₃ stadijuma (LHT) pri dozi razgraničenja zapravo ukazuje na procenat rezistentnih jaja i larvi u populaciji [53]. Tako je, npr., predložena ED₉₉ prilikom izvođenja LDT kod nematoda ovaca za tiabendazol 0,02 µg/ml, a levamizol 0,5 µg/ml [49,53]. Na ovaj način se brže i jednostavnije može doći do potrebnih podataka.

Istraživanja su pokazala da različite molekularne tehnike imaju veću osetljivost i specifičnost u poređenju sa tradicionalnim metodama zasnovanim pre svega na mikroskopskoj i/ili imunološkoj detekciji [47]. Pri tome, najčeće ispitivane tehnike su AS-PCR, RT-PCR i pirosekvenciranje. Tako su navedeni testovi sa uspehom korišćeni za potvrdu prisustva rezistentnih populacija gastrointestinalnih nematoda ovaca na albendazol i ivermektin [70]. Sa druge strane, korišćenjem RFLP (eng. *Restriction fragment length polymorphism*), tehnike koja koristi varijacije u homologim DNK sekvencama, je utvrđeno da postoje različiti aleli otporni na benzimidazole kod različitih rezistentnih sojeva *H. contortus*, zbog čega može biti pogodna za razlikovanje rezistentnih i osetljivih sojeva ovog parazita [47]. Od ostalih metoda ispituju se i protočna citometrija, različite genske probe, frekvencije alela, trans-membranske funkcionalne analize i dr. Međutim, većina ovih metoda se još uvek koristi samo za istraživačke svrhe [64].

2.3. Savremene strategije kontrole gastrointestinalnih nematoda ovaca

Rastući problem antihelmintičke rezistencije zahteva i definisanje jasnih strategija u cilju borbe protiv nje. Strategije novijeg datuma se baziraju na integrisanom pristupu koji označava upotrebu više mera u kontroli gastrointestinalnih nematoda ovaca [14,15,71,72]. U principu, ovaj

pristup se oslanjana na dva glavna aspekta: racionalnu upotrebu antihelmintika sa jedne, kao i primenu različitih alternativa sa druge strane. Na ovaj način je moguće usporavanje razvoja i širenja antihelmintičke rezistencije i održiva kontrola ovih parazita (Tabela 2).

Tabela 2. Strategije održive kontrole gastrointestinalnih nematoda ovaca [13,35]

Racionalna upotreba antihelmintika	Alternativne strategije
<ul style="list-style-type: none"> • Refugija (ciljani tretmani, ciljani selektivni tretmani) • Kombinacija antihelmitnika • Rotacija korišćenih klasa antihelmintika 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetska selekcija životinja • Upravljanje pašnjacima • Upravljanje ishranom • Biološka regulacija • Razvoj vakcina • Fitoterapija (upotreba biljaka ili njihovih produkata kao što su ekstrakti i etarska ulja)

2.3.1. Racionalna upotreba antihelmintika

Strategije zasnovane na refugiji - U kontekstu rezistencije na lekove kod parazita životinja, termin refugija se odnosi na netretirane životinje i okruženje u cilju održavanja parazita osetljivih na lekove u uslovima izloženosti lekovima [73]. U suštini, refugija označava procenat populacija parazita koji izbegne izloženost antihelminticima [74]. U praksi, ovaj koncept se često oslanja na tretman samo jednog dela životinja, kako bi se ostavio neki deo populacije netretiranim i samim tim oslobođen pritiska selekcije koji se primenjuje izlaganjem leku. Kod gastrointestinalnih nematoda na primer, kontrola u velikoj meri zavisi od tretmana svih životinja u grupi antihelminticima širokog spektra eliminišući time osetljive helminte, a ostavljajući rezistentne genotipove da kontaminiraju pašnjak. Na ovaj način se, kao što je već rečeno,

favorizuje selekcija otpornih parazita i njihovo širenje, doprinoseći time i širenju rezistencije. Minimiziranjem izloženosti lekovima, strategije kontrole zasnovane na refugiji imaju za cilj očuvanje osetljivih alela u populaciji. Dobijena mešavina rezistentnih i osetljivih genotipova na pašnjacima bi tada trebalo omogućiti potencijal za ukrštanje rezistentnih i osetljivih sojeva, odnosno da razblaži učestalost rezistentnih genotipova unutar populacije [73].

Ciljani tretmani (eng. *target treatments*, TT) označavaju tretiranje cele grupe na osnovu saznanja o riziku, odnosno parametara koji kvantifikuju težinu infekcije [75]. TT se daju u najprikladnije vreme imajući u vidu potrebu za održavanjem refugija i služe za smanjenje broja antihelmintičkih tretmana odnosno povećanja intervala između njih, omogućavajući osetljivim genotipovima bolju priliku da se uspostave na pašnjaku [76]. Ciljani tretmani se dalje mogu dodatno poboljšati ciljanim selektivnim tretmanima (eng. *target selective treatments*, TST), koji su usmereni na samo pojedinačne životinje unutar grupe koje zaista zahtevaju tretman, a kako bi se obezbedile epidemiološke ili proizvodne koristi [75]. Naime, populacije gastrointestinalnih nematoda kod malih preživara su visoko agregirane, odnosno prekomerno raširene unutar nekoliko domaćina, pri čemu se oko 80% parazita nalazi u samo 20-30% domaćina, dok veći broj životinja ima mali stepen infekcije. Zbog toga bi ciljani selektivni tretmani trebali biti usmereni na one životinje koje su osetljive na bolesti ili na one koje najviše kontaminiraju pašnjake, iako to zahteva mogućnost da se takve jedinke identifikuju unutar stada [76]. Pored navedenih, a s obzirom da opterećenost nematodama fluktuiru tokom godine, tretmani mogu biti usmereni na identifikovanje potencijalnih perioda rizika umesto konvencionalnih, supresivnih strategija lečenja, a ova strategija je poznata kao strateški profilaktički tretman (eng. *strategic prophylactic treatment*, SPT) [77].

TT i TST, posebno ciljani selektivni tretmani, se baziraju na određivanju realnih pragova za pojedinačne ili kombinovane patofiziološke i/ili proizvodno zasnovane indikatore lečenja kao što su klinički simptomi, brojanje jaja nematoda u fecesu (FEC), FAMACHA skor, ocena telesne kondicije, prirast, prinosi mleka, DISCO i DAG skor i slično [75]. FEC uključuje brojanje jaja u svežem fecesu, pri čemu se jaja gastrointestinalnih nematoda mogu lako prepoznati u odnosu na jaja drugih parazita, iako tačna dijagnostika pojedinih rodova poput onih *Haemonchus*, *Trichostrongylus* i *Teladorsagia* može biti otežana [32]. Ovaj indikator zapravo najdirektnije govori o stepenu infekcije kod životinja pa bi se potencijalno mogao koristiti za TT i TST, mada

poseduje i neka ograničenja s obzirom da se uzorci moraju prvo poslati u laboratoriju i potom analizirati [32,76]. FAMACHA skor se bazira na oceni boje konjunktivalne mukozne membrane na skali od 1-5, kako bi se procenio stepen anemije uzrokovan nematodom koja sisa krv, *H. contortus*, pri čemu bi se trebao uzeti u obzir fiziološki status životinja (laktacija, graviditet itd). Ovaj indikator se pokazao efikasnim u identifikaciji životinja kojima je potreban tretman, ali je glavno ograničenje što se odnosi samo na jednu vrstu [76].

Ocena telesna kondicije (OTK) je jednostavna za primenjivanje i služi kao indikator opšteg stanja i telesnih rezervi (1-5), mada još uvek ne postoji generalni konsenzus oko praga za tretman [8]. Pojedina istraživanja na mlečnim kozama su pokazala da životinje u prvoj laktaciji, kao i životinje sa više partusa koje daju visok prinos mleka imaju veći FEC [79]. Usmeravanje tretmana na ove grupe životinja je dovelo do smanjenja broja tretmana u prvoj (48%) i drugoj (66%), bez negativnih efekata na proizvodnju mleka [80]. Ostali navedeni markeri se takođe mogu koristiti, međutim generalno pozitivna ocena za tretman u izolovanim metodama za TST ne odgovara uvek visokom stepenu infekcije parazitima. Shodno tome su predložene i odgovarajuće kombinovane šeme za TST, npr. uzimanje uzoraka fecesa od životinja sa FAMACHA skor 4 ili više ili OTK manje od 2, a da se tretiraju samo one životinje čiji FEC prevazilazi prag kod prirodno zaraženih životinja na nivou farme (npr. 750 ili veći). Na ovaj način je kod ovaca i koza pod vlažnim tropskim uslovima u Meksiku izbegnuto 70% nepotrebnih tretmana [81,82].

Kombinacija i rotacija antihelmintika - Istovremeno lečenje sa dva leka iz različitih grupa antihelmintika je jedna od metoda prevencije razvoja rezistencije. U poređenju sa pojedinačnim efektima lekova, primenom antihelmintika iz različitih hemijskih dobija se sinergistički efekat, što dovodi do klinički značajnog povećanja efikasnosti lečenja. Međutim, ovaj efekat je najizraženiji kada je nivo rezistencije nizak, dok prisustvo visokog nivoa rezistencije na oba leka verovatno neće proizvesti prihvatljiv nivo efikasnosti [15]. Sinergizam između albendazola i ivermektina ili dietilkarbamazina, kao i između mebendazola i levamizola ili pirantela je opisan za tretman nekih parazita koji se prenose putem kontaminiranog zemljišta [83]. Kada su u pitanju gastrointestinalne nematode malih preživara, upotreba kombinacije je poželjna iz dva razloga: 1) održiva kontrola nematoda u prisustvu rezistencije i 2) da odloži razvoj rezistencije na hemijske grupe komponenti kod onih vrsta kod kojih otpornost još nije

evidentna. Dosadašnja istraživanja su pokazala da upotreba kombinacija obezbeđuje održiviju kontrolu nematoda kod ovaca nego kada se lekovi koriste odvojeno [15].

Kada je u pitanju rotacija antihelmintika, ranije je savetovano da se različite antihelmintičke grupe smenjuju svake jedne do dve godine. Ova strategija je imala za cilj da produži efikasnost svakog od njih omogućavajući vraćanje osetljivosti kod nematoda kada antihelmintik nije bio u upotrebi. Međutim, ovaj pristup je verovatno efikasan samo kada je rezistencija u vrlo ranoj fazi razvoja i pre nego što se detektuje, kada bi prirodna selekcija mogla da smanji prevalencu parazita koji sadrže alele otpornosti, zbog čega je njegov uspeh kod benzimidazola i makrocikličnih laktona upitan [77]. Kompjuterski zasnovan model je demonstrirao da ukoliko se koristi strategija kombinacije lekova iz različitih grupa kada se lekovi prvi put uvedu, primetna rezistencija se neće razviti više od 20 godina. Sa druge strane, isti model je ukazao na to da rotacija lekova rezultuje visokim stepenom rezistencije u roku od 15 do 20 godina. Zbog toga neki parazitolozi predlažu strategiju da se koristi jedan lek dok više ne bude efikasan, a zatim se koristi drugi lek [15].

2.3.2. Alternativne strategije

Genetska selekcija životinja - Odnosi se na postojanje genetske varijacije domaćina i preovlađujućih uslova životne sredine, a uključuje selekciju jedinki otpornih na gastrointestinalne nematode [84]. Kod ovaca je moguće manipulirati uzgojnim linijama kako bi se proizvele jake fenotipske razlike, u dobro definisanim pedigreima, u relativno kratkom vremenskom periodu. Rezistencija na nematode ima nisku do visoku heritabilnost (0,01 do 0,54) kod malih preživara, a naslednost ove osobine ukazuje na potencijal dobijanja genetske dobiti kroz selekciju. Tako bi, na primer, odabir životinja sa najnižim brojem jaja u fecesu povećao otpornost domaćina na parazite [85], kako je i pokazano u pojedinim istraživanjima gde je FEC nakon selekcije smanjen za 69% [86]. Ipak, korišćenje genetskih resursa kao sredstvo za kontrolu parazita još uvek nije dovoljno iskorišćeno, pri čemu je pristupe genetske kontrole teško implementirati u sistemima malih proizvodnih gazdinstava uglavnom zbog nedostataka vođenja evidencije podataka. Takođe, treba imati u vidu i tehnička i infrastrukturna pitanja u programima genetske selekcije (problem malih stada, loše infrastrukture i slično), naročito u niže razvijenim zemljama i zemljama u razvoju [84].

Upravljanje pašnjakom - Cilj upravljanja pašnjacima je da se minimizira oslanjanje na upotrebu antihelmintika. To se može postići putem izbegavanja izloženosti opterećenju parazitima koje bi dovelo do kliničke bolesti i gubitaka u proizvodnji, a da se pri tome u isto vreme dozvoli ovcima da izgrade imunitet na parazite [77]. Neke od strategija upravljanja pašnjacima sa ciljem izbegavanja izloženosti životinja velikom broju infektivnih larvi jesu: a) podela pašnjaka na manje parcele kako bi se omogućilo duže vreme pre ponovne ispaše; b) određen broj životinja na nekoj površini (denzitet) kako bi se pored izloženosti nematodama smanjila i kontaminacija pašnjaka, npr. 5 ovaca, 5-7 koza ili 1 krava po 4 m²; c) praćenje stanja trava kako bi se osiguralo da ne dođe do prekomerne ispaše i da bi se održao produktivan pašnjak; d) strateška dehelmintizacija u rano proleće ili na početku kišne sezone, u cilju uklanjanje nedavno izniklih larvi pre nego što kontaminiraju pašnjak; [15] e) držanje jagnjadi u sličnim starosnim grupama nakon izlaska na pašu, što ima prednost kod potrebe za tretiranjem i korist FEC-a; f) ispaša krava (ne i koza) i ovaca zajedno što smanjuje denzitet životinja iste vrste ili sistem rotacije između goveda i ovaca; g) korišćenje zrelih ovaca u dobroj kondiciji nakon zalučenja u cilju smanjenja nivoa kontaminacije na pašnjacima visokog rizika [77].

Upravljanje ishranom - Manipulacija ishranom može služiti kao alat u borbi protiv ovih parazita, s obzirom da su oni integrisani u lanac ishrane malih preživara. Izbalansiran sistem ispaše obezbeđuje adekvatan izvor hranljivih materija i prihvatljivo opterećenje parazitima koje omogućava optimalan nivo produktivnosti. Međutim, poremećaji u ovoj ravnoteži mogu izazvati ozbiljne infekcije. Zbog toga životinje koje primaju dopunsku ishranu mogu postići poboljšanu otpornost na infekcije ovim parazitima. Dopunska hrana podrazumeva da farmeri obezbeđuju dodatnu hranu svojim životinjama, osim hrane koju svaka životinja konzumira na polju tokom ispaše. Dodatak se pri tome sastoji od jednog ili više sastojaka u zavisnosti od njihove dostupnosti farmerima, a koji sadrže određene količine proteina, energije i drugih makro i mikro sastojaka. Prednosti dopunske hrane uključuju smanjenje patofiziološkog efekta uticaja gastrointestinalnog parazitizma, poboljšanu produktivnost, smanjenje prirodnih infekcija (životinje jedu manje hrane sa polja, samim tim unose i manje larvi), razblaživanje broja jaja nematoda u fecesu (ista ili manja količina jaja u većoj količini fecesa), mogući direktan antihelmintički efekat pojedinih suplemenata (npr. mahunarke bogate taninom), kao i ekonomsku isplativost [87].

Biološka kontrola - U kontekstu gastrointestinalnih nematoda, biokontrola [88] podrazumeva upotrebu njihovih prirodnih neprijatelja, što uključuje druge parazite, predatore i patogene, a u cilju smanjenja slobodnoživećih stadijuma na pašnjacima [7]. Na taj način se ovom metodom smanjuje broj infektivnih stadijuma koje ingestijom unose različite domaće životinje, a cilj je da se time opterećenost parazitima smanji na nivo koji će tolerasti prirodni imunitet životinja. Zbog toga se biološka kontrola razlikuju od drugih mera koje su usmerene na određeni razvojni stadijum nematoda. Organizmi koji se koriste za biokontrolu mogu ispoljiti svoje dejstvo dvojako: direktno (dejstvo na same nematode) i indirektno (uništavanjem staništa za parazite). Kada je u pitanju neposredno dejstvo na nematode, u obzir dolaze različite gljive, bakterije, virusi, druge nematode, amebe, protozoe itd., a od njih su gljive najviše ispitane [89].

Nematofagne gljive predstavljaju karnivorne vrste koje se nalaze širom sveta i prirodne neprijatelje nematoda. Pri tome, grupe koje su pokazale najveći potencijal su gljive koje koriste lepljive zamke (rodovi *Duddingtonia*, *Arthrobotrys* i *Monacrosporium*), kao i ovoidne, oportunističke gljive. Način na koji se najčešće primenjuju ove gljive jeste u hrani, nakon kulture u zrnju ili u obliku natrijum alginata. Spore se aktiviraju i napadaju larve parazita tek nakon što prođu kroz gastrointestinalni trakt životinje i izbače se sa fecesom, zbog čega se ne očekuju štetni efekti na samu životinju. Tako je, na primer, *D. flagrans* gljiva koja je pokazala značajan efekat protiv infektivnih larvi nematoda ovaca (37,6 - 91,5%), što sugeriše na njenu sposobnost da smanji broj infektivnih larvi na pašnjaku [7]. Sa druge strane, neki sojevi bakterije *Bacillus thuringiensis* koja proizvodi insekticidni δ -endotoksin (tzv. kristalni proteini), su pokazali visoku *in vitro* efikasnost protiv adultnih oblika *H. contortus*, *T. colubriformis* i *O. circumcincta* [89,90]. Slobodnoživeće predatorske nematode poput *Butlerius butleri* (dokazana efikasnost protiv *H. contortus* za 91,8% u fekalnoj kulturi u laboratorijskim uslovima) [91], i grinje (*Lasioseius penicilliger*) se mogu koristiti za biokontrolu, mada im je problem nedostatak specifičnosti efekta samo prema gastrointestinalnim nematodama, pa mogu predstavljati rizik za neciljne organizme [7].

Kada je u pitanju indirektna biološka kontrola, sveprisutna uloga balegara i njihova ekološka uloga u razgradnji životinjskih fekalija čini ove insekte istaknutim kandidatima za biološku kontrolu. Mehanizam pomoću kojih balegari mogu pomoći u smanjenju slobodnoživećih stadijuma nematoda jeste mlevenjem usnim aparatom, pri čemu razgrađuju

progutana jaja i larve, iako to još nije sa sigurnošću potvrđeno. Alternativno, balegari mogu da ometaju larve nematoda formiranjem i zakopavanjem kuglica, što se povezuje sa zakopavanjem larvi u dubinu gde se iste neće vratiti na površinu, te će na taj način biti smanjen broj onih larvi koji se pasivno nanose na bilje tokom padavina. Slično kao i balegari, i kišne gliste se hrane životinjskom balegom i doprinose razgradnji fekalnih tačaka, a njihova uloga je posebno važna u umerenim, vlažnim klimatima [7,89]. Tako je dokazano je da prisustvo kišnih glista smanjuje broj *T. circumcincta* za čak 63% kod ovaca [92].

Razvoj vakcina - Vakcine se smatraju privlačnom alternativnom merom kontrole nematoda jer je malo verovatno da će biti podložne razvoju rezistencije kod parazita, a ekološki su prihvatljive. Nedavno je pokazano da vakcina zasnovana na osam rekombinativnih antigena identifikovanih kod *T. circumcincta* stimuliše značajne nivoe zaštite kod jagnjadi, kao i kod ovaca tokom peripartalnog perioda, u poređenju sa nevakcinisanim jedinkama. I kod jagnjadi i kod ovaca je pri tome primećeno smanjeno izlučivanje jaja nematoda u fecesu kod vakcinisanih jedinki [93]. Tokom protekle dve decenije napravljen je značajan napredak u identifikovanju nekoliko antigena iz *H. contortus*, a njihova zaštitna efikasnost je procenjena u vidu rekombinativne ili pojedinačne DNK vakcine. Kao potencijal antigen se pokazao 110 kDa integralni membranski glikoprotein H11, sa preko 75% smanjenja opterećenja parazitima i preko 90% redukcije broja jaja nematoda u fecesu [94].

Vakcina Barbervax®, WormVax koja sadrži dva prirodna integralna proteina crevne membrane *H. contortus* (H11 i H-gal-GP) je nedavno licencirana za upotrebu u Australiji. Njena efikasnost je procenjena kod peripartalnih ovaca sa dva različita režima ishrane, pri čemu je dostigla preko 80% smanjenja broja jaja nematoda u fecesu i visok titar antitela [95]. Ipak to sugeriše i na značaj kombinovanog efekta vakcinacije uz poboljšanje ishrane. Takođe, s obzirom da ekstenzivne genetske varijacije i imunoregulatorne karakteristike parazita očigledno ometaju razvoj vakcine, istraživači su se fokusirali na korišćenje naprednih molekularnih pristupa u cilju razvoja efikasne vakcine [94]. Sudeći prema navedenim dosadašnjim ispitivanjima, verovatno će biti potrebno razviti specifične vakcine za kontrolu svake vrste pojedinačno, iako bi *panspecies* vakcina bila idealan proizvod [96].

Botanički antihelmintici - Fitoterapija je definisana kao upotreba biljaka za lečenje različitih bolesti, što je praksa koja datira od početka ljudske civilizacije. Danas su biljke i

njihovi produkti važan deo farmakopeje u različitim razvijenim i nerazvijenim delovima sveta. Naime, sa povećanjem regionalne i globalne integracije, tradicionalne zajednice su izložene uticaju savremenih zajednica i obrnuto, što je dovelo do dvosmernog procesa inkorporacije kulture. Tako je danas u naprednim društvima interes za lekovitim biljkama značajno porastao, što je podstaklo potragu za novim farmakološkim supstancama od strane industrije lekova čineći biljne resurse vrednijim. Zbog toga je fitoterapija je privukla interesovanje istraživača i u humanoj i veterinarskoj medicini, sa obećavajućim rezultatima u vezi sa antiparazitskom aktivnošću [17,97]. U tom kontekstu, među ostalim navedenim alternativama, upotreba botaničkih antihelmintika se navodi kao posebno interesantnom za buduću kontrolu gastrointestinalnih nematoda kod ovaca [17,98].

Različite biljke su u tradicionalnoj medicini korišćene za lečenje raznih bolesti i kod ljudi i kod životinja. Zbog toga, alternativni pristupi kontroli nematoda kod ovaca mogu uključivati kombinacije tradicionalnih biljnih lekova, farmakološki aktivnih biljnih jedinjenja, kao i samolečenje životinja na ispaši [99]. Jedinjenja iz biljaka za koje je utvrđeno da imaju nematicidno dejstvo pripadaju velikoj grupi supstanci zvanoj sekundarni metaboliti, a koja potiču iz alelopatskih odnosa između biljaka i njihove okoline [17]. Ovi sekundarni metaboliti predstavljaju fitohemikalije koje se dobijaju biosintezom iz biljnih primarnih metabolita (ugljenih hidrata, amino kiselina, lipida) i nisu direktno uključeni u rast, razvoj ili reprodukciju biljaka. Većina ih se koristi u svrhu odbrane od predatora [100]. Sintetizuju se alternativnim putevima ćelijskog metabolizma, koji uključuju šikiminsku kiselinu i aminokiseline i skladište se u organelama kao što su ćelijske vakuole ili trihomi (dodaci epidermisa), često u organima i ćelijama koji su udaljeni od mesta sinteze. Biljke proizvode različite supstance u isto vreme, kao odgovor na različite stimuluse, pri čemu se ponekad više od jedne supstance može proizvesti kao odgovor na isti agens. Sekundarni metaboliti se mogu proizvesti u svim delovima biljke (list, stablo, koren, cvet, semenke i slično), a na koncentraciju utiču vrsta, faza razvoja i klimatski i geografski uslovi. Mogu biti povezani sa odbrambenim mehanizmima protiv neprijatelja (dobri kandidati za fitoterapijske proizvode), a mogu biti i usmereni protiv drugih biljaka koje se takmiče za hranljive materije i zaštitu od sunčeve svetlosti. Oni takođe mogu delovati na način da privlače oprašivače na cveće, da raspršuju seme i promovišu fiksaciju azota [17,101,102].

Klasifikacija sekundarnih metabolita biljaka je veoma složena i u literaturnim navodima se mogu naći različite podele, uglavnom prema hemijskom poreklu. Na taj način se generalno mogu klasifikovati na terpene, fenole (jednostavni fenoli, tanini, kumarini, flavonoidi, izoflavonoidi, lignini, fenilpropanoidi i sl.), alkaloide (npr. nikotin i kofein), saponine i druge [103,104]. Pri tome, terpenska jedinjenja, kao i polifenoli, posebno tanini, flavonoidi i fenilpropanoidi, se uglavnom povezuju sa antihelmintičkim, antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima [99]. U svakom slučaju, predloženo je da se bioaktivne biljke kod životinja mogu koristiti na različite načine: unosom od strane životinja na ispaši, branjem bioaktivnih biljaka za ishranu životinja i davanjem u oborima i tovorima, kao i proizvodnjom ekstrahata i drugih biljnih proizvoda [105].

Poznavanje činjenice da određena stočna hrana poseduje antihelmintički efekat je dovelo do ideje da se ispita i princip samoizlečenja kod preživara [106]. Naime, do sada je pokazano da ovce zaražene sa gastrointestinalnim nematodama konzumiraju više stočne hrane bogate taninima od neinficiranih životinja. Iako bioaktivni metaboliti smanjuju svarljivost hrane, životinje na paši znatno više jedu ovakvu hranu kada su zaražene parazitima u poređenju sa nezaraženim životinjama. Takođe, suplementacija biljnom hranom utiče na smanjenje broja jaja u fecesu (smanjena plodnost kod adulta), kao i samog broj prisutnih parazita kod životinje u umerenim uslovima. Konzumacija stočne hrane bogate ovim materijama u svakom slučaju negativno utiče na razvoj nekih nematoda u organizmu poput *H. contortus* i *T. colubriformis* i razvoj infekcije. U pojedinim slučajevima biljni aktivne materije mogu dospeti i do izmeta i uticati na proces izleganja larvi, ili čak na pokretljivost infektivnih larvi, što znači smanjenje potencijalne infektivnosti jaja u fecesu i manje larvi za kontaminaciju pašnjaka [87].

Kada su u pitanju tanini, oni se prema svojoj hemijskoj strukturi dele na kondezovane i hidrolizujuće. Prvi se obično nalaze u tropskim krmnim travama i dele se na različite druge grupe, sa naglaskom na prodelfinidine i procijanide zbog njihove antihelmintičke aktivnosti [107]. Direktna efekat tanina potiče od njihovog afiniteta da se vezuju za proteine parazita, uzrokujući promene u njihovoj anatomiji i degeneraciju muskulature i crevnih ćelija [108]. Ove promene mogu smanjiti pokretljivost nematoda usled metaboličkih promena koje nastaju usled loma kutikule. Izazivanjem promena u prednjim delovima parazita utiču na ishranu parazita, a razaranjem reproduktivnih delova se ometa oslobađanje jaja kod ženki. Drugi efekat tanina

nastaje usled interakcije ovih metabolita i omotača L₃ larvi sprečavajući njihovo uklanjanje, što ometa prodiranje larvi u gastrointestinalni trakt domaćina. Pored direktnog, tanini imaju i indirektne antihelminitičke efekte, s obzirom da se kod preživara vezuju za proteine iz hrane u buragu što za posledicu ima manju razgradnju proteina od strane bakterija, jačanje imuniteta i odgovora na štetne agense među kojima su i nematode [17].

Lektini (neimunološki proteini) imaju indirektno dejstvo na nematode aktivacijom lokalnog imunološkog odgovora sa povećanjem eozinofila, stvaranjem sluznih ćelija i povećanjem T-pomoćnih limfocita u sluzokoži gastrointestinalnih trakta zaraženih životinja. Pored toga, lektini imaju i direktno dejstvo na plodnost *Teladorsagia circumcincta* i *Trichostrongylus colubriformis*, a efekat mogu da ostvare i putem inhibicije ribozoma ometajući sintezu proteina. Saponini imaju amfipatsku karakteristiku, delujući kao rastvor detrdženta. Kada se progutaju, oni se apsorbuju brzo ili kao micelle u crevnim ćelijama. U kontaktu sa biološkom membranom, neki saponini mogu da ih destabilizuju i na taj način da utiču na jonsku razmenu, slabeći apsorpciju molekula i transport šećera, a verovatno na isti način deluju i na helminte [17]. I za pojedine flavonoide poput isorhamnetina je utvrđeno dejstvo protiv gastrointestinalnih nematoda, na primer protiv jaja i larvi *H. contortus*, pri čemu se efekat može pripisati interakciji sa lipidnim slojevima u membrane i uticajem na fiziološke procese poput transporta proteina, kao i ometanju električnih svojstava membrane [109].

Ekstrakti biljaka su složene mešavine koje sadrže široku raznolikost sekundarnih metabolita u različitom opsegu koncentracije [17]. Zbog značajnog ekonomskog uticaja gastrointestinalnih nematoda širom sveta, mnoga istraživanja vezana za biljne ekstrakte se fokusiraju na traženje bioaktivnih jedinjenja iz biljaka protiv ovih parazita [89]. Kada se ekstrakti testiraju, u mnogim slučajevima dve ili više hemijskih supstanci sinergistički su odgovorne za antiparazitski efekat, od kojih nijedna posebno ne bi bila efikasna sama. Tako se efekat kondenzovanih tanina, prodelfinidina i procijanidina na inhibiciju izlučivanja larvi *H. contortus* može poboljšati povezivanjem sa polifenolima kao što su kvercetin i luteolin, sa sinergističkim dejstvom u zavisnosti od strukture tanina. Utvrđeno je da je procijanidin manje aktivan, što ukazuje na različite aktivnosti među taninima. Sličan efekat je primećen sa kofeinskom kiselinom, čije je ovoidno dejstvo pojačano kvercetinom. Osnovni uslov za sinergistički efekat u ovom slučaju je bio održavanje fiksnog odnosa kvercetin:kofeinska kiselina u ekstraktu. Kada je

odnos bio promenjen, ovicidni efekat je smanjen. Takođe, može se javiti i antagonizam, što je zabeležen u slučaju polifenolnih jedinjenja koja su smanjila antihelmintričku aktivnost acetona [17].

2.4. ETARSKA ULJA

2.4.1. Definicija i opšte osobine

Etarska ili eterična ulja predstavljaju aromatične supstance prisutne u specijalizovanim ćelijama ili žlezdama određenih biljaka. Ove supstance biljka koristi sa jedne strane za zaštitu od predatora i štetočina, a sa druge za privlačenje oprašivača. Predstavljaju visokokoncentrovane isparljive supstance ekstrahovane iz različitih delova određenih biljnih vrsta, tzv. aromatičnih, od kojih svaka ima specifično terapijsko i energetsko dejstvo. U svakom slučaju, etarska ulja su isparljive tečnosti i veoma složene molekularne supstance sa izuzetno moćnim i preciznim dejstvom, a dobijaju su se od esencije bogate prirodnim ukusima i aktivnim sastojcima koje luče ćelije pojedinih delova biljaka [110].

Etarska ulja zapravo nisu ulja jer ne sadrže masne supstance [110]. Rastvorljiva su u alkoholu, etru i fiksnim uljima, ali nerastvorljiva u vodi. Veoma su isparljiva i uglavnom tečna i bezbojna na sobnoj temperaturi. Imaju karakterističan miris i gustinu manju od jedinice, sa izuzetkom nekoliko slučajeva (npr. cimet, sasafra i vetiver). S obzirom na karakterističan miris, odgovorna su za različite mirise koje biljke emituju. Takođe, imaju indeks prelamanja i veoma visoku optičku aktivnost [111].

Etarska ulja se široko koriste u kozmetičkoj industriji, parfimerijama i industriji hrane. Koriste se takođe i u aromaterapiji, što je osmišljeno kao terapijska tehnika koja uključuje masažu, inhalacije ili kupke pomoću ovih isparljivih ulja. Kao što je već rečeno, kod samih biljaka imaju ulogu neke vrste imunog sistema ili hemijskih signala koji omogućavaju biljci da reguliše svoju okolinu (ekološka uloga) u smislu privlačenja insekata oprašivača, a sa druge strane poseduju antifungalne, insekticidne i različite druge aktivnosti u cilju zaštite biljaka protiv predatora. Takođe, imaju ulogu u inhibiciji klijanja semena ili komunikacije između biljaka (npr. emisioni signali koji hemijski singalizuju prisustvo biljojeda). U skladu sa svim nabrojanim, različiti delovi biljaka mogu sadržati etarska ulja:

- List (eukaliptus, nana, timijan, čubar);
- Cvet (pomorandža, lavanda);
- Rizom (đumbir, iđirot);
- Seme (kim, korijander);
- Plod (komorač, anis);
- Koren i stablo (cimet, sandalovina, ružino drvo) [110,111]

Etarska ulja se iz biljaka mogu dobiti različitim metodama ekstrakcije. To uključuje različite metode destilacije, ekspresiju, ekstrakciju sa različitim rastvaračima, kao i ekstrakciju uz pomoć mikrotalasne peći [112]. Najčešće se u literaturnim navodima spominju hidrodestilacija (destilaciju u vodi i destilacija u vodenoj pari) i ekstrakcija uz pomoć različitih rastvarača (etar, petroleum, benzen, aceton i toluen) ili superkritičnih tečnosti (ugljeni anhidrid pod pritiskom). Ove metode se i najčešće koriste prilikom ekstrakcije za različite namene industrijske proizvodnje. U svakom slučaju, ekstrakcija etarskih ulja nije jednostavna s obzirom da su potrebne velike količine biljnog materijala za proizvodnju nekoliko mililitara ulja [110].

2.4.2. Hemijski sastav

Etarska ulja imaju izuzetno složen hemijski sastav sa različitim brojem jedinjenja koja pripadaju različitim hemijskim grupama. Broj do sada identifikovanih ovakvih jedinjenja iznosi nekoliko hiljada, prema nekim procenama između 5000-7000 [112]. U jednom etarskom ulju, istovremeno može biti prisutno i više stotina jedinjenja, ali najčešće nekoliko desetina (20-60) [113]. S obzirom na veliki broj različitih identifikovanih jedinjenja, i podela sastojaka etarskih ulja je veoma složena (Tabela 3, Slika 2). Pri tome dominiraju monoterpeni i seskviterpeni, ali takođe i različita aromatična jedinjenja poput derivata fenilpropana [110].

Terpeni predstavljaju najdominantniju grupu među sastojcima etarskih ulja. Smatraju se polimerima izoprena (C_5H_8) spojenim na odgovarajući način, od glave do repa. Kombinacijom ili spajanjem (sa najmanje jednom dvostrukom vezom) dve jedinice izoprena dobija se terpenska jedinica ($C_{10}H_{16}$). Prema tome, na osnovu fuzije izoprenskih jedinica ili prema broju prstenova, terpeni se mogu klasifikovati na hemiterpene (1 jedinica), monoterpene (2), seskviterpene (3),

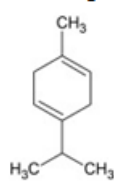
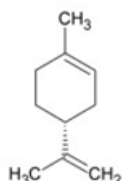
diterpene (4) i slično. Uopšteno i obzirom na hemijsku grupu, terpeni se mogu podeliti na ugljovodonična jedinjenja i oksigenisane derivate odnosno terpenoide (alkoholi, fenoli, aldehidi, ketoni, etri, estri i epoksidi). Postoje još neke podele pa se npr. ugljovodonični terpeni mogu podeliti na aciklične i ciklične, a ciklični terpeni dalje na monociklične, biciklične, triciklične itd. [114] čineći podelu terpena veoma složenom.

Iako fenilpropanoidna jedinjenja procentualno posmatrano čine mali broj jedinjenja etarskih ulja, ova grupa je veoma značajna za industriju aroma i mirisa, ali i sa farmakološkog aspekta. Uključuje sastojke dobijene iz n-propil benzena, pri čemu aromatični prsten može da nosi hidroksi, metoksi i metilen dioksi grupe, a bočni lanac može da sadrži hidroksilnu ili karboksilnu grupu. Na kraju, pored terpena i fenilpropanoida, sastojci etarskih ulja obuhvataju i jedinjenja pravog lanca koja ne sadrže bočne grane, kao i grupu razno. Prva obuhvata jedinjenja pravog lanca neterpenskog porekla koja se takođe može podeliti na ugljovodonike i njihove oksigenisane derivate, dok grupa razno obuhvata jedinjenja koja sadrže sumpor ili azot koja se uglavnom javljaju kao aglikoni ili glukozinolati ili kao njihovi produkti razlaganja uključujući izotiocijanate [114] (Tabela 3).

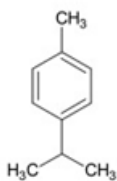
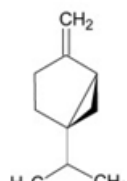
Tabela 3. Podela sastojaka etarskih ulja prema hemijskim grupama i primeri bioaktivnih supstanci [110,111,114]

Hemijska grupa	Bioaktivne supstance
Ugljovodonični terpeni	Limonen, α - i β -pinen, kamfen, α - i γ -terpinen, sabinen, mircen, β -kariofilen, germakren B i D, o i p-cimen itd.
Oksigenisani derivati (terpenoidi)	a) Fenoli - timol, karvakrol b) Alkoholi - linalool, citronelol, geraniol, mentol, α -terpineol, terpinen-4-ol, borneol c) Aldehidi - citral, citronelal, sinensal d) Ketoni - α i β -tujon, kamfor (2-bornenon), menton, karvon e) Oksidi - eukaliptol (1,8-cineole) f) Estri - linalil-acetat, geraniol-acetate,
Fenilpropanoidna jedinjenja	Anetol, metil kavikol (estragol), eugenol, vanilin, safrol, miristicin, cinamaldehyd
Razno (jedinjenja koja sadrže sumpor ili azot)	alil sulfid, alicin, metil antranilat, indol, piridin, pirazin

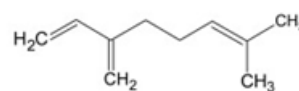
a. Monoterpeni

 γ -Terpinen

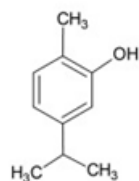
Limonen

*p*-Cimen

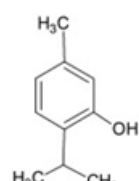
Sabinen

 β -Mircen

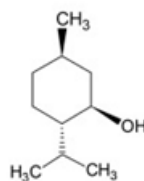
b. Terpenoidi



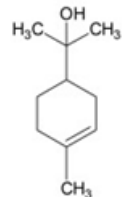
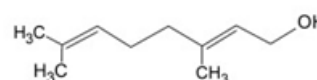
Karvakrol



Timol

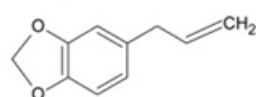


Mentol

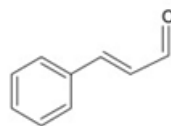
 α -Terpineol

Geraniol

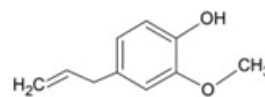
c. Fenilpropanoidi



Safrol



Cinamaldehyd



Eugenol

Slika 2. Hemijske strukture pojedinih bioaktivnih sastojaka etarskih ulja
(Izvor: da Silva i sar., 2021 [115])

Na hemijski sastav etarskih ulja, samim tim i na njihove farmakološke i druge osobine, utiču mnogobrojni faktori koji se mogu podeliti na egzogene i endogene. Egzogeni faktori podrazumevaju faktore regulisane životnom sredinom kao što su svetlost, padavine, mesto uzgoja i zemljište (pH, struktura, salinitet). Sa druge strane, endogeni faktori su striktno povezani sa anatomskim i fiziološkim karakteristikama biljaka i odnose se na hemijske varijacije između različitih delova biljke (mesto produkcije i akumulacije ulja u biljkama), genetski povezane faktore (karakteristike koje regulišu sekundarni metabolizam), kao i za starost biljke. Svi ovi faktori mogu uticati na kvantitativnu i kvalitativnu količinu isparljivih materija u etarskom ulju [116].

Promene u hemijskom sastavu etarskih ulja su vezane za faktore koji se mogu podeliti i na abiotičke i biotičke. Sa jedne strane, abiotički faktori grupišu sve nežive faktore koji utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita biljaka, što uključuje hidrologiju i ostale karakteristike zemljišta, kao i klimat i mikroklimat uopšte u kome biljka raste. Sa druge strane, biotički faktori se odnose na žive organizme koji mogu uticati na proizvodnju etarskih ulja, odnosno različite

organizme i mikroorganizme u zemljištu. To takođe podrazumeva i same biljke. Na kraju, priroda samih etarskih ulja utiče na modifikaciju njihovog hemijskog profila, s obzirom da su većina sastojaka nezasićena (sadrže dvostruku vezu) i osetljiva na svetlost (fotosenzibilna) i kiseonik (oksidabilna) [112].

2.4.3. Primena etarskih ulja u veterinarskoj medicini

Kao što je već napomenuto, etarska ulja danas imaju široku primenu u različitim sferama društva. Tako se koriste u prehrambenoj industriji i industriji alkoholnih i bezalkoholnih pića, kulinarstvu, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (npr. u parfimerijama), zatim kao industrijski dezodoransi (proizvodnja i prerada guma, plastsike, hartike, tekstila, boja), u duvanskoj industriji itd. Međutim, njihova upotreba u humanoj i veterinarskoj medicini, kao i u poljoprivredi u zaštiti bilja sve više dobija na značaju, a s obzirom na njihov efekat na različite patogene. Naime, njihovo baktericidno, fungicidno i virucidno delovanje im omogućava upotrebu u terapiji bolesti prouzrokovanih različitim mikroorganizmima, a takođe deluju repelentno, insekticidno i kao ekto i endoparazitici, pa se mogu koristiti i u terapiji različitih parazitskih oboljenja. Pored toga, koriste se i u terapiji neinfektivnih bolesti s obzirom da poseduju hipotenzivno, vazodilatatorno, antielastazno, antikoagulantno, hipolipidemijsko, antidijabetsko, spazmolitičko, hepatoprotektivno, antioksidativno, antiinflamatorno, antikancerogeno, analgetsko, sedativno, antireumatsko i mnogobrojna druga dejstva, pri čemu uglavnom nemaju genotoksični potencijal [113].

Sve veće interesovanje za upotrebu etarskih ulja u veterinarskoj medicini se može objasniti iz dva razloga. Prvi je pronalaženje efikasnih mera kontrole rezistencije mikroorganizama na antibiotike, odnosno insekata i drugih parazita na pesticide i antiparazitike a drugi zahtev proizvođača i potrošača za namirnicama životinjskog porekla bez sadržaja rezidua koje ostavljaju ovi lekovi. S obzirom da većina etarskih ulja ostvaruje svoje mikrobicidnu i parazitocidnu aktivnost u veoma niskim koncentracijama (0,1 g/kg hrane), to bi im moglo omogućiti široku primenu u lečenju bolesti životinja prouzrokovanih različitim patogenima. Međutim, ostaje problem nedovoljnog broja ovakvih istraživanja i studija toksičnosti na samim životinjama, kao i nekih osobina etarskih ulja poput fotosenzitivnosti, nestabilnosti i ostavljanja mirisa i ukusa u hrani za životinje [113,117]. Takođe, svako etarsko ulje za koje se dokaže

moгуćnost primene mora da bude registrovano od strane nadležne institucije. Pored navedenih tema, predmet budućih studija bi mogla biti i detaljna i precizna kvantitativna i kvalitativna analiza hemijskog sastava etarskih ulja, biodiverzitet biljnih vrsta od kojih se dobijaju već poznata, ali i nova etarska ulja, kultivacija biljaka od kojih se dobijaju etarska ulja najboljeg kvaliteta, eventualna proizvodnja sintetskih etarskih ulja, proizvodnja ulja iz otpadne materije biljnog porekla, upoznavanje sinergizma i antagonizma između različitih etarskih ulja ili ulja i drugih jedinjenja, što sve može biti značajno za njihovu buduću širu primenu [113,118,119].

Na osnovu bioloških i farmakoloških svojstava, etarska ulja koja se koriste u humanoj medicini se mogu podeliti u nekoliko grupa, na ona koja deluju: 1) antiseptički, antibakterijski, antivirusno i antigljivično; 2) na proces granulacije i zarastanja rana; 3) analgetski, antiinflamatorno, antitoksično i hiperemično; 4) relaksantno, sedativno i antidepresivno; 5) spazmolitički, diuretički i na procese varenja; 6) kao imunostimulatori i stabilizatori hormonskih funkcija; 7) insekticidno i repelentno; 8) mukolitički i ekspektorantno; i 9) deodorantno [113,120]. Sa druge strane, klasifikacija etarskih ulja koja se upotrebljavaju ili mogu da se primene u veterinarskoj medicini bi se mogla izvršiti na sledeći način: 1) etarska ulja koja privlače životinje (atraktanti); 2) etarska ulja koja odbijaju životinje (repelenti); 3) etarska ulja sa repelentnim, insekticidnim i antiparazitskim dejstvom; 4) etarska ulja koja se koriste u ishrani životinja i 5) etarska ulja koja se koriste u lečenju životinja [113,117].

S obzirom da su istraživanja o primeni etarskih ulja u veterinarskoj medicini za različite svrhe uglavnom novijeg datuma, podaci i znanje o njihovom korišćenju kod životinja su još uvek ograničeni [121]. Čini se da medicinska dejstva etarskih ulja koja bi mogla imati najveći značaj za veterinarsku medicinu, a koja se ujedno najviše i ispituju, jesu antimikrobno (antibakterijsko i antifungicidno) i antiparazitsko dejstvo protiv endo i ektoparazita [122,123]. To posebno važi ako se ima u vidu rastući problem antimikrobne odnosno antiparazitske rezistencije i opadanje efikasnosti komercijalnih lekova sa jedne, kao i rezidue koje ostavljaju ovi preparati u životinjskim proizvodnjima i životnoj sredini sa druge strane. Dokaza o insekticidnom, repelentom i antiparazitskom delovanju etarskih ulja i njihovih sastojaka protiv ektoparazita farmskih životinja, konja i kućnih ljubimaca ima puno. Tako su etarska ulja, njihove kombinacije ili njihovi izolovani sastojci pokazali dejstva protiv različitih krpelja (fam. *Ixodidae*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. microplus* - ulje *Tagetes minuta*), grinja (*Dermanyssus gallinae* - korijander, crvena kleka, timijan i lavanda, *Sarcoptes scabiei* - različite vrste eukaliptusa), muva,

mušica i buva (*Hippobosca equina* - nana, *Culicoides impunctatus* - kraljevski papar, *Ctenocephalides felis* - slatka narandža), komaraca (*Aedes aegypti* - bosiljak, cimet i timijan) i vaši (*Bovicola ocellatus*, *Bovicola ovis* - čajevac), od značaja za veterinarsku medicinu [123]. Slično je i sa endoparazitima, pa je dokazana efikasnost etarska ulja i njihovih sastojaka protiv različitih protozoa (*Babesia canis* - hajdučka trava [124], *Eimeria tenella* - origano [125], *Giardia duodenalis* – obična limeta [126]), metilja (*Fasciola hepatica*, različita ulja [127]), pantljičara (*Echinococcus granulosus* – origano i timijan [128]) i nematoda (*Ascaris suum* i *Parascaris spp.* – karvakrol [129,130], *Ancylostoma spp.* – epazota [131]) i drugo.

Kada je u pitanju antimikrobna aktivnost etarskih ulja, do sada su sprovedena različita ispitivanja, uglavnom *in vitro*. Pri tome je antibakterijski efekat najčešće bio povezivan za ulje cimeta, origana, timijana i bosiljka. Tako je ulje cimeta pokazalo efekat protiv *Escherichia coli* i *Salmonela enterica* serovari *Enteritidis* i *Typhimurium* kod živine, *Mycobacterium avium paratuberculosis* kod goveda, *Staphylococcus spp.* kod pasa, kao i protiv *Pseudomonas spp* i *Streptococcus iniae* kod riba. Ulja origana i timijana su bila efikasna protiv *E. coli* i *Staphylococcus spp.* kod pasa, *Enterococcus spp.* kod pasa i mačaka, *Streptococcus suis* kod svinja, *Pseudomonas spp.* kod riba, a za timijan je dokazana i *in vivo* efikasnost protiv *Staphylococcus spp.* kod goveda. Bosiljak je pokazao efikasnost protiv *E. coli* i *P. aeruginosa* kod pasa, *E. coli* kod živine, *Pseudomonas spp* kod riba. Od drugih ulja, između ostalih, u sličnim ispitivanjima su se istakli i karanfilić, lavanda, ruzmarin, žalfije i nana [122].

Origano, timijan i majčina dušica su pokazali efekat i protiv različitih gljivičnih patogena (*Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Malassezia pachydermatis*, origano i protiv *Aspergillus fumigatus*) [122], a kombinacije različitih etarskih ulja u odgovarajućim formulacijama su testirane i *in vivo*, npr. protiv atopičnih pasa inficiranih sa *M. pachydermatis* [132] ili kod mačaka sa mikrosporidijazom [133]. U ovim slučajevima su primenjene formulacije dovele do značajnog poboljšanja kod svih ili većine tretiranih životinja.

Imajući u vidu sve navedeno, etarska ulja se sve više koriste u prevenciji i tretiranju različitih oboljenja kod životinja, za sada još uvek najčešće kod monogastričnih poput svinja i živine [134]. Naime, zahvaljujući prethodno navedenim baktericidnim svojstvima, etarska ulja se koriste u prevenciji dijareje kod prasadi. Takođe, kao prirodni kokcidiostatici, igraju značajnu ulogu u ublažavanju simptoma bolesti creva i smanjivanju izlučivanja oocista putem fecesa kod

peradi. Etarska ulja se sve češće koriste i kod pasa i mačaka za različite svrhe, s obzirom na njihovu dokazanu *in vivo* efikasnost protiv različitih patogena poput pomenute *M. pachydermatis*, ali i protiv različitih ektoparazita poput krpelja [135]. Kod preživara je dokazano da antibakterijska svojstva etarska ulja mogu uticati na ruminalnu fermentaciju, odnosno na smanjenje metanogeneze, izlučivanje azota, kao i poboljšanje digestije [134]. Na kraju, ovi biljni proizvodi se mogu koristiti i u terapiji nekih oboljenja neinfektivne etiologije. Iako su informacije na tu temu oskudne, poznata je uloga bosiljka kao ekspektoransa, lavande i čajevca u tretmanu rana, apscesa i opekotina, metilsalicilata (aktivni sastojak nekih ulja) u tretmanu bolova u mišićima kod konja, goveda, ovaca, koza i živine, epazote (meksičkog čaja) u lečenju bolova u stomaku i kolika i dr. [113].

2.4.3.1. Antihelmintički efekat etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca

Antihelmintički potencijal protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca je dokazan za mnogobrojna etarska ulja (Tabela 4). Iz tabele se takođe može videti da se istraživanja sprovode unutar poslednjih 15 godina, pri čemu je primetan porast broja radova u poslednjih nekoliko godina, sugerišući aktuelnost ove teme. Pri tome, neke od najvećih zabeleženih ovicidnih efikasnosti, izraženih u IC_{50} (što niža vrednost to bolje), su zabeležene za etarska ulja *Cymbopogon schoenanthus* i *Cymbopogon martinii* (0,04 i 0,1 mg/ml) [136], zatim *Ruta chalepensis* (0,1 mg/ml) [137], *Mentha arvensis* (0,1 mg/ml) i *Zingiber officinale* (0,11 mg/ml) [138]. Različite vrste *Lippia* spp. su pokazale visoku larvicidnu aktivnost sa IC_{50} manjim od 0,01 mg/ml, *Mentha piperita* sa 0,01 mg/ml [138], kao i *Thymus vulgaris* sa 0,062 mg/ml [139], *Hesperozygis myrtoides* sa 0,07 mg/ml [140] i *Piper aduncum* sa IC_{50} od 0,1 mg/ml [141]. Etarsko ulje *Cymbopogon schoenanthus* je pokazalo i visoku aktivnost protiv pokretljivosti larvi sa IC_{50} od 0,009 mg/ml [136], dok je ulje *Ruta chalepensis* izazvalo inhibiciju pokretljivosti adulta od 87,5%, 8 sati nakon izlaganja pri dozi od 1 mg/ml [137]. U određenim slučajevima, dokazana je antihelmintička efikasnost i izolovanih sastojaka etarskih ulja poput cinamaldehida, anetola, karvona, karvakrola i timola sa IC_{50} u EHT od 0,018, 0,070, 0,085, 0,11, 0,13 mg/ml redom, a pored njih i borneola, kamfora, citrala, eukaliptola, eugenola, linaloola, terpinen-4-ola, vanilina i mnogih drugih [16,142].

Tabela 4. Etarska ulja koja su pokazala *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca

Etarsko ulje(a)	Test	Vrsta GIN	Izvor
<i>Croton Zehneri</i> (dva uzorka), <i>Lippia sidoides</i>	EHT, LDT	<i>Haemonchus contortus</i>	[143]
<i>Eucalyptus globulus</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[144]
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> , <i>Cymbopogon martinii</i> , <i>Mentha piperita</i>	EHT, LDT, LFIT, LET	<i>H. contortus</i> i <i>Trichostrongylus</i> spp.	[136]
<i>Arisaema lobatum</i> , <i>Arisaema franchetianum</i>	EHT, LDT, LMIT	<i>H. contortus</i>	[145]
<i>Artemisia lancea</i>	EHT, LDT, LMIT	<i>H. contortus</i>	[146]
<i>Tagetes minuta</i> , <i>Coriandrum sativum</i> <i>Alpinia zerumbet</i> , <i>Lantana camara</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[147]
<i>Eucalyptus citriodra</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[148]
<i>Zanthoxylum simulans</i>	EHT, LDT, LMIT	<i>H. contortus</i>	[149]
<i>Cymbopogon citratus</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[150]
<i>Ruta chalepensis</i>	EHT, AWMT	<i>H. contortus</i>	[137]
<i>Citrus sinensis</i> , <i>Melaleuca quinquenervia</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[151]
<i>Melaleuca alternifolia</i>	EHT, LMIT	<i>H. contortus</i>	[152]
<i>Thymus vulgaris</i>	EHT, LDT, LMIT, AWMT	<i>H. contortus</i>	[139]
<i>Piper aduncum</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[141]
<i>Hesperozygis myrtoides</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[140]
<i>Lavandula officinalis</i> , <i>Citrus aurantifolia</i> , <i>Anthemis nobile</i>	EHT, LDT, AWMT	<i>H. contortus</i>	[153]
<i>Mentha arvensis</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia organoides</i> , <i>Lippia gracilis</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Mentha piperita</i>	EHT, LDT	<i>H. contortus</i>	[138]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	EHT, LMIT	prirodno-mešana infekcija	[35]
<i>Eucalyptus citriodra</i>	AWMT	<i>H. contortus</i>	[154]
<i>Cymbopogon citratus</i>	EHT	<i>H. contortus</i>	[155]
<i>Origanum majorana</i>	EHT, AWMT	<i>H. contortus</i>	[156]
<i>Coriandrum sativum</i>	LMIT	<i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus axei</i> , <i>T. colubriformis</i> , <i>T. vitrinus</i>	[157]

		<i>Teladorsagia circumcincta</i> i <i>Cooperia oncophora</i>	
<i>Cinnamomum verum</i> , <i>Syzygium aromaticum</i>	Smrtnost larvi nematoda u rastvoru biljnog ulja	<i>H. contortus</i>	[158]
<i>Cinnamomum verum</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Piper</i> <i>cubeba</i> , <i>Citrus aurantiifolia</i> , <i>Lavandula angustifolia</i>	Smrtnost larvi nematoda u rastvoru biljnog ulja	<i>S. papillosus</i>	[158]
<i>Ocimum basilicum</i> , 16 <i>cultivares</i>	EHT	<i>H. contortus</i>	[159]
<i>Origanum vulgare</i> , <i>Pimenta</i> <i>dioica</i>	EHT, pokretljivost larvi	<i>H. contortus</i> i <i>Cooperia</i> spp.	[160]

* EHT - test izleganja larvi; LDT - test razvoja larvi; LMIT - test inhibicije pokretljivosti larvi; AWMT - test inhibicije pokretljivosti adulta; LFIA – test inhibicije hranjenja larvi; LEA – test gubitka omotača larvi

Broj sprovedenih ispitivanja kao i broj testiranih etarskih ulja u *in vivo* ispitivanjima (Tabela 5) je značajno manji u poređenju sa *in vitro* ispitivanjima, s obzirom na zahtevnost i cenu ovakvih ispitivanja. U ovim istraživanjima su postignute različite efikasnosti u zavisnosti od korišćenog ulja i doze, a neka od ulja koja su istakla u dosadašnjim terenskim istraživanjima u testu redukcije broja jaja nematoda u fecesu (FECRT), nakon peroralne jednokratne primene, su: emulzija ulja narandže sa efikasnošću od 97,4% pri dozi 600 mg/kg (14. dana) [161], zatim *Eucalyptus citriodra* sa 69,5% pri dozi od 500 mg/kg (14. dana) [154] i *Mentha arvensis* sa 61,6% pri dozi 200 mg/kg (1. dana nakon tretmana) [138]. U kontrolisanom testu, takođe nakon peroralne primene, visoku efikasnost su pokazali *Cymbopogon citratus* pri dozi 500 mg/kg (uzastopna primena tokom 3 dana) sa efikasnošću od 66,4% protiv *H. contortus* (15. dana) [155] i *Lippia sidoides* sa 56,9% pri dozi 283 mg/kg tokom 5 dana (7. dana nakon tretmana), takođe protiv *H. contortus* [162]. U pojedinim slučajevima, ispitana je *in vivo* efikasnost izolovanih sastojaka etarskih ulja kao što je slučaj sa acetilovanim derivatima karvakrola i timola, koji su u dva odvojena istraživanja pri jednokratnoj peroralnoj dozi od 250 mg/kg, redukovali broj jaja nematoda u fecesu za 65,9% (karvarkol) i 76,2% (timol) 14. dana nakon tretmana [163,164].

Tabela 5. Etarska ulja koja su pokazala *in vivo* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca

Etarsko ulje	Test, vreme procene efikasnosti nakon tretmana i vrsta GIN	Doza, način i trajanje primene	Efikasnost	Izvor
<i>Lippia sidoides</i>	FECRT; Dani 0., 7., 14. i 21.; prirodno-mešana infekcija	230 mg/kg, peroralno, tokom 5 dana	Dan 7 - 38,0%; Dan 14 - 30,0%; Dan 21 - 29,8%	[162]
		283 mg/kg peroralno, tokom 5 dana	Dan 7 - 45,9%; Dan 14 - 54,0%; Dan 21 - 22,9%	
<i>Lippia sidoides</i>	Kontrolisani test; Dan 7.; <i>Haemonchus</i> spp. i <i>Trichostrongylus</i> spp.	283 mg/kg, peroralno, tokom 5 dana	<i>Haemonchus</i> spp. 56,9%	[162]
			<i>Trichostrongylus</i> spp. 39,3%	
Emulzija ulja narandže	FECRT; Dani 0. i 14.; <i>H. contortus</i>	600 mg/kg, jednokratno	97,4%	[161]
		600 mg/kg tokom 3 dana	94,9%	
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	FECRT; Dani 0., 1., 5., 10., 15. i 20; <i>H. contortus</i>	180 i 360 mg/kg tokom 3 dana	n.e.	[165]
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Kontrolisani test; Dan 20.; <i>H. contortus</i>	180 i 360 mg/kg tokom 3 dana	n.e.	[165]
<i>Eucalyptus citriodora</i>	FECRT; Dani 0., 10., 17.; <i>Haemonchus</i> spp., <i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Oesophagostomum</i> spp.	250 mg/kg	Dan 10 - 55,9%; Dan 17- 34,5%	[166]
<i>Thymus vulgaris</i>	FECRT; Dani 0., 2., 4., 6., 8., 10. i 12. <i>H. contortus</i>	75, 150 i 300 mg/kg peroralno; Dani 0., 6. i 12.	n.e.	[139]

<i>Mentha arvensis</i>	FECRT; Dani 0., 1., 3., 7., 14. i 21.; <i>H.</i> <i>contortus</i> i <i>Trichostrongylus</i> spp.	200 mg/kg, jednokratno	Dan 1 - 61,6%; Dan 14 - 48,1%; Dan 21 - 44,9%	[138]
<i>Cymbopogon citratus</i>	FECRT; Dani 0., 8. i 15.; <i>Haemonchus</i> spp, <i>Trichostrongylus</i> spp i <i>Oesophagostomum</i> spp.	500 mg/kg, peroralno, tokom 3 dana	Dan 8 - 19,6%; Dan 15 - 23,9%	[155]
<i>Cymbopogon citratus</i>	Kontrolisani test; Dan 15. <i>H. contortus</i> , <i>T.</i> <i>colubriformis</i> , <i>O.</i> <i>columbianum</i> , <i>T.</i> <i>ovis</i>	500 mg/kg, peroralno, tokom 3 dana	<i>H. contortus</i> 66,4% <i>T. colubriformis</i> 38,4%	[155]
<i>Eucalyptus citriodora</i>	FECRT, Dani 0., 7. i 14. <i>Haemonchus</i> spp. <i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Oesophagostomum</i> spp. i <i>Strongyloides</i> spp.	500 mg/kg, peroralno, jednokratno	Dan 7 - 41,8%; Dan 14 - 69,5%	[154]

* FECRT - test redukcije broja jaja nematoda u fecesu; n.e. - nema efikasnosti

2.4.4. Biološke osobine odabranih etarskih ulja

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) (Slika 3) predstavlja cvetnu biljku iz porodice Lamiaceae, poreklom iz južne Evrope (Mediteran). To je zimzelena žbun sa sitnim, jako aromatičnim, sivo-zelenim listovima i sa ljubičastim ili ružičastim grozdovima cveća. Ova biljka se vekovima koristila u narodnoj medicini zbog svog značajnog antimikrobnog i antiinflamatornog dejstva, a često se koristi i u kulinarstvu kao začim. Pored navedenih, ulje ove biljke poseduje i antioksidativna i mnogobrojna druga dejstva [167]. Takođe, za etarsko ulje ove biljke je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [139].



Slika 3. Timijan (Izvor: agroklub.rs)

Hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.) je aromatična, višegodišnja, tamnozeleno biljka iz porodice Asteraceae, veoma popularna u narodnoj medicini mnogih evropskih kultura. Visoka je 30-50 cm, ima obilno lišće i dugačko ružičasto ili belo cveće, a raste samoniklo duž autoputeva, na poljima i pašnjacima. Koristi se u farmaceutskoj industriji za proizvodnju biljnih lekova (najčešće stablo, list i cvet), a pored toga i u kozmetičkoj industriji, proizvodnji likera i aroma, kao ukrasna biljka i drugo. Etarsko ulje ove biljke pokazuje mnogobrojne efekte uključujući antibakterijski, antigljivični, insekticidni, analgetički i antipiretički efekat [168]. Za ekstrakt ove biljke je dokazan *in vitro* i *in vivo* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [169].

Rtanjski čaj ili planinski čubar (*Satureja montana* L.) (Slika 4) je višegodišnja mala biljka koja potiče iz toplih, sušnih, sunčanih i kamenitih planinskih krajeva u Mediteranskom području južne Evrope i severne Afrike. Među pripadnicima porodice Lamiaceae, smatra se jednom od medicinski najznačajnijih biljaka, a pored toga se koristi i u kulinarstvu pri čemu njen



Slika 4. Rtanjski čaj
(Izvor: caherhurleynursery.com)

antibakterijski efekat dolazi do izražaja pri pripremanju i pakovanju hranidbenih namirnica [170]. Etarsko ulje ove biljke pored antibakterijskog poseduje širok spektar farmakoloških efekata poput antiseptičnog, antioksidativnog, antifungalnog, antiinflamatornog, antikancerogenog, karminativnog, kao i različitih digestivih svojstava [170,171].

Čubar (*Satureja hortensis* L.) predstavlja jednogodišnjeg zeljastog predstavnika porodice Lamiaceae, sa jako razgranatim linearnim listovima i ljubičasto do ljubičasto-belim cvetovima. Kao aromatična biljka, autohtona za područje južne Evrope i Mediterana (danas je rasprostranjena na obe hemisfere), tradicionalno se koristi u kulinarske svrhe i kao lekovita biljka. Etarsko ulje ove biljke pokazuje antioksidativni, antimikrobni, antiparazitski, pesticidni, antiinflamatorni, analgetski, hepatoprotektivni i antikancerogeni efekat [172], a za ekstrakt ove biljke je dokazan i *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [173,174].

Pitoma nana (*Mentha x piperita* L.) (Slika 5) predstavlja hibridnu biljku iz porodice Lamiaceae nastalu ukrštanjem divlje (*M. spicata* L.) i barske (*M. aquatic* L.) nane. Iako izvorno potiče iz Mediteranskog područja, danas se kultivira širom sveta za različite namene, pre svega u industriji hrane (ukusi, mirisi), za pravljenje čajeva, konditorskih proizvoda, ali i u farmaceutskoj industriji za proizvodnju

lekova. Etarsko ulje ove biljke je jedno od najčešće korišćenih za različite namene [175], a kada su u pitanju njegova medicinska dejstva dokazani su antibakterijski, antigljivični, antiparazitski efekat [176] kao i antipruritski, astringentni, rubefacientni i



Slika 5. Pitoma nana (Izvor: ikarianature.com)

antiseptični efekat [175]. Za ovo ulje je dokazan i *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [136,138].

Morač ili komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja biljka koja pripada porodici šargarepa Apiaceae, a pretežno je poreklom iz južne Evrope i male Azije. To je lekovita biljka sa žutim cvetovima, aromatičnim semenom i belim plodom koje se široko koristi kao agens za ukus u hrani i piću zbog svoje karakteristične arome. Koristi se u tradicionalnoj medicini dugo vremena zbog svog blagotvornog antioksidativnog, antiinflamatornog i analgetičkog efekta, a samo etarsko ulje pored navedenih poseduje i hepatoprotektivno, antidijabetsko, antibakterijsko, antigljivično i antiinsekticidno dejstvo [177].

Smilje (*Helichrysum arenarium*) je višegodišnja biljka iz familije Asteraceae, visine 50 cm, koja raste na suvim, peskovitim i polupustinjskim zemljištima, dinama i stepama velikog geografskog područja u Africi, Evropi i Aziji, pri čemu se smatra da je poreklom iz Južne Afrike. Ova vrsta ima sivkaste listove, sa stabljikama koje su prekrivene belim trihomima i bojom cveta koja varira od žute do narandžaste. U dosadašnjim studijama su dokazana brojna biološka dejstva ove biljke, dok je za njeno etarsko ulje dokazan antioksidativni i antimikrobni efekat [178].

Origano (*Origanum vulgare*) (Slika 6) predstavlja cvetnu biljku iz familije Lamiaceae, poreklom iz zapadne i jugozapadne Euroazije i Mediterana. To je višegodišnja biljka koja raste 20 do 80 cm u visinu, sa naizmeničnim listovima 1-4 cm. Cvetovi su ljubičasti, dugački u uspravnim klasovima. Etarsko ulje origana je takođe jedno od najčešće korišćenih ulja, sa primenom u medicini, poljoprivredi, kozmetici, u industriji aroma a može da se koristi i kao dezinfekciono sredstvo za hranu [179]. Posедуje antibakterijski, antigljivični, antivirusni, antioksidativni, antiinflamatorni, antiproliferativni, citotoksični efekat, itd. [180]. Za ovo ulje je potvrđen *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [160].



Slika 6. Origano (Izvor: aucklandbotanicgardens.co.nz)

Kleka (*Juniperus communis* L.) predstavlja zimzeleni žbun ili drvo iz porodice Cupressaceae koje raste u šumskim oblastima Azije, Evrope, severne Afrike i Severne Amerike. Zbog svog diuretičkog, antiseptičkog, kao i gastrointestinalnih svojstava, ova biljka je vekovima poznata kao lekovita. Etarsko ulje kleke je prirodni proizvod koji se koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, kao i u parfimerijama i kozmetici, a određena alkoholna pića poput džina se prave destilacijom od fermentisanih bobica kleke. Dokazana su različita medicinska svojstva ulja kleke poput antikancerogenog i antiviralnog [181], ali i antioksidativnog, antibakterijskog, antigljivičnog, antimalarijskog i antihiperholesterolemijskog efekta [182].

Slatka narandža (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck) je zimzeleno cvetajuće drvo iz porodice Rutaceae poreklom iz Azije a danas rasprostranjeno širom Pacifika i toplijih područja sveta. Visine je čak 9-10 m sa velikim bodljama na granama. Listovi su naizmjenični sa usko-krilatim peteljka a cvetovi su pazušni, pojedinačni ili u kolotovima. Ima široku primenu u industriji hrane i medicini, s obzirom da plodovi predstavljaju značajan izvor C vitamina, koji je prirodni antioksidant značajan za imuni sistem [183]. Pored antioksidativnog, etarsko ulje ove biljke poseduje i antibakterijski, antigljivični, larvicidni, insekticidni, antikancerogeni, relaksantni i anksiolitički efekat [184]. Za ovo ulje je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [151].

Limun (*Citrus medica* L.) predstavlja žbun ili malo drvo iz porodice Rutaceae. Listovi su mu dugi 7,5-15 cm, eliptično-jajolikog do jajoliko-lancetastog oblika. Cvetova ima 5-10 u grozdu, malih ili srednjih, sa manje ili više ružičastim laticama, a plod je loptast ili duguljast i takođe predstavlja bogat izvor C, ali i drugih vitamina [185]. Ima primenu u industriji hrane i lekova, a za ulje ove biljke je dokazan antioksidativni i antimikrobni efekat [186].

Divlja nana (*Mentha spicata* L.) je kultivisana, višegodišnja rizomatozna biljka iz porodice Lamiaceae i jedna od biljaka koje se najčešće komercijalno uzgajaju širom sveta. Sveži i osušeni listovi se koriste kao čajevi, začini i za aromatizaciju hrane i pica, dok se etarsko ulje i ekstrakt dugo koriste za tretman različitih oboljenja [187]. Kao i ostali pripadnici roda *Mentha*, pretežno je karakteristična za region Južne Afrike, Australije i regione sa umerenom klimom na području Evrope i Azije. Za ulje ove biljke su, između ostalih, dokazani antibakterijski, antigljivični i fumigantni (insekticidni) efekat [176].

Korijander (*Coriandrum sativum* L.) - je aromatična zeljasta jednogodišnja biljka iz familije Umbelliferae/Apiaceae. Ova biljka ima dugu istoriju upotrebe u kulinarstvu, s obzirom da njena aromatična jedinjenja i etarsko ulje poseduju antibakterijsko, antifungalno i antioksidativno dejstvo, pa su korisna u pripremi hrane (kao aroma i pomoćno sredstvo) u konzervisanju i sprečavanju bolesti koje se prenose putem hrane. Etarsko ulje koje se pretežno nalazi u listu, stablu, cvetu, plodu i semenu ove biljke se zbog navedenih svojstava koristi i u medicinske svrhe [188]. Za ovo ulje je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [147,157].

Miloduh ili izop (*Hyssopus officinalis* L.) predstavlja biljku iz roda *Hyssopus* (fam. Lamiaceae), koji podrazumeva zeljaste ili poludrvenaste biljke rasprostranjene od istočnog Mediterana do centralne Azije i Mongolije. Ova biljka je povezana sa nekoliko medicinskih upotreba, posebno biološko aktivni sastojci etarskog ulja, s obzirom da poseduju antibakterijski, antigljivični, antivirusni, antioksidativni, antikancerogeni, larvicidni o miorelaksantni efekat. Pri tome se etarsko ulje generalno smatra bezbednim, ukoliko se koristi u ograničenim i preporučenim dozama. Pored toga, ulje se koristi i za aromatiziranje i konzerviranje hrane [189]. Za ekstrakt ove biljke je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [190].

Žalfija (*Salvia officinalis* L.) pripada rodu *Salvia* koji predstavlja najveći rod u familiji Lamiaceae sa preko 900 vrsta. Žalfija je aromatična višegodišnja biljka karakteristična za Mediteransko područje, sa cvećem u različitim bojama. Tradicionalno se koristi u pripremanju hrane, za pravljenje čajeva i kao aroma u parfimeriji i kozmetici, ali i u narodnoj medicini s obzirom da poseduje antikancerogena i anti-dijabetična svojstva. Etarsko ulje ove biljke poseduje antibakterijski, antigljivični, insekticidni, antioksidativni efekat [191,192].

Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) je zimzelena višegodišnja biljka iz familije Lamiaceae poreklom sa Mediteranskog područja, ali se uzgaja i u mnogim drugim delovima sveta. Naraste do visine 40-60 cm pri čemu je donji deo stabljike drvenast, a gornji zelen. Cvetovi su uglavnom bledoljubičaste boje. Široko se koristi u kozmetici, u parfimerijama, industriji hrane ali poseduje i brojna medicinska svojstva. Za etarsko ulje ove biljke je dokazan antibakterijski, antigljivični, antioksidativni, antiinflamatorni, antianksiozni, anksiolitički, antispazmotični, antiholesterolemijski, antihipertenzivni efekat [193]. Za ovo ulje je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [153].

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je poreklom iz Azije i Afrike i predstavlja autogamnu, aromatičnu, jednogodišnju ili višegodišnju zeljastu biljku visine oko pola metra. Tokom celog leta poseduje velike zelene listove dužine oko 5 cm, dok se cvetovi obično uklanjaju kako bi se povećao prinos listova. Pored široke upotrebe u narodnoj medicini, biljka je popularna i kao ukrasna, a koristi se i za mnoge druge namene. Etarsko ulje ove biljke ima antibakterijski, antigljivični, antivirusni, antioksidativni, antiinflamatorni, analgetski, sedativni, hipnotični, antikonvulzivni, antiprotozoalni i antikancerogeni efekat [194]. Za ovo ulje je dokazan *in vitro* efekat protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca [159].

3.0. CILJEVI, ZADACI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Na osnovu pregleda literature, a nakon definisanja predmeta istraživanja, postavljeni su sledeći ciljevi:

- Ispitati antihelmintičku aktivnost odabranih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca i sigurnost njihove primene;
- Odrediti faktore koji utiču na antihelmintičku aktivnost ulja;
- Ispitati mogućnost primene ispitivanih formulacija u veterinarskoj praksi kao alternativne metode u borbi protiv antihelmintičke rezistencije.

Da bi se realizovali postojeći ciljevi istraživanja, određeni su sledeći zadaci:

- Odrediti hemijski sastav ispitivanih etarskih ulja pomoću gasne hromatografije i masene spektrometrije (eng. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS);
- Odrediti rodove gastrointestinalnih nematoda prisutnih na ispitivanim farmama i njihovu procentualnu zastupljenost pomoću odgovarajućih ključeva determinacije;
- Ispitati *in vitro* antihelmintički potencijal ispitivanih ulja pomoću testa izleganja jaja (eng. *egg hatch test*, EHT);
- Ispitati *in vivo* antihelmintički potencijal odabranih ulja pomoću testa redukcije broja jaja u fecesu (eng. *faecal egg count reduction test*, FECRT);
- Ispitati eventualno prisustvo toksičnih i neželjenih efekata *in vivo* primenjenih formulacija putem kliničkog posmatranja tretiranih životinja, kao i putem određivanja njihovog uticaja na hematološke i biohemijske parametre krvi;
- Obraditi i analizirati dobijene rezultate putem odgovarajućih statističkih metoda.

Za definisana istraživanja antihelmintičke efikasnosti odabranih etarskih ulja, postavljene su sledeće hipoteze istraživanja:

- Odabrana etarska ulja pokazuju antihelmintičku aktivnost protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca, pri čemu su bezbedna za životinje pri testiranim dozama;

- Aktivnost ulja protiv nematoda varira u zavisnosti od ispitivanog ulja, a samim tim i od nekih drugih faktora (npr. njegovog hemijskog sastava i prisustva pojedinih jedinjenja), kao i od primenjene koncentracije (test izleganja jaja), odnosno doze (test redukcije broja jaja u fecesu);
- Neka od ispitanih etarskih ulja imaju potencijal da se kao alternativa koriste u veterinarskoj praksi u cilju smanjenja upotrebe komercijalnih preparata i borbe protiv antihelmintičke rezistencije.

4.0. MATERIJAL I METODE

4.1. Etarska ulja i analize njihovog hemijskog sastava

Istraživanja su sprovedena u dve faze, pri čemu je prvo istraživanje izvedeno tokom 2019., a drugo tokom 2021. godine. U prvom istraživanju su korišćena sledeća etarska ulja: timijan (*Thymus vulgaris* L.) poreklom od dva proizvođača (Alekharm, Beograd, Srbija kao i Albert Vieille Sas, Vallauris, Francuska); dva hemotipa hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.), od kojih je jedan slobodan od azulena, sa planine Radan (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija) dok je drugi proazulenski tip, sa planine Golije (BIOSS, Srbija); rtanjski čaj odnosno planinski čubar (*Satureja montana* L., Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija); čubar (*Satureja hortensis* L., Bio Salas Farago, Orom, Srbija); pitoma nana odnosno pepermint (*Mentha x piperita*



Slika 7. Neka od etarskih ulja korišćenih u istraživanjima - some of the essential oils used in the studies (Foto orig)

L., BIOSS, Srbija); morač (*Foeniculum vulgare* Mill., BIOSS, Srbija), smilje (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench, BIOSS, Srbija), origano (*Origanum vulgare* L., Hippocratic Essentials P.C., Neo Perivoli, Greece), kleka (*Juniperus communis* L., BIOSS, Srbija), kao i binarna kombinacija dva jedinjenja, linaloola i estragola u odnosu 0,14:0,86, izolovana iz jednog od hemotipova bosiljka (*Ocimum basilicum* L., Alekharm, Beograd, Srbija).

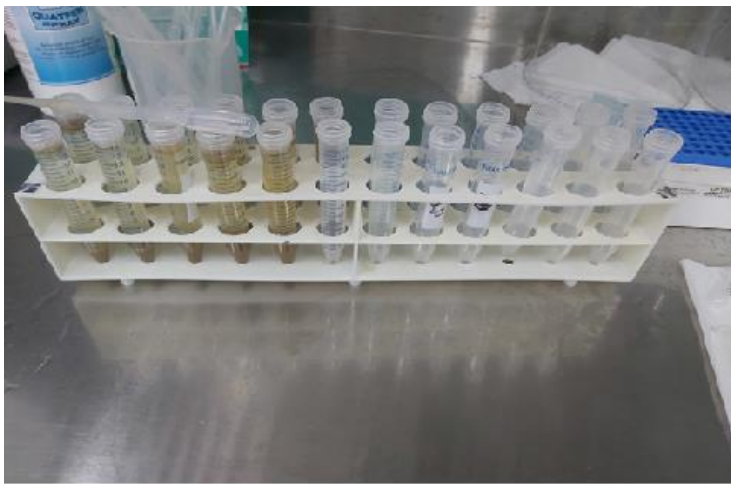
U drugom istraživanju (Slika 7), korišćena su sledeća etarska ulja: slatka narandža (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck, BIOSS, Srbija), limun (*Citrus medica* L., BIOSS, Srbija), uzorak pitome nane od drugog proizvođača u poređenju sa prvim istraživanjem (*Mentha x piperita* L., Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Srbija), divlja nana (*Mentha spicata* L., Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Srbija,); korijander (*Coriander sativum* L., Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Srbija), miloduh (*Hyssopus officinalis* L., BIOSS, Srbija,), žalfija (*Salvia officinalis* L., BIOSS, Srbija), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill., Institut za ratarstvo i

povrtnarstvo Novi Sad, Srbija), bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), kao i ponovo etarska ulja origana i rtanjskog čaja od istog proizvođača kao i u prethodnom istraživanju.

Kvalitativna i semikvantitativna hemijska karakterizacija etarskih ulja izvršena je primenom gasne hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom (GC-MS) na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija. U Agilent Technologies series 6890 gasni hromatograf injektovan je 1 μ L rastvora ispitivanog ulja (10 μ L/mL u heksanu) u split modu, uz split odnos 1:10, pri temperaturi od 250°C. Komponente su razdvojene na nepolarnoj poli (tetrametil-1,4-silfenilensiloksanskoj) koloni HP- 5 ms (Agilent Technologies) dimenzija 30m \times 0,25mm, debljina sloja 0,25 μ m. Kolona je eluirana u temperaturno-programiranom režimu, uz startnu temperaturu od 50°C, rampu 8°C/min do 120°C, 15°C/min do 230°C, 20°C/min do 270°C/min, i zadržavanje na finalnoj temperaturi od 16,92 min (ukupno vreme analize 35 min). Kao gas nosač korišćen je helijum visoke čistoće (5.0) u režimu konstantnog protoka od 1,0 mL/min. Efluent je preko transfer-linije održavane na 280°C prosleđen u Agilent Technologies series 5975 maseni spektrometar sa elektronskom jonizacijom. Parametri masenog spektrometra bili su: energija elektrona 70eV, temperatura jonskog izvora 230°C, temperatura kvadrupola 150°C. Primenjen je scan mod akvizicije, u m/z opsegu 35-400, i uz solvent delay od 2,30 min. U cilju postizanja boljeg slaganja između eksperimentalnih i bibliotečkih spektara, korišćen je standard spectra tune. Podaci su obrađeni pomoću Agilent Technologies MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa AMDIS (ver. 2.64) i NIST MS Search softverom (ver. 2.0d). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara koeluirajućih jedinjenja, a NIST MS Search je obezbedio algoritam za bibliotečku pretragu komplemenaran PBM algoritmu ChemStation-a. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7 th Edition i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05. Identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem linearnih retencionih indeksa sa literaturnim podacima. Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC.

4.2. Test izleganja larvi

In vitro, kao i sva ostala ispitivanja, su sprovedena u južnoj Italiji, oblast Kampanja, u regionalnom centru za praćenje parazitoza KREMOPAR (Eboli, Salerno), pri čemu su za izolaciju jaja nematoda korišćeni uzorci fecesa ovaca sa dve odvojene farme u ovom regionu. Za procenu antihelmintičkog potencijala odabranih etarskih ulja je u oba istraživanja korišćen test izleganja larvi (eng. *egg hatch test*), koji je jedan od najčešće korišćenih testova, kako za detekciju antihelmintičke rezistencije, tako i za laboratorijsko ispitivanje efikasnosti novih antihelmintičkih supstanci. Ovim testom se meri ovoidni efekat neke aktivne supstance, odnosno procenat inhibicije izleganja larvi iz jaja parazita pod uticajem različitih koncentracija ispitivane supstance.



Slika 8. Izolacija jaja nematoda za test izleganja larvi - *isolation of nematode eggs for the egg hatch test* (Foto orig)

Za ovo ispitivanje uzorci fecesa su uzimani direktno iz ampule rektuma od ovaca prirodno inficiranih gastrointestinalnim nematodama. Broj uzetih uzoraka je pri tome iznosio 30 po farmi u cilju pravljenja grupnog uzorka za izolaciju jaja nematoda, koja su izolovana u roku od 2 sata nakon uzimanja uzoraka pomoću tzv. metode oporavka (eng. *recovery method*) modifikovane po Bosco i sar. (2018) [39]. Prvo, uzorci fecesa su homogenizovani i filtrirani pod tekućom vodom kroz sita sa otvorima različitih veličina (1 mm, 250 μ m, 212 μ m i 38 μ m), u cilju izolacije jaja od fecesa. Jaja nematoda zadržana na situ najmanje veličine su potom isprana sa destilovanom vodom u epruvete (Slika 8) i centrifugovana na 1500 obrtaja, nakon čega je talog otklonjen. Potom je izvršeno centrifugiranje korišćenjem 40% rastvora šećera kako bi jaja isplivala na površinu, i koja su potom izolovana u nove epruvete u koje je dodata destilovana voda. Na kraju, dobijeni rastvori su centrifugovani još nekoliko puta kako bi se otklonile pelete i dobio vodeni rastvor sa jajima.

Kao što je prethodno navedeno, u prvom istraživanju je korišćeno 11 uzoraka etarskih ulja i jedna binarna kombinacija. Pri tome, test izleganja larvi je sproveden za 6 različitih koncentracija (50; 12,5; 3,125; 0,781; 0,195 i 0,049 mg/ml, Slika 9) svakog ulja (Ferrerira i sar., 2018 sa određenim modifikacijama) [153]. Za ovaj test su se koristile ploče sa bunarčićima (24/ploča), gde su u bunarčićima pravljene rastvori određene koncentracije ulja emulgovane u 3% Tweenu 80, v/v, i potom dopunjavane sa vodenim rastvorom sa jajima (oko 150/bunarčić) i destilovanom vodom do ukupne količine od 0,5 ml po bunarčiću. Potrebna količina ulja za



Slika 9. Priprema etarskih ulja za *in vitro* ispitivanje - *preparation of essential oils for in vitro testing* (Foto orig)

svaku od koncentracija je određivana računski i dodavana u bunarčiće pomoću različito osetljivih mikropipeta. Sve koncentracije kod svakog ispitanog ulja su pri tome ispitane ukupno 4 puta (2 ponavljanja sa uzorcima dobijenim sa 2 različite farme). Kao pozitivna kontrola je korišćen tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL, a kao negativna 3% Tween 80, v/v, koji su takođe ispitani u 4 ponavljanja. Nakon pravljena rastvora, ploče sa bunarčićima (Slika 10) su ostavljeni za inkubaciju na 27°C tokom 48h. Nakon toga, dodate su 1-2 kapi lugolovog rastvora u svaki

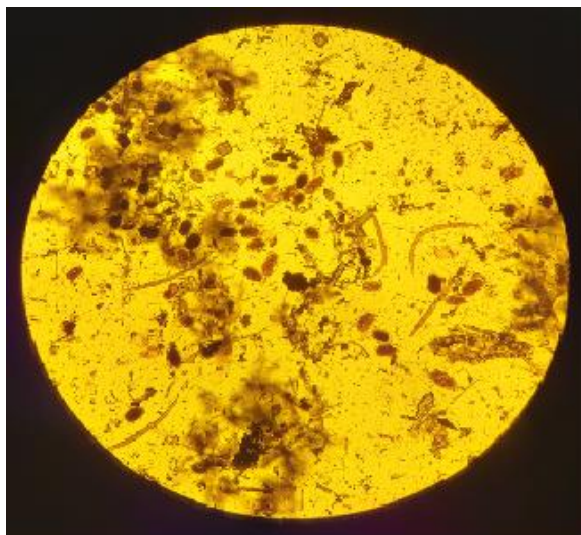


Slika 10. Pripremljene opadajuće koncentracije etarskih ulja spremne za inkubaciju - *prepared decreased concentrations of essential oils ready for the incubation* (Foto orig)

bunarčić kako bi se zaustavilo izleganje larvi, a napravljeni rastvori su posmatrani pod mikroskopom u cilju brojanja jaja i izleglih larvi pri svakoj koncentraciji za svako ulje i kontrole (Slika 11). Procenat inhibicije izleganja larvi pod uticajem primenjenih etarskih ulja se potom računao putem sledeće formule:

$$IH = \frac{\text{broj jaja}}{\text{broj jaja} + \text{broj larvi}} \times 100\% \quad [35][195]$$

U drugom istraživanju, gde je ispitano takođe 11 uzoraka etarskih ulja, napravljene su određene izmene u postavci eksperimenta sa ciljem dobijanja još veće preciznosti i rezultata pogodnih za računanje određenih farmakoloških parametara. Naime, umesto 6, korišćeno je ukupno 8 koncentracija primenjenih formulacija (dodate još 0,025 i 0,0125 mg/ml), a opadajuće koncentracije etarskih ulja su umesto računskim putem i mikropipetama dobijane metodom razblaživanja emulgovanih ulja u destilovanoj vodi. Uz pomenute kontrole iz prethodnog istraživanja, dodate su još jedna pozitivna (tiabendazol, 0,0125 mg/ml) i jedna negativna (destilovana voda) kontrola. Inhibicija izleganja larvi je pri tome računata na isti način, ovoga puta u ukupno tri ponavljanja za svaku koncentraciju svih ispitivanih ulja i kontrola.



Slika 11. Posmatranje i brojanje jaja i larvi nematoda pod mikroskopom - *observation and counting of eggs and larvae under the microscope* (Foto orig)

4.3. Test redukcije broja jaja nematoda u fecesu

Ispitivanje antihelmintičke efikasnosti etarskih ulja u terenskim uslovima je sprovedeno uz pomoć testa redukcije broja jaja nematoda u fecesu (eng. *faecal egg count reduction test*, FECRT), najčešće korišćenje i preporučene *in vivo* metode za detekciju rezistencije i ispitivanje novih antihelmintičkih sredstava. Ovom metodom se meri procenat redukcije broja izbrojanih jaja parazita u fecesu životinja nakon primene odgovarajuće aktivne supstance. Istraživanje je

takođe sprovedeno u dve faze, a u obe su korišćene ovce prirodno zaražene gastrointestinalnim nematodama sa dve različite farme (slobodan i vezan način držanja ovaca, Slike 12 i 13). Pri tome je za potvrdu infekcije i kvantifikaciju broja jaja nematoda u fecesu korišćena najsavremenija tehnika mini-FLOTAC (Slika 15) [65].



Slika 12. Ovece korišćene za drugo istraživanje (farma 1), slobodan način držanja - sheep used for the second study (farm 1) (Foto orig)



Slika 13. Ovece korišćene za drugo istraživanje (farma 2), vezani način držanja - sheep used for the second study (farm 2) (Foto orig)



Slika 14. Pripremljene formulacije etarskih ulja razblaženih u suncokretovom ulju za drugo *in vivo* istraživanje - prepared formulations of essential oils diluted in sunflower oil for second *in vivo* study (Foto orig)

gramu fecesa (EPG), životinje su na obe farme podeljene u ukupno četiri grupe ($n=12$ /grupa, 48/farma; ukupno 96) i obeležene pomoću markica. Životinje su bile pretežno ženskog pola, različitih starosti, prosečne telesne mase 45 kg. Ovece iz formiranih grupa su bile tretirane peroralno na sledeći način: G_1 : 100 mg/kg etarskog ulja timijana; G_2 : 100 mg/kg kombinacije

U prvom istraživanju, ispitana je efikasnost etarskog ulja timijana (tip 1) i binarne kombinacije jedinjenja linaloola i estragola (14:86), peroralno primenjenih. S obzirom da su etarska ulja generalno visoko koncentrovana i jaka, primenjene formulacije su razblažene u suncokretovom ulju u odnosu 1:9, radi zaštite sluzokože digestivnog trakta ovaca. Nakon inicijalne potvrde infekcije i kvantifikacije zaraženosti u vidu brojanja jaja nematoda u fecesu i izražavanja vrednosti u vidu broja jaja po

linalool:estragol; G₃: fenbendazol u dozi preporučenoj od strane proizvođača (pozitivna kontrola), G₄: 50 ml suncokretovog ulja po životinji (negativna kontrola). Uzorci od tretiranih životinja su ponovo uzimani 7. i 14. dana nakon tretmana, prilikom čega se efekat primenjenih formulacija u vidu redukcije broja jaja u fecesu računao pomoću sledeće formule:

$$\text{FECRT (\%)} = (1 - (T_2/T_1)/(C_1/C_2)) \times 100 \text{ [196], gde je}$$

T₁ - EPG u grupi pre tretmana ; T₂- EPG u grupi posle tretmana ; C₁ - EPG u kontrolnoj grupi (K-) pre tretmana ; C₂- EPG u kontrolnoj grupi (K-) posle tretmana



Slika 15. Napravljeni fekalni razmazi uz pomoć mini-FLOTAC tehnike za brojanje jaja nematoda pod mikroskopom - *preparation of faecal smears using mini-FLOTAC technique for egg counting under the microscope* (Foto orig)

Ovom formulom se efikasnost primenjenih ulja računala na nivou stada, što je precizniji način. FECRT se takođe računao i individualno za svaku životinju, da bi se potom računalo prosečno individualno smanjenje broja jaja u svakoj tretiranoj grupi. Drugo istraživanje je sprovedeno na sličan način sa određenim izmenama u cilju postizanja još veće efikasnosti i preciznosti: korišćene su životinje sa većim stepenom zaraženosti, a koje su na obe farme podeljene u pet grupa (n=12/grupa, 60/farma; ukupno

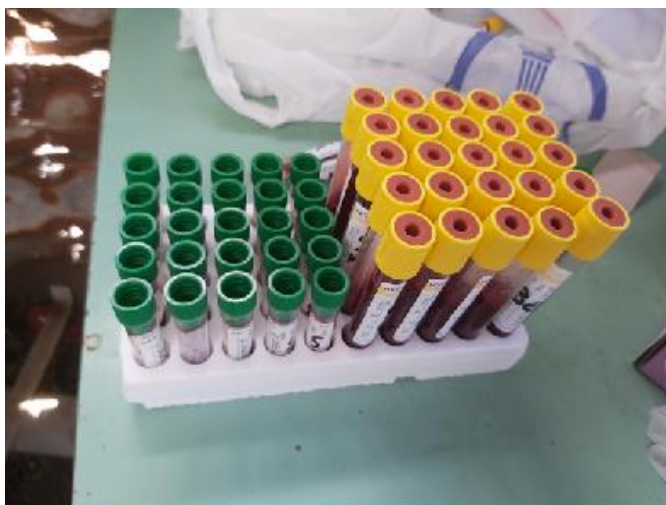
120) na sledeći način: G₁: 150 mg/kg etarsko ulje origana; G₂: 150 mg/kg pitome nane; G₃: 150 mg/kg rtanjskog čaja; G₄: albendazol u dozi preporučenoj od strane proizvođača (pozitivna kontrola); G₅: 50 ml suncokretovog ulja po životinji (negativna kontrola). Ovce su takođe bile tretirane peroralno, međutim ovoga puta uz pomoć tube koja je omogućila aplikovanje navedenih formulacija direktno u burag. To je omogućilo izbegavanje interakcije aktivnih sastojaka etarskih ulja sa različitim materijama u gornjim partijama digestivnog trakta, ali i zaštitu sluzokože ovih delova, s obzirom da je korišćena veća koncentracija etarskih ulja koja su takođe bila razblažena u suncokretovom ulju, ali u odnosu 1:4,5 (Slika 14). Efekat odnosno stepen redukcije broja jaja nematoda (Slika 16) pod uticajem primenjenih formulacija se takođe merio 7. i 14. dana nakon tretmana, uz pomoć prethodno navedene formule.



Slika 16. Posmatranje i brojanje jaja nematoda na ekranu povezanim sa mikroskopom - *observation and counting of nematode eggs on a screen connected to the microscope* (Foto orig)

4.4. Studije toksičnosti

U cilju ispitivanja prisustva eventualnih neželjenih i toksičnih efekata primenjenih biljnih formulacija, u oba istraživanja je vršen klinički pregled svih tretiranih životinja pre, neposredno nakon, kao i 7. i 14. dana nakon tretmana. Posebna pažnja se pri tome obraćala na opšti status životinja, ponašanje, hidriranost kao i na uzimanje hrane i defekaciju. Dodatno, u drugom istraživanju su pre, kao i 14. dana nakon tretmana uzimani i uzorci krvi tretiranih životinja ($n=6$ /grupa na svakoj farmi), u cilju sprovođenja hematoloških i biohemijskih analiza (Slika 17), pa su na taj način mereni efekti ulja dve nedelje nakon tretmana. Krv za hematološke analize je uzimana iz jugularne vene u vakumske epruvete koje su sadržavale EDTA(etilendiamintetrasirćetna kiselina), pri čemu su analize sprovedene u kratkim vremenskim intervalima nakon uzimanja



Slika 17. Uzorci krvi uzeti od tretiranih ovaca za hematološke i biohemijske analize - *blood samples taken from treated sheep for haematological and biochemical analyses* (Foto orig)

krvi (2-4h). Za biohemijske analize, krv je uzimana u vakumske epruvete bez koagulanata, a analize su sprovedene naknadno. U okviru hematoloških parametara, praćen je broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, parametri MCH i MCHC, kao i leukocitarna formula. Cilj ovih analiza je sa jedne strane bio otkrivanje anemije kod ispitivanih životinja usled prisustva nematoda koje sisaju krv i njene eventualne redukcije pod uticajem primenjenih ulja i albendazola, a sa druge strane njihov efekat na parametre krvi i otkrivanje eventualnih toksičnih efekata. Kod biohemijskih analiza, praćeni su aktivnost jetrinih enzima poput aspartat aminotransferaze (AST) i gama-glutamil transferaze (GGT), kao i koncentracija ureje i kreatinina pre i posle tretmana radi otkrivanja prisustva eventualnih toksičnih efekata primenjenih ulja na funkciju jetre odnosno bubrega.

4.5. Koprokultura



Slika 18. Grupni uzorci fecesa napravljeni iz pojedinačnih grupa pripremljeni za koprokulturu (prvo istraživanje) - *a pooled faecal samples made from individual groups prepared for the coproculture (first study)* (Foto orig)

Koprokultura uzoraka fecesa (Slika 18) je sprovedena u prvom istraživanju, kao i u grupi ovaca tretiranim uljem origana i negativnom kontrolom u drugom istraživanju. Cilj je bio utvrđivanje prisutnih rodova gastrointestinalnih nematoda i njihove procentualne zastupljenosti na testiranim farmama, ali i praćenje promena u njihovoj zastupljenosti nakon određenih tretmana, pri čemu su iste farme korišćene u oba istraživanja. Uzorci sa ispitivanih farmi (n=2) su uzimani u tri

vremenska intervala, odnosno pre tretmana, kao i 7. i 14. dana posle tretmana. Pri tome, za svaku koprokulturu su uzimani uzorci od nekoliko desetina individualnih životinja (n=30), kako bi se napravio grupni uzorak u plastičnoj kutiji prekrivenoj celofanskom vrećicom sa rupicama. Dobijeni uzorak se potom inkubirao 10 dana na 24-27°C. Nakon toga je vrećica uklanjana a u kutiju dodavana topla voda, da bi potom usledila inkubacija na sobnoj temperaturi tokom 4 sata. Sledeći korak su bile dve filtracije koristeći sita sa velikim i malim rupicama kako bi se uklonio

talog i dobila suspenzija sa L₃ larvama nematoda. Ova suspenzija je potom ostavljena u Bermanov aparat i ostavljena da se inkubira tokom 24h na sobnoj temperaturi da bi, nakon centrifugiranja i otklanjanja taloga, larve bile posmatrane pod mikroskopom. Rodovi gastrointestinalnih nematoda su pri tome određivani pomoću ključa determinacije predloženim od strane van Wyk & Mayhew (2013) [34], koji se zasniva na specifičnostima u morfologiji posmatranih L₃ stadijuma larvi.

4.6. Statistička analiza

Test izleganja larvi - u *in vitro* testu poreden je ovicidni efekat različitih koncentracija u okviru istog ulja međusobno, kao i sa kontrolama uz pomoć jednofaktorijalne analize varijanse i post hoc Takijevog testa ($p < 0,05$). Za poredenje efekata istih koncentracija ali različitih etarskih ulja, korišćena je dvofaktorijalna analiza varijanse sa post hoc Takijevim testom ($p < 0,05$). Nelinearna regresija/logaritamska distribucija je korišćena za određivanje farmakoloških parametara poput koncentracije koja inhibiše 50% jaja (IC₅₀) i dozno-zavisnog efekta (R²).

Test redukcije broja jaja nematoda u fecesu - kod *in vivo* testa, rezultati odnosno dobijene prosečne vrednosti EPG na nivou grupe su poredene za različite dane u okviru istog tretmana, kao i za isti dan ali za različite tretmane. Pri tome korišćena metoda je bila dvofaktorijalna analiza varijanse sa post hoc Takijevim testom ($p < 0,05$), dok je za poredenje rezultata dobijenih sa dve različite farme korišćen post hoc Sidakov test ($p < 0,05$).

Studije toksičnosti - kod obrade rezultata hematoloških i biohemijskih analiza krvi korišćena je dvofaktorijalna analiza varijanse, koja je rađena posebno za svaki ispitivani parametar. Pri tome je za poredenje vrednosti u istoj grupi pre i 14. dana nakon tretmana korišćen post hoc Sidakov test ($p < 0,05$) dok je za poredenje vrednosti dobijenih za različite grupe u istom vremenskom intervalu korišćen post hoc Takijev test ($p < 0,05$).

Koprokultura - obrada ovih rezultata je vršena korišćenjem dvofaktorijalne analize varijanse sa post hoc Takijevim testom ($p < 0,05$). Poredene su promene u procentima rodova u različitim danima nakon tretmana u odnosu na period pre tretmana, kao i razlike u ovim promenama između pojedinih grupa. Urađeno je i nekoliko manjih analiza koje su uključivale poredenje promena za svaki rod, svaku grupu i svaki dan posebno.

5.0. REZULTATI

5.1. Analize hemijskog sastava etarskih ulja

Analize uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije jasno ukazuju na složen hemijski sastav ispitivanih etarskih ulja u oba istraživanja (Tabele 6 i 7). Identifikovana jedinjenja su bila zastupljena u različitim procentima i pripadaju različitim hemijskim grupama, ali se tipično najviše izdvajaju ugljovodonični terpeni, terpenoidi i fenilpropanoidna jedinjenja. Broj samih sastojaka, prisustvo određenih jedinjenja kao i njihova zastupljenost su varirali u zavisnosti od etarskog ulja, pa čak i kod onih poreklom od iste biljne vrste kao što su u našim istraživanjima bili timijan, hajdučka trava i pitoma nana. Zbog velikog broja identifikovanih jedinjenja kod etarskih ulja u oba istraživanja, u tabelama su prikazana samo ona koja su zastupljena više od 1% kod barem jednog ulja.

5.1.1. Prvo istraživanje

Prilikom analiza hemijskog sastava etarskih ulja u prvom istraživanju (Tabela 6), neka od najčešće identifikovanih jedinjenja su bila α -pinen (identifikovan kod svih 11 ispitivanih ulja), β -pinen, γ -terpinen i β -kariofilen (identifikovani kod deset ulja) i kamfen, *p*-cimen, limonen (identifikovani kod devet ulja), a pored njih i β -mircen, α -terpinen i drugi. Pojedinačno, najzastupljeniji sastojci kod svakog od ispitivanih ulja su bili sledeći: *p*-cimen 41,7%, timol 31,6% i α -terpineol 11,7% (**timijan 1**); timol 54,5%, *p*-cimen 21,0% i γ -terpinen 8,11% (**timijan 2**); eukaliptol 41,7%, kamfor 8,37 i trans-hrizantenil acetat 4,90% (**hajdučka trava 1**); β -pinen 28,5%, β -kariofilen 18,7% i eukaliptol 11,7% (**hajdučka trava 2**); *p*-cimen 42,8%, karvakrol 28,1% i γ -terpinen 14,6 (**rtanjski čaj**); karvakrol 49,5%, γ -terpinen 29,6% i *p*-cimen 12,9% (**čubar**); piperiton 25,4%, trans-dihidrokarvon 14,6% i α -terpineol 9,77% (**pitoma nana**); anetol 73,4%, fenkon 19,5% i estragol 3,37% (**morač**); α -pinen 28,0%, γ -kurkumen 20,1% i β -selinen 9,32% (**smilje**); karvakrol 76,2%, *p*-cimen 12,6% i γ -terpinen 2,63% (**origano**) i α -pinen 40,5%, sabinen 14,0% i β -mircen 8,87% (**kleka**).

Tabela 6a. Hemijski sastav (% ukupne površine pikova) ispitanih etarskih ulja određen uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije (prvo istraživanje)

Table 6a. Chemical composition (% of peak area) of tested essential oils determined by gas chromatography and mass spectrometry (first study)

AI	Jedinjenje	% Ukupne površine vrha										
		TV1	TV2	AM1	AM2	SM	SH	MP	FV	HA	OV	JC
925	α -Tujen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,88^b
932	α -Pinen	2,47	0,71	3,09	4,15	1,16	1,21	0,20	1,53	28,0	1,81	40,5
947	Kamfen	0,62	0,42	1,37	0,26	0,44	0,46	-	0,06	0,17	-	0,33
972	Sabinen	-	-	1,87	5,48	-	-	1,28	-	-	-	14,0
976	β -Pinen	0,18	0,10	1,50	28,5	0,66	-	0,12	0,05	0,21	1,64	2,70
990	β -Mircen	0,71	1,05	-	-	0,96	1,30	0,84	0,13	-	0,32	8,87
998	δ -2-Karen	-	-	1,40	-	-	-	-	-	-	-	-
1016	α -Terpinen	2,00	1,18	2,86	0,19	2,32	-	-	-	0,11	0,20	0,86
1024	<i>p</i> -Cimen	41,7	21,0	4,38	0,65	42,8	12,9	0,07	-	-	12,6	1,94
1027	Limonen	1,26	1,17	-	0,87	1,52	0,54	7,14	1,20	1,66	-	4,95
1030	Eukaliptol	0,66	-	41,7	11,7	0,73	-	2,64	-	0,57	-	-
1057	γ -Terpinen	-	8,11	1,13	0,40	14,6	29,6	4,46	0,29	0,31	2,63	1,42
1059	Artemisia keton	-	-	4,31	-	-	-	-	-	-	-	-
1082	Artemisia alkohol	-	-	1,57	-	-	-	-	-	-	-	-
1088	Fenkon	-	-	-	-	-	-	-	19,5	-	-	-
1100	Linalool	4,37	2,77	-	-	1,20	-	-	-	0,30	1,43	-
1106	cis-Tujon	-	-	3,28	-	-	-	-	-	-	-	-
1115	trans-Tujon	-	-	2,13	-	-	-	-	-	-	-	-
1124	Hrizantenton	-	-	2,55	-	-	-	-	-	-	-	-
1143	Kamfor	0,22	-	8,37	1,57	-	-	-	0,15	-	-	-
1152	Menton	-	-	-	-	-	-	3,33	-	-	-	-
1163	Izomenton	-	-	-	-	-	-	6,04	-	-	-	-
1164	Borneol	0,69	1,24	3,57	-	1,27	-	-	-	-	-	-
1176	Terpinen-4-ol	-	0,62	3,37	-	0,78	-	7,88	-	-	-	2,85
1190	α -Terpineol	11,7	0,26	1,18	-	-	-	9,77	-	0,33	-	-
1198	Estragol	-	-	-	-	-	-	-	3,37	-	-	-
1204	trans-Dihidrokarvon	-	-	-	-	-	-	14,6	-	-	-	-

*AI - aritmetički retencioni indeks; TV1 - *Thymus vulgaris* (Srbija); TV2 - *Thymus vulgaris* (Francuska); AM1 - *Achillea millefolium* tip 1; AM2 - *Achillea millefolium* type 2; SM - *Satureja montana*; SH - *Satureja hortensis*; MP - *Mentha x piperita*; FV - *Foeniculum vulgare*; HA - *Helichrysum arenarium*; OV - *Origanum vulgare*; JC - *Juniperus communis*; ^aSamo jedinjenja koja su zastupljena više od 1% u barem jednom etarskom ulju su prikazana u tabeli; ^bJedinjenja zastupljena više od 1% su prikazana boldovano

Tabela 6b. Hemijski sastav (% ukupne površine pikova) ispitanih etarskih ulja određen uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije (prvo istraživanje)

Table 6b. Chemical composition (% of peak area) of tested essential oils determined by gas chromatography and mass spectrometry (first study)

AI	Jedinjenje	% Ukupne površine vrha										
		TV1	TV2	AM1	AM2	SM	SH	MP	FV	HA	OV	JC
1214	Izodihidrokarveol	-	-	-	-	-	-	6,25	-	-	-	-
1234	trans-Hrizantenil acetat	-	-	4,90	-	-	-	-	-	-	-	-
1253	Piperiton	-	-	-	-	-	-	25,4	-	-	-	-
1286	Anetol	-	-	-	-	-	-	-	73,4	-	-	-
1292	Timol	31,6	54,5	-	-	-	0,36	-	-	-	0,97	-
1302	Karvakrol	-	3,95	-	-	28,1	49,5	-	-	-	76,2	-
1364	Neril acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	3,05	-	-
1375	α -Kopaen	-	-	-	-	-	-	-	-	3,09	-	0,28
1384	β -Burbonen	-	-	-	1,29	-	-	0,51	-	-	-	-
1391	β -Elemen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,24
1402	<i>iso</i> -Italicen	-	-	-	-	-	-	-	-	3,20	-	-
1418	β -kariofilen	0,82	1,69	0,59	18,7	2,46	1,25	1,69	-	6,36	2,23	1,71
1442	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,09	-	-
1452	α -Humulen	-	-	-	4,08	-	-	-	-	-	-	1,31
1474	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,64	-	-
1479	γ -Kurkumen	-	-	-	-	-	-	-	-	20,1	-	-
1480	Germakren D	-	-	-	8,01	-	-	-	-	-	-	2,54
1482	α -Kurkumen	-	-	-	-	-	-	-	-	4,15	-	-
1485	β -Selinen	-	-	-	-	-	-	-	-	9,32	-	-
1493	α -Selinen	-	-	-	-	-	-	-	-	5,21	-	-
1499	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33	-	-
1506	<i>seskviterpen</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33	-	-
1512	β -Kurkumen	-	-	-	-	-	-	-	-	1,89	-	-
1523	δ -Kadinen	-	-	-	0,90	-	-	-	-	1,53	-	2,46
1556	Germakren B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32
1582	Kariofilen oksid	-	-	2,14	2,49	-	-	2,14	-	-	-	-
1590	Viridiflorol	-	-	-	3,52	-	-	-	-	-	-	-
Broj ukupno identifikovanih jedinjenja		15	19	28	27	17	13	21	12	30	10	28

*AI - aritmetički retencioni indeks; TV1 - *Thymus vulgaris* (Srbija); TV2 - *Thymus vulgaris* (Francuska); AM1- *Achillea millefolium* tip 1; AM2 - *Achillea millefolium* type 2; SM - *Satureja montana*; SH - *Satureja hortensis*; MP - *Mentha x piperita*; FV - *Foeniculum vulgare*; HA - *Helichrysum arenarium*; OV - *Origanum vulgare*; JC - *Juniperus communis*; ^aSamo jedinjenja koja su zastupljena više od 1% u barem jednom etarskom ulju su prikazana u tabeli; ^bJedinjenja zastupljena više od 1% su prikazana boldovano

5.1.2. Drugo istraživanje

U drugom istraživanju (Tabela 7), najčešće identifikovana jedinjenja su bila α -pinen, mircen i limonen koji su identifikovani kod svih ispitanih ulja, zatim sabinen, β -pinen i γ -terpinen (identifikovani kod 8 ulja), kamfen i p-cimen (identifikovani kod 7 ulja), kao i eukaliptol, terpinen-4-ol, β -kariofilen i dr. Pojedinačno posmatrano, najzastupljeniji sastojci svakog ulja su bili: limonen 96,13%, trans-limonen oksid 1,31% i cis-limonen oksid 1,21% (**slatka narandža**); limonen 74,6%, β -pinen 11,6% i γ -terpinen 8,66% (**limun**); mentol 32,6%, menton 22,0% i mentil-acetat 10% (**pitoma nana**); karvon 64,4%, trans-4-karanon 8,67% i limonen 4,37% (**divlja nana**), linalool 84,5%, γ -terpinen 5,08% i kamfor 3,26% (**korijander**), cis-pinokamfon 47,6%, β -pinen 13,5%, trans-pinokamfon 12,15% (**miloduh**); α -tujon 38,8%, kamfor 19,8% i eukaliptol 8,40% (**žalfija**) i linalool 37,5%, eukaliptol 17,3% i borneol 14,2% (**lavanda**).

Tabela 7a. Hemijski sastav (% ukupne površine pikova) ispitanih etarskih ulja određen uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije (drugo istraživanje)

Table 7a. Chemical composition (% of peak area) of tested essential oils determined by gas chromatography and mass spectrometry (second study)

AI	Jedinjenje	% Ukupne površine vrha							
		CS	CM	MP	MS	CO	HO	SO	LA
932	α -Pinen	0,42	1,63^a	0,90	0,54	2,88	0,89	3,16	1,03
946	Kamfen	-	0,06	0,03	-	0,30	0,12	5,36	0,58
971	Sabinen	0,18	1,24	0,36	0,16	0,02	-	0,02	0,18
976	β -Pinen	-	11,6	1,15	0,67	0,21	13,5	1,16	1,09
989	Mircen	0,43	0,87	0,08	0,99	0,37	2,08	0,91	0,34
1023	p-Cimen	-	0,69	0,11	0,35	1,08	-	0,90	0,54
1027	Limonen	96,13	74,6	1,17	4,37	1,12	7,79	2,22	1,06
1029	Eukaliptol	-	-	5,22	0,53	0,14	-	8,40	17,3
1035	cis-Ocimen	-	-	0,19	-	-	0,28	-	3,20
1056	γ -Terpinen	-	8,66	0,67	0,32	5,08	0,25	0,36	0,27
1100	Linalool	-	-	-	-	84,5	0,43	0,20	37,5
1106	α -Tujon	-	-	-	-	-	-	38,8	-
1116	β -Tujon	-	-	-	-	-	-	5,07	-
1132	cis-Limonen oksid	1,21	-	-	-	-	-	-	-
1137	Trans-Limonen oksid	1,31	-	-	-	-	-	-	-
1143	Kamfor	-	-	-	-	3,26	-	19,75	4,76
1152	Menton	-	-	22,0	1,28	-	-	-	-
1156	pentil-Benzen	-	-	-	-	-	2,80	-	-
1159	trans-Pinokamfon	-	-	-	-	-	12,15	-	-
1163	Izomenton	-	-	9,39	0,50	-	-	-	-
1164	Borneol	-	-	-	-	-	-	1,89	14,2

*AI - aritmetički retencioni indeks; CS – *Citrus x sinensis*, CM – *Citrus medica*; MP – *Mentha x piperita*, MS – *Mentha spicata*; CO – *Coriandrum sativum*; HO – *Hyssopus officinalis*; SO – *Salvia officinalis*; LA – *Lavandula angustifolia*. ^aSamo jedinjenja koja su zastupljena više od 1% u barem jednom etarskom ulju su prikazana u tabeli;

^bJedinjenja zastupljena više od 1% su prikazana boldovano

Tabela 7b. Hemijski sastav (% ukupne površine pikova) ispitanih etarskih ulja određen uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije (drugo istraživanje)

Table 7b. Chemical composition (% of peak area) of tested essential oils determined by gas chromatography and mass spectrometry (second study)

AI	Jedinjenje	% Ukupne površine vrha							
		CS	CM	MP	MS	CO	HO	SO	LA
1171	Mentol	-	-	32,6	4,20	-	-	-	-
1173	cis-Pinokamfon	-	-	-	-	-	47,6	-	-
1176	Terpinen-4-ol	-	-	3,26	1,16	0,27	-	0,34	6,71
1182	izo-Mentol	-	-	1,29	0,13	-	-	-	-
1191	α -Terpineol	-	-	0,46	0,12	-	-	-	1,96
1193	Dihidro karveol	-	-	-	1,73	-	-	-	-
1196	trans-4-Karanon	-	-	-	8,67	-	-	-	-
1204	trans-Dihidro karvon	-	-	-	1,49	-	-	-	-
1238	Pulegon	-	-	4,45	0,10	-	-	-	-
1244	Karvon	-	-	-	64,4	-	-	-	-
1255	Linalil-acetat	-	-	-	-	-	-	-	6,11
1284	Bornil acetat	-	-	-	-	-	-	1,86	-
1293	Mentil-acetat	-	-	10,0	1,01	-	-	-	-
1327	izo-Dihidro karveol acetat	-	-	-	3,11	-	-	-	-
1383	B-burbonen	-	-	0,18	1,76	-	1,16	-	-
1418	β -kariofilen	-	-	2,78	0,93	-	1,56	3,95	0,53
1452	α -Humulen	-	-	-	-	-	0,16	4,15	-
1459	allo-Aromadendrene	-	-	-	-	-	1,52	-	-
1480	Germakren D	-	-	0,73	-	-	1,66	-	-
1495	Biciklogermakren	-	-	-	-	-	2,25	-	-
Broj ukupno identifikovanih jedinjenja		8	10	31	34	17	35	27	27

*AI - aritmetički retencioni indeks; CS – *Citrus x sinensis*, CM – *Citrus medica*; MP – *Mentha x piperita*, MS – *Mentha spicata*; CO – *Coriandrum sativum*; HO – *Hyssopus officinalis*; SO – *Salvia officinalis*; LA – *Lavandula angustifolia*. *Samo jedinjenja koja su zastupljena više od 1% u barem jednom etarskom ulju su prikazana u tabeli;

^bJedinjenja zastupljena više od 1% su prikazana boldovano

5.2. Test izleganja larvi

5.2.1. Prvo istraživanje

Rezultati testa izleganja larvi u prvom istraživanju su pokazali veoma visok antihelmintički potencijal ispitivanih etarskih ulja, odnosno visok inhibitorni uticaj na izleganje larvi iz jaja nematoda (ovicidni efekat) (Tabela 8, Grafikoni 1 i 2). Najefikasnija su bila etarska ulja origana, rtanjskog čaja i morača sa maksimalnom efikasnošću (100%), pri svim ispitanim koncentracijama. Visoku efikasnost su pokazali i etarska ulja čubra (99,3-100%), kao i oba uzorka ulja timijana (95,3-100% uzorak 1 odnosno 98,5-100% uzorak 2). Ostala ulja su pokazala takođe visok, ali dozno zavisni efekat: kleka 81-96,8% ($R^2 = 0,9442$); pitoma nana 72,5-99,8% ($R^2 = 0,9834$); dva tipa hajdučke trave, odnosno tip slobodan od azulena 46,5-100% ($R^2 = 0,9840$) i proazulenski tip 69,5-97,3% ($R^2 = 0,8637$), kao i binarna kombinacija linalool:estragol 29,5-100% ($R^2=0,9528$). Najnižu efikasnost, barem sa aspekta nedostizanja potrebnu efikasnost od 90% ili više ni pri jednoj koncentraciji, pokazalo je etarsko ulje smilja, sa aktivnošću od 59,8-69,3%. Ukoliko se efikasnost posmatra prema IC_{50} parametru, najnižu efikasnost je pokazala kombinacija linaloola i estragola.

Tabela 8a. Inhibitorni uticaj različitih *in vitro* primenjenih koncentracija ispitanih etarskih ulja na izleganje larvi gastrointestinalnih nematoda ovaca u % ($\bar{x} \pm SD$) (prvo istraživanje)

Table 8a. The inhibitory effect of different *in vitro* used concentrations of tested essential oils on egg hatching of sheep gastrointestinal nematodes in % ($\bar{x} \pm SD$) (first study)

K [mg/ml]	<i>Thymus vulgaris</i> 1	<i>Thymus vulgaris</i> 1	<i>Achillea millefolium</i> 1	<i>Achillea millefolium</i> 2	<i>Satureja montana</i>	<i>Satureja hortensis</i>
50	100 ± 0 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	99,5 ± 1 ^{Aa}	97,3 ± 0,96 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}
12,5	100 ± 0 ^{Aa}	99,5 ± 0,58 ^{Aa}	98 ± 1,83 ^{Aa}	90 ± 4,97 ^{Ab}	100 ± 0 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}
3,125	95,3 ± 5,68 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	95,3 ± 4,35 ^{Aa}	73 ± 1,63 ^{Bb}	100 ± 0 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}
0,781	97,5 ± 1,73 ^{Aab}	100 ± 0 ^{Aa}	87,5 ± 2,65 ^{Bb}	72,8 ± 8,42 ^{Bc}	100 ± 0 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}
0,195	98 ± 1,83 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	49 ± 1,63 ^{Cb}	71,3 ± 3,3 ^{Bc}	100 ± 0 ^{Aa}	99,8 ± 0,5 ^{Aa}
0,049	96,8 ± 2,22 ^{Aa}	98,5 ± 0,58 ^{Aa}	46,5 ± 3 ^{Cb}	69,5 ± 3,7 ^{Bc}	100 ± 0 ^{Aa}	99,3 ± 0,96 ^{Aa}
IC ₅₀ [mg/ml]	/	0,098	0,517	/	/	0,187
Kontrola (+)	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A
Kontrola (-)	16,8 ± 5,56 ^B	16,8 ± 5,56 ^B	16,8 ± 5,56 ^D	16,8 ± 5,56 ^C	16,8 ± 5,56 ^B	16,8 ± 5,56 ^B

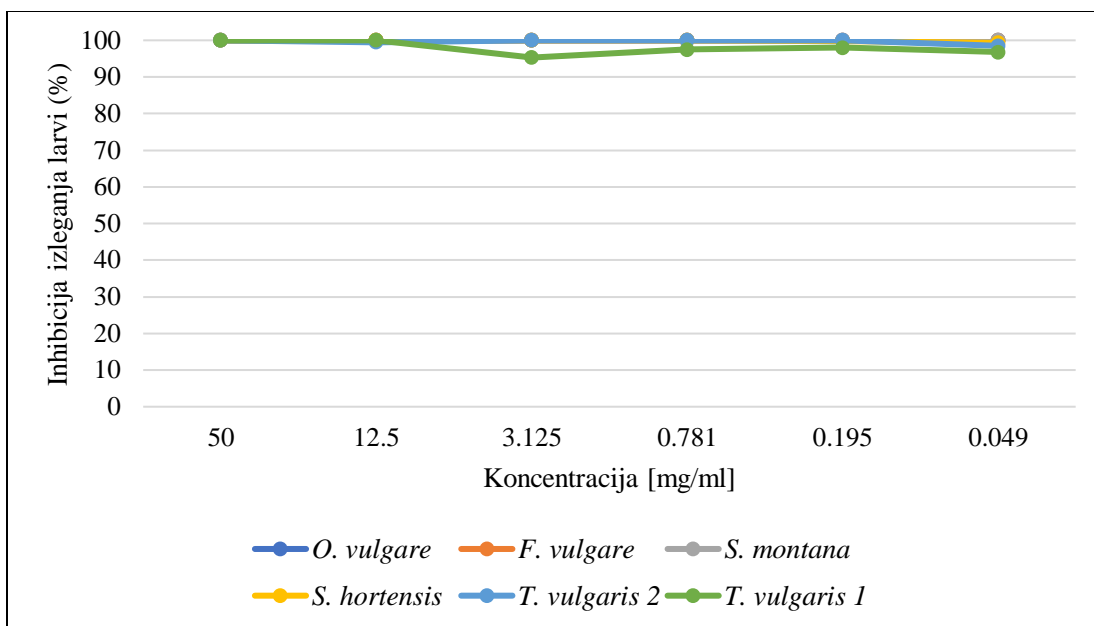
*Velika slova porede vrednosti dobijene za različite koncentracije istog ulja i kontrole, a mala slova vrednosti za iste koncentracije različitih etarskih ulja. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$, Tabela 8a i b); K - koncentracija; Kontrola (+) - tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL; Kontrola (-) 3% rastvor Tweena 80, v/v

Tabela 8b. Inhibitorni uticaj različitih *in vitro* primenjenih koncentracija ispitanih etarskih ulja na izleganje larvi gastrointestinalnih nematoda ovaca u % ($\bar{x} \pm SD$) (prvo istraživanje)

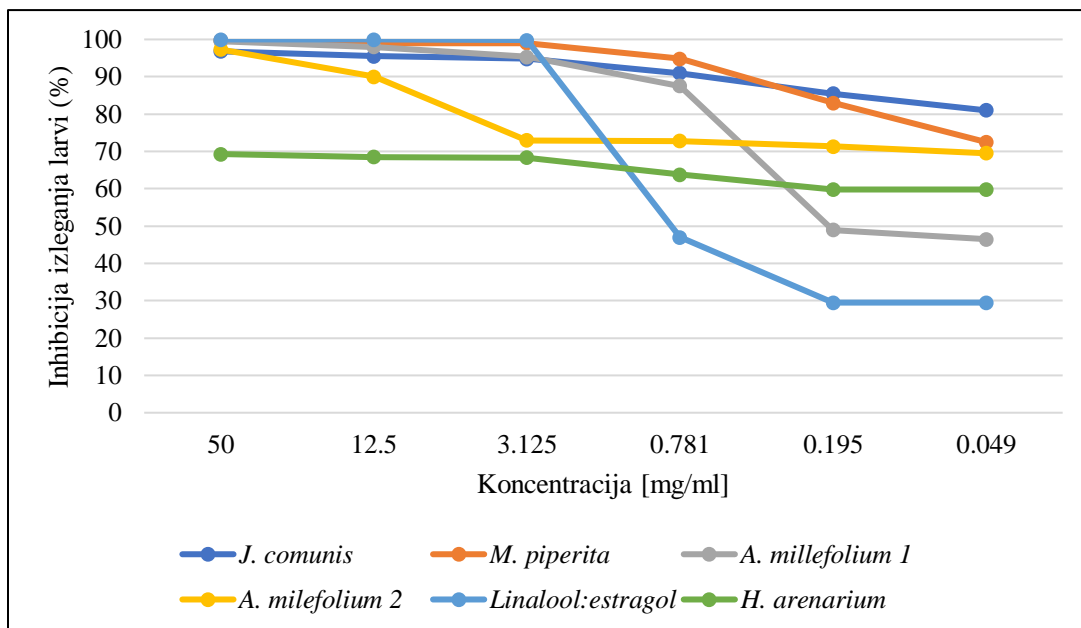
Table 8b. The inhibitory effect of different *in vitro* used concentrations of tested essential oils on egg hatching of sheep gastrointestinal nematodes in % ($\bar{x} \pm SD$) (first study)

K [mg/ml]	<i>Mentha x piperita</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Helichrysum arenarium</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Juniperus communis</i>	Linalool: estragol
50	99,8 ± 0,5 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	69,3 ± 2,22 ^{Ab}	100 ± 0 ^{Aa}	96,8 ± 1,71 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}
12,5	99 ± 0,82 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	68,5 ± 2,89 ^{Ac}	100 ± 0 ^{Aa}	95,5 ± 1,73 ^{Abab}	100 ± 0 ^{Aa}
3,125	99 ± 0,82 ^{Aa}	100 ± 0 ^{Aa}	68,3 ± 3,59 ^{Ab}	100 ± 0 ^{Aa}	94,8 ± 0,96 ^{Ab}	99,8 ± 0,5 ^{Aa}
0,781	94,8 ± 1,71 ^{Aab}	100 ± 0 ^{Aa}	63,8 ± 1,26 ^{Abd}	100 ± 0 ^{Aa}	91 ± 1,63 ^{Bb}	47 ± 20,45 ^{Be}
0,195	83 ± 1,63 ^{Bd}	100 ± 0 ^{Aa}	59,8 ± 2,22 ^{Be}	100 ± 0 ^{Aa}	85,5 ± 0,58 ^{Cd}	29,5 ± 1,29 ^{Bf}
0,049	72,5 ± 1,29 ^{Cc}	100 ± 0 ^{Aa}	59,8 ± 0,96 ^{Bd}	100 ± 0 ^{Aa}	81 ± 1,63 ^{Ce}	29,5 ± 2,65 ^{Bf}
IC ₅₀ [mg/ml]	0,281	/	0,952	/	0,485	0,980
Kontrola (+)	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A	98 ± 0,82 ^A
Kontrola (-)	16,8 ± 5,56 ^D	16,8 ± 5,56 ^B	16,8 ± 5,56 ^C	16,8 ± 5,56 ^B	16,8 ± 5,56 ^D	16,8 ± 5,56 ^B

*Velika slova porede vrednosti dobijene za različite koncentracije istog ulja i kontrole, a mala slova vrednosti za iste koncentracije različitih etarskih ulja. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$, Tabela 8a i b); K - koncentracija; Kontrola (+) - tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL; Kontrola (-) 3% rastvor Tweena 80, v/v



Grafikon 1. Grafički prikaz ovicidne aktivnosti najefikasnijih etarskih ulja iz prvog istraživanja
Graph 1. Graphic representation of the ovicidal activity of the most effective essential oils from the first study



Grafikon 2. Grafički prikaz ovicidne aktivnosti ostalih etarskih ulja iz prvog istraživanja
Graph 2. Graphic representation of the ovicidal activity of the other essential oils from the first study

5.2.2. Drugo istraživanje

Kada je u pitanju drugo istraživanje, praktično sva ispitana etarska ulja su takođe pokazala visok antihelmintički potencijal (Tabela 9, Grafikoni 3 i 4). Međutim, za razliku od prvog istraživanja, sva ulja su pokazala dozno-zavisni ovoidni efekat u većoj ili manjoj meri, s obzirom na drugačije postavke eksperimenta. Slično kao i kod prethodnog istraživanja, ponovo je najefikasniji bio origano sa inhibitornim efektom na izleganje larvi od 71,3-93,3% ($R^2 = 0,95$) u zavisnosti od koncentracije, što sugeriše na njegov ogroman antihelmintički potencijal. Vrlo visoku efikasnost su pokazali i etarska ulja miloduha sa inhibitornom aktivnošću od 42,7-91,3% ($R^2 = 0,93$), korijandera sa 29-92,7% ($R^2 = 0,90$) i bosiljka sa 23,3-93,3% ($R^2 = 0,98$). Ostala etarska ulja su takođe pokazala visok antihelmintički potencijal, odnosno ulja divlje (13-92,7%, $R^2 = 0,93$) i pitome nane (20-90,3%, $R^2 = 0,96$), zatim lavanda 28-84,7% ($R^2 = 0,98$), žalfija 15,0-89,0% ($R^2 = 0,99$) i slatka narandža 14,7-86,3% ($R^2 = 0,97$). Najslabiju aktivnost po većini parametara u ovom istraživanju su pokazala limun (12,3-95,0%) i, iznenađujuće, rtanjski čaj 17,3-83% ($R^2 = 0,94$).

Tabela 9a. Inhibitorni uticaj različitih *in vitro* primenjenih koncentracija ispitanih etarskih ulja na izleganje larvi gastrointestinalnih nematoda ovaca u % ($\bar{x} \pm SD$) (drugo istraživanje)

Table 9a. The inhibitory effect of different *in vitro* used concentrations of tested essential oils on egg hatching of sheep gastrointestinal nematodes in % ($\bar{x} \pm SD$) (second study)

K [mg/ml]	<i>Citrus x sinensis</i>	<i>Citrus medica</i>	<i>Mentha x piperita</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>
50	86,3 ± 2,08 ^{Acde}	95,0 ± 1 ^{Aa}	90,3 ± 2,08 ^{Aabcd}	92,7 ± 0,58 ^{Aab}	88,7 ± 1,53 ^{ABbcde}	91,3 ± 2,52 ^{ABabc}
12,5	78,0 ± 2 ^{Bf}	91,0 ± 1 ^{Aabc}	80,0 ± 2 ^{Bef}	93,7 ± 0,58 ^{Aa}	85,7 ± 1,16 ^{Bcde}	87,3 ± 5,69 ^{BCbcd}
3,125	73,7 ± 2,52 ^{Bc}	40,0 ± 1 ^{Bf}	67,0 ± 2,65 ^{Cd}	91,0 ± 1 ^{Aa}	81,0 ± 1 ^{BCb}	79,7 ± 1,53 ^{Cb}
0,781	51,7 ± 2,08 ^{Ce}	39,0 ± 1 ^{Bf}	62,3 ± 2,52 ^{CDd}	80,3 ± 0,58 ^{Bbc}	77,3 ± 2,08 ^{CDc}	75,7 ± 2,08 ^{Cc}
0,195	38,7 ± 2,08 ^D	29,3 ± 1,53 ^{Cg}	57,7 ± 1,53 ^{Dd}	76,0 ± 2,65 ^{Bbc}	76,0 ± 4,36 ^{CDbc}	71,7 ± 1,53 ^{Cc}
0,049	35,3 ± 4,16 ^{De}	19,7 ± 1,53 ^{Dg}	24,7 ± 2,52 ^{Efg}	51,0 ± 1 ^{Cd}	70,0 ± 1 ^{Db}	62,0 ± 2,65 ^{Dc}
0,025	20,7 ± 0,58 ^{Ee}	15,7 ± 3,06 ^{DEe}	20,0 ± 1 ^{EF}	19,7 ± 4,16 ^{De}	36,3 ± 4,16 ^{Ec}	53,0 ± 4,36 ^{Eb}
0,0125	14,7 ± 1,53 ^{Eg}	12,3 ± 2,31 ^{EFg}	21,0 ± 1 ^{EFef}	13,0 ± 1 ^{EFeg}	29,0 ± 2 ^{Ecd}	42,7 ± 2,08 ^{Fb}
IC ₅₀ [mg/ml]	0,50	2,52	0,43	0,07	0,04	0,19
Kontrola (+) ^a	96,3 ± 1,53 ^F	96,3 ± 1,53 ^A	96,3 ± 1,53 ^A	96,3 ± 1,53 ^A	96,3 ± 1,53 ^A	96,3 ± 1,53 ^A
Kontrola (+) ^b	95,0 ± 1 ^F	95,0 ± 1 ^A	95,0 ± 1 ^A	95,0 ± 1 ^A	95,0 ± 1 ^A	95,0 ± 1 ^{AB}
Kontrola (-) ^a	14,2 ± 3,34 ^E	14,2 ± 3,34 ^{DE}	14,2 ± 3,34 ^F	14,2 ± 3,34 ^{DE}	14,2 ± 3,34 ^F	14,2 ± 3,34 ^H
Kontrola (-) ^b	6,6 ± 1,92 ^G	6,6 ± 1,92 ^F	6,6 ± 1,92 ^G	6,6 ± 1,92 ^F	6,6 ± 1,92 ^F	6,6 ± 1,92 ^H

*Velika slova poredе vrednosti dobijene za različite koncentracije istog ulja i kontrole, a mala slova vrednosti za iste koncentracije različitih etarskih ulja.

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$, Tabela 9a i b); K - koncentracija; Kontrola (+)^a - tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL; Kontrola (+)^b tiabendazol u koncentraciji 0,0125 mg/mL; Kontrola (-)^a 3% rastvor Tweena 80, v/v.; Kontrola (-)^b - destilovana voda

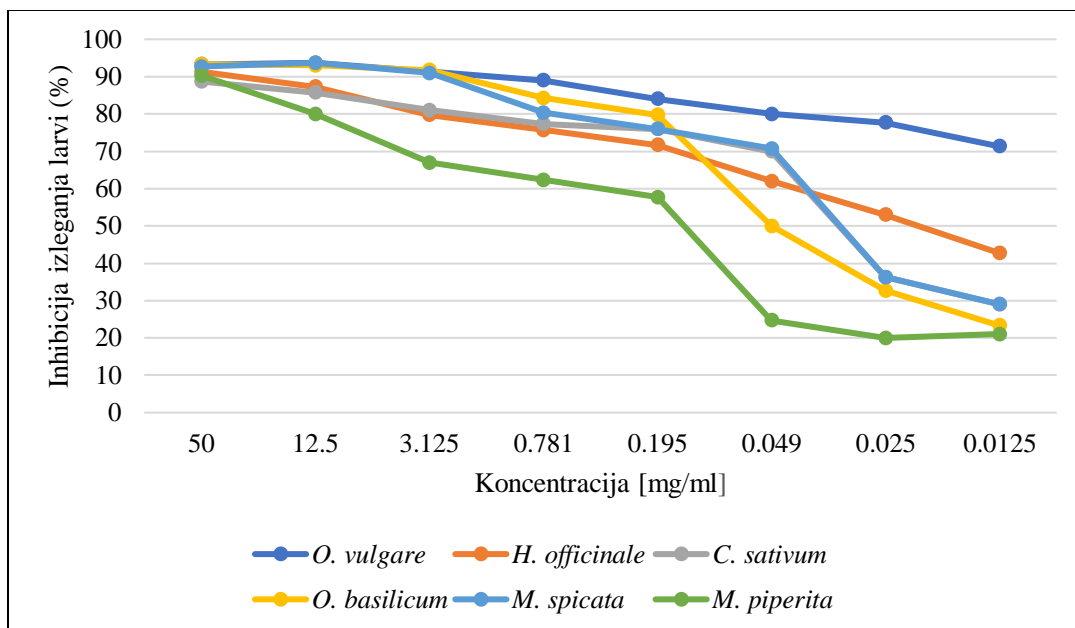
Tabela 9b. Inhibitorni uticaj različitih *in vitro* primenjenih koncentracija ispitanih etarskih ulja na izleganje larvi gastrointestinalnih nematoda ovaca u % ($\bar{x} \pm SD$) (drugo istraživanje)

Table 9b. The inhibitory effect of different *in vitro* used concentrations of tested essential oils on egg hatching of sheep gastrointestinal nematodes in % ($\bar{x} \pm SD$) (second study)

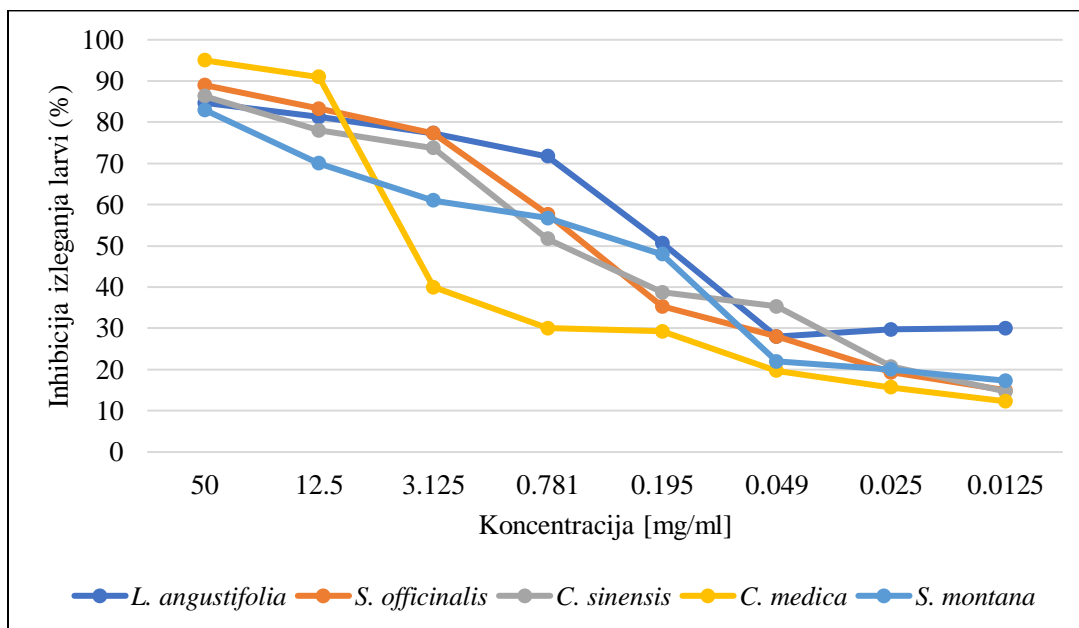
K [mg/ml]	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
50	89,0 ± 1 ^{ABbcd}	84,7 ± 2,52 ^{Ade}	93,3 ± 2,52 ^{Aab}	83,0 ± 2 ^{Ae}	93,3 ± 2,08 ^{Aab}
12,5	83,3 ± 1,53 ^{BCdef}	81,3 ± 1,53 ^{ABef}	93,7 ± 1,53 ^{Aa}	70,0 ± 2,65 ^{Bg}	93,0 ± 1 ^{Aab}
3,125	77,3 ± 2,08 ^{Cbc}	77,3 ± 2,08 ^{BCbc}	91,3 ± 1,53 ^{Aa}	61,0 ± 2 ^{Ce}	91,7 ± 1,53 ^{ABa}
0,781	57,7 ± 1,53 ^{Dd}	71,7 ± 1,53 ^{Cc}	89,0 ± 1 ^{ABFa}	56,7 ± 1,53 ^{Cde}	84,3 ± 3,06 ^{BCab}
0,195	35,3 ± 2,52 ^{Ef}	50,7 ± 2,52 ^{De}	84,0 ± 1 ^{BCa}	48,0 ± 1 ^{De}	79,7 ± 1,53 ^{Cab}
0,049	28,0 ± 2,65 ^{Ff}	28,0 ± 1 ^{Ef}	80,0 ± 1 ^{CDa}	22,0 ± 1 ^{Eg}	50 ± 5,29 ^{Dd}
0,025	19,3 ± 1,53 ^{Ge}	29,7 ± 1,53 ^{Ed}	77,7 ± 1,53 ^{Da}	20,0 ± 1 ^{EFe}	32,7 ± 2,08 ^{Ecd}
0,0125	15,0 ± 1 ^{Gg}	30,0 ± 1 ^{Ec}	71,3 ± 1,53 ^{Ea}	17,3 ± 2,52 ^{EFfg}	23,3 ± 2,08 ^{Fde}
IC ₅₀ [mg/ml]	0,53	0,31	0,15	0,59	0,08
Kontrola (+) ^a	96,3 ± 1,53 ^H	96,3 ± 1,53 ^F	96,3 ± 1,53 ^A	96,3 ± 1,53 ^G	96,3 ± 1,53 ^A
Kontrola (+) ^b	95,0 ± 1 ^{AH}	95,0 ± 1 ^F	95,0 ± 1 ^{AF}	95,0 ± 1 ^G	95,0 ± 1 ^A
Kontrola (-) ^a	14,2 ± 3,34 ^G	14,2 ± 3,34 ^G	14,2 ± 3,34 ^G	14,2 ± 3,34 ^F	14,2 ± 3,34 ^G
Kontrola (-) ^b	6,6 ± 1,92 ^I	6,6 ± 1,92 ^H	6,6 ± 1,92 ^H	6,6 ± 1,92 ^H	6,6 ± 1,92 ^G

*Velika slova poredje vrednosti dobijene za različite koncentracije istog ulja i kontrole, a mala slova vrednosti za iste koncentracije različitih etarskih ulja.

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$, Tabela 9a i b); K - koncentracija; Kontrola (+)^a - tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL; Kontrola (+)^b tiabendazol u koncentraciji 0,0125 mg/mL; Kontrola (-)^a 3% rastvor Tweena 80, v/v.; Kontrola (-)^b - destilovana voda



Grafikon 3. Grafički prikaz ovicidne aktivnosti najefikasnijih etarskih ulja iz drugog istraživanja
Graph 3. Graphic representation of the ovicidal activity of the most effective essential oils from the second study



Grafikon 4. Grafički prikaz ovicidne aktivnosti ostalih etarskih ulja iz drugog istraživanja
Graph 4. Graphic representation of the ovicidal activity of the other essential oils from the second study

5.3. Test redukcije broja jaja nematoda u fecesu

5.3.1. Prvo istraživanje

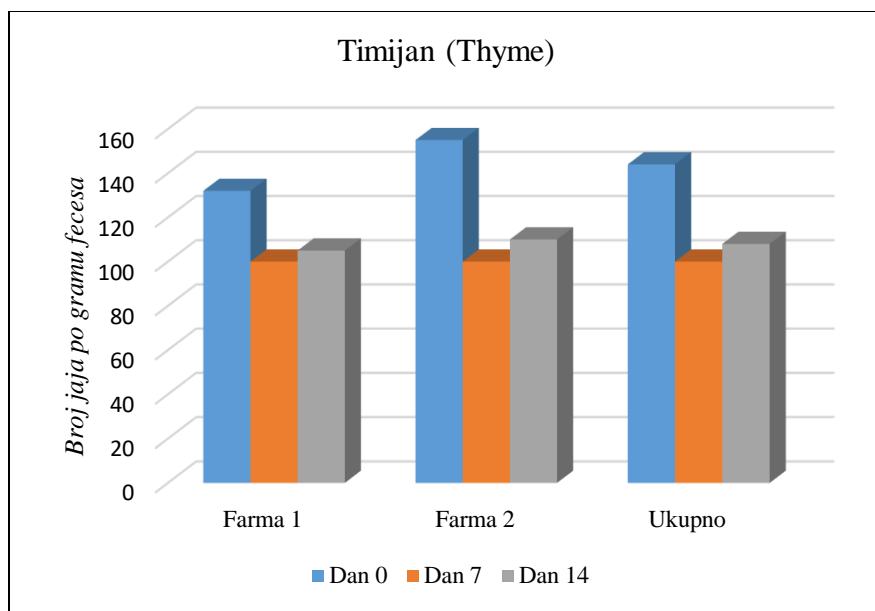
Dve formulacije odabrane za *in vivo* ispitivanje u prvom istraživanju su na nivou grupe su pokazale sličan antihelmintički efekat, odnosno procenat redukcije broja jaja nematoda (EPG) u fecesu ovaca. Naime, timijan 1 je pokazao efikasnost od 25,23% i 24,42%, a kombinacija linaloola i estragola od 24,91% i 25,90% 7. i 14. dana nakon tretmana, ukupno sa obe farme (Tabela 10, Grafikoni 5 i 6). Prosečne vrednosti EPG kod primenjenih formulacija se nisu značajno razlikovale od one u grupi životinja tretiranih sa suncokretovim uljem, iako su 7. dana bile slične sa grupom gde su ovce primile fenbendazol ($p > 0,05$). Međutim, u oba posmatrana vremenska intervala nakon tretmana primenjene formulacije su značajno smanjile broj EPG ($p < 0,05$), što nije slučaj sa suncokretovim uljem. Posmatrano sa aspekta svake životinje posebno, prosečno smanjenje broja jaja nematoda u fecesu u grupama timijana i linalool:estragola je 7. dana iznosilo 39,30% i 51,88%, iako je 14. dana bilo manje od 10%. U grupi životinja koja je tretirana sa fenbendazolom, prosečno individualno smanjenje broja jaja je iznosilo 84,73% (7. dana) i 87,32% (14. dana).

Tabela 10. Ukupan broj jaja gastrointestinalnih nematoda po gramu fecesa ($\bar{x} \pm SD$) i procenat njegove redukcije nakon primene etarskog ulja timijana i kombinacije linalool:estragol kod ovaca - nivo grupe

Table 10. Total number of gastrointestinal nematode eggs per gram of faeces ($\bar{x} \pm SD$) and the percentage of its reduction after administration of thyme essential oil and combination of linalool:estragole to sheep, group level

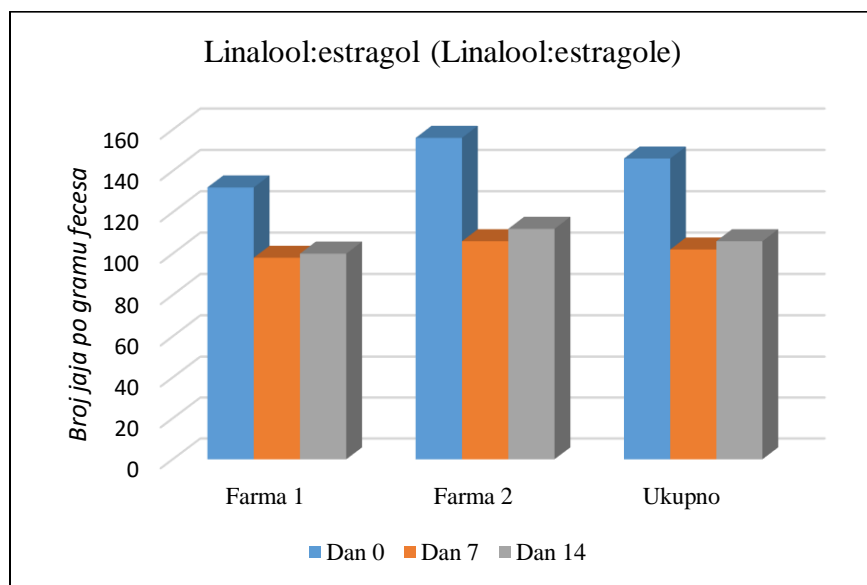
Formulacija		Dan 0	Dan 7	Dan 14
Thymus vulgaris, 100 mg/kg	EPG	143,5 ± 170,6 ^{Aa}	99,8 ± 123,1 ^{ABb}	107,7 ± 115,1 ^{Aab}
	Redukcija	/	25,23%	24,42%
Linalool:estragol, 100 mg/kg	EPG	145,6 ± 198,2 ^{Aa}	101,9 ± 148,2 ^{ABb}	106,3 ± 124,8 ^{Ab}
	Redukcija	/	24,91%	25,90%
Fenbendazol, kontrola (+)	EPG	221,4 ± 326,9 ^{Aa}	37,0 ± 86,5 ^{Ab}	24,8 ± 39,6 ^{Bb}
	Redukcija	/	82,74%	88,93%
Suncokretovo ulje, kontrola (-)	EPG	142,3 ± 149,1 ^{Aa}	132,5 ± 119,4 ^{Ba}	140 ± 100,1 ^{Aa}
	Redukcija	/	/	/

*Velika slova poredе vrednosti dobijene za različite formulacije na isti dan, a mala slova vrednosti za iste formulacije u različitim danima. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)



Grafikon 5. Prosečan broj jaja po gramu fecesa u različitim intervalima nakon tretmana u grupi životinja tretiranoj etarskim uljem timijana, prikaz rezultata na obe farme i ukupno

Graph 5. The average number of eggs per gram in different time points after the treatment in group of animals treated with thyme essential oil, the results from both tested farms individually and in total



Grafikon 6. Prosečan broj jaja po gramu fecesa u različitim intervalima nakon tretmana u grupi životinja tretiranoj kombinacijom linaloola i estragola, prikaz rezultata na obe farme i ukupno

Graph 6. The average number of eggs per gram in different time points after the treatment in group of animals treated with the combination of linalool and estragole, the results from both tested farms individually and in total

5.2.2. Drugo istraživanje

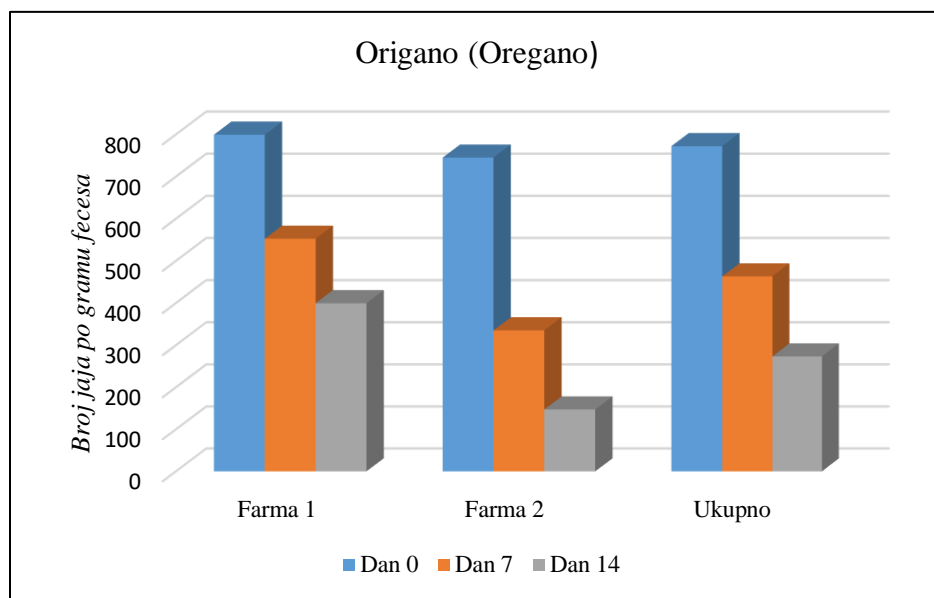
U drugom istraživanju, nakon određenih korekcija koje se tiču izbora etarskih ulja, doze pa i načina primene u određenoj meri postignuta je još veća efikasnost (Tabela 11, Grafikoni 7-9). Sva tri ispitana etarska ulja su pokazala *in vivo* antihelmintički potencijal, pri čemu je 7. dana nakon tretmana ukupna redukcija broja jaja nematoda u fecesu iznosila: origano 43,21%, pitoma nana 26,86% i rtanjski čaj 15,65%. Efikasnost istih ulja je bila još viša 14. dana i iznosila je 60,13%, 46,04% i 33,00%, redom. Za razliku od fenbendazola na koga je u prvom istraživanju zabeležen razvoj antihelmintičke rezistencije u određenoj meri, u ovom istraživanju je albendazol pokazao vrlo visoku efikasnost od 98,98% (7. dana) i 95,06% (14. dana), barem kada je u pitanju efikasnost na nivou grupe. Ulja origana i pitome nana su značajno smanjila vrednosti EPG nakon tretmana, a u slučaju origana su ove vrednosti bile značajno niže od one u grupi životinja koja je tretirana sa suncokretovim uljem 14. dana nakon tretmana ($p < 0,05$). Kada je u pitanju individualni FECRT, rezultati su u ovom istraživanju bili dosta sličniji sa efikasnošću na nivou grupe u poređenju sa prethodnim. Prosečno smanjenje broja jaja nematoda u fecesu kod origana, pitome nane i rtanjskog čaja je 7. dana bilo 26,14%, 22,51% i 22,38%, a 14. dana je bilo veće i iznosilo 51,48%, 48,06% i 40,71%, redom. Efikasnost albendazola je, posmatrana i na ovaj način, bila visoka i iznosila 95,25% (7. dana), odnosno nešto niže 14. dana, 88,30%.

Tabela 11. Ukupan broj jaja gastrointestinalnih nematoda po gramu fecesa ($\bar{x} \pm SD$) i procenat njegove redukcije nakon primene etarskih ulja origana, pitome nane i rtanjskog čaja kod ovaca - nivo grupe

Table 11. Total number of gastrointestinal nematode eggs per gram of faeces ($\bar{x} \pm SD$) and the percentage of its reduction after administration of the essential oils of oregano, mint and winter savory to sheep, group level

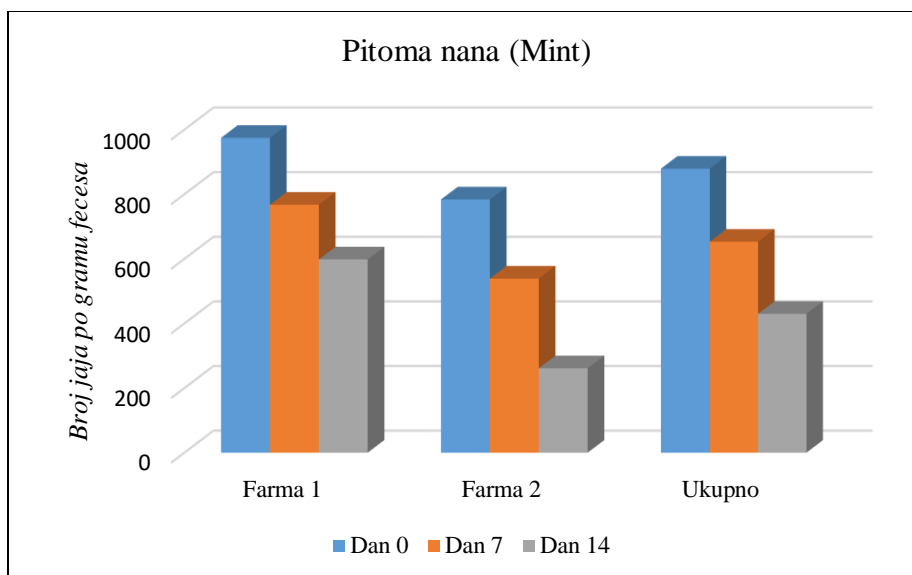
Formulacija		Dan 0	Dan 7	Dan 14
<i>O. vulgare</i> , 150 mg/kg	EPG	772,3 ± 865,8 ^{Aa}	463,9 ± 405,9 ^{Ab}	273,4 ± 265,0 ^{ABc}
	Redukcija	/	43,21%	60,13%
<i>M. piperita</i> , 150 mg/kg	EPG	879,2 ± 739,6 ^{Aa}	653,1 ± 571,8 ^{Ab}	429,8 ± 501,6 ^{BDb}
	Redukcija	/	26,86%	46,04%
<i>S. montana</i> , 150 mg/kg	EPG	682,1 ± 632,9 ^{Aa}	586,7 ± 552,9 ^{Aa}	434,9 ± 404,0 ^{BDa}
	Redukcija	/	15,66%	33,00%
Albendazol, kontrola (+)	EPG	683,1 ± 735,5 ^{Aa}	9,38 ± 11,8 ^{Bb}	36,89 ± 41,6 ^{Cc}
	Redukcija	/	98,98%	95,06%
Suncokretovo ulje, kontrola (-)	EPG	914,0 ± 821,9 ^{Aa}	914,4 ± 784,8 ^{Aa}	800,5 ± 680,3 ^{Da}
	Redukcija	/	/	/

*Velika slova porede vrednosti dobijene za različite formulacije na isti dan, a mala slova vrednosti za iste formulacije u različitim danima. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)

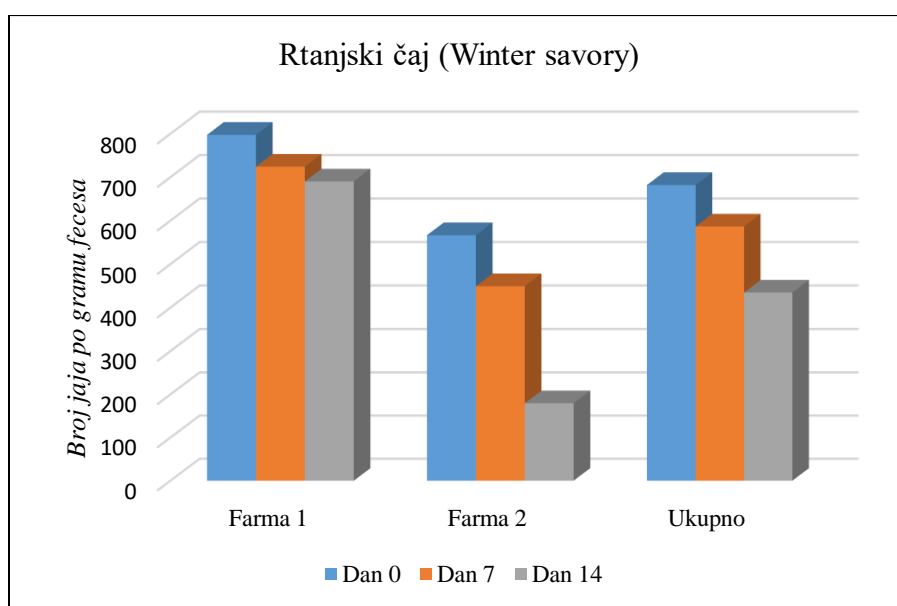


Grafikon 7. Prosečan broj jaja po gramu fecesa u različitim intervalima nakon tretmana u grupi životinja tretiranoj etarskim uljem origana, prikaz rezultata na obe farme i ukupno

Graph 7. The average number of eggs per gram in different time points after the treatment in group of animals treated with oregano essential oil, the results from both tested farms individually and in total



Grafikon 8. Prosečan broj jaja po gramu fecesa u različitim intervalima nakon tretmana u grupi životinja tretiranoj etarskim uljem pitome nane, prikaz rezultata na obe farme i ukupno
Graph 8. The average number of eggs per gram in different time points after the treatment in group of animals treated with mint essential oil, the results from both tested farms individually and in total



Grafikon 9. Prosečan broj jaja po gramu fecesa u različitim intervalima nakon tretmana u grupi životinja tretiranoj etarskim uljem rtanjskog čaja, prikaz rezultata na obe farme i ukupno
Graph 9. The average number of eggs per gram in different time points after the treatment in group of animals treated with winter savory essential oil, the results from both tested farms individually and in total

U oba istraživanja se zapažaju visoke vrednosti standardne devijacije za vrednosti EPG na nivou grupa, što ukazuje na velike individualne razlike u broju prisutnih parazita. Dalje, s obzirom da su identične farme korišćene u oba istraživanja, na Grafikonima 1-5 se vidi da je viša efikasnost primenjenih formulacija postignuta na farmi 2. Tako je, na primer, u slučaju ulja origana efikasnost na drugoj farmi 14. dana nakon tretmana bila čak 78,26% u poređenju sa 41,99% na prvoj farmi. Ista zapažanja se beleže i sa uljem pitome nane gde je efikasnost istog dana posmatranja bila 63,35% na drugoj, odnosno 38,61% na prvoj farmi, a posebno u slučaju rtanjskog čaja ($p < 0,05$), čija efikasnost je zabeležena u vrednosti od 66,67% i 13,46%. Do sličnih rezultata se došlo i 7. dana posmatranja. Ovi rezultati se mogu objasniti time što se životinje na ovoj farmi drže u vezanom sistemu za razliku od farme 1 gde se drže u slobodnom. Na taj način je na drugoj farmi bila lakša manipulacija sa životinjama koja je omogućila precizniju aplikaciju. Potrebno je naglasiti i činjenicu da su navedeni procenti redukcije (FECR) korigovana varijanta dobijena uz pomoću formule koja uključuje faktor redukcije u negativnoj kontroli, te da je ukupna efikasnost bila u većini slučajeva nešto viša za nekoliko procenata u datim grupama (npr. u drugom istraživanju, 14. dana nakon tretmana origano 65,13%, pitomu nanu 52,64%, i rtanjski čaj 40,89%). Međutim, kako se u većini sličnih istraživanja koristi ova formula u cilju preciznijeg prikaza rezultata, ista je korišćena takođe i u našim istraživanjima.

5.4. Studije toksičnosti

5.4.1. Klinički pregled životinja

U oba istraživanja, prilikom kliničkog pregleda nisu zabeleženi nikakvi neželjeni efekti ni kod jedne od primenjenih formulacija tokom perioda posmatranja (pre tretmana, kao i 7. i 14. dana nakon tretmana). Naime, nisu uočene bilo kakve promene na telu životinja niti promene u ponašanju, a životinje su normalno jele i defecirale.

5.4.2. Analiza hematoloških parametara krvi

Kada su u pitanju hematološke analize, ukoliko se posmatra period pre tretmana, jasno se zapaža kod životinja iz svih grupa prisustvo anemije. Na to ukazuju vrednosti parametara poput broja crvenih krvnih zrnaca, hemoglobina i hematokrita koje su ispod referentnih vrednosti. Na prvoj farmi, tretmani sa etarskim uljima pitome nane i rtanjskim čajem, kao i sa albendazolom su doveli do izvesnog poboljšanja ovih parametara iako bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) (Tabela 12). Suprotno, na drugoj farmi su praktično u svim grupama ove vrednosti 14. dana bile nešto niže u poređenju sa periodom pre tretmana, ali takođe bez značajne razlike. Posmatrano ukupno, najpozitivniji efekat u smislu poboljšanja vrednosti pomenutih vrednosti je uz albendazol pokazalo etarsko ulje rtanjskog čaja, dok su pitoma nana i origano takođe pokazali nešto bolji efekat u poređenju sa negativnom kontrolom, bez značajne razlike ($p > 0,05$). Vrednosti svih ispitvanih hematoloških parametara u svim grupama koje su bile tretirane etarskim uljima se nisu značajno promenile u poređenju sa analizama pre tretmana (Tabela 13). Takođe, ove vrednosti su bile slične sa grupom koja je tretirana suncokretovim uljem (negativnom kontrolom), kao i sa albendazolom (pozitivnom kontrolom) ($p > 0,05$).

Tabela 12. Prosečne vrednosti broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita ($\bar{x} \pm SD$) u različitim ispitivanim grupama na prvoj farmi pre i 14 dana nakon tretmana

Table 12. Average values of the number of erythrocytes, haemoglobin and haematocrit ($\bar{x} \pm SD$) in different tested groups at the first farm before and 14 days after the treatment

Parametri	Referentne vrednosti	Dan	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Mentha x piperita</i>	<i>Satureja montana</i>	Albendazol (+)	Suncokretovo ulje (-)
RBC (M/uL)	8,0 - 16,0	0.	7,73 ± 1,0	6,87 ± 1,0	7,81 ± 1,3	6,91 ± 0,5	8,00 ± 1,6
		14.	7,52 ± 1,1	7,49 ± 0,9	8,30 ± 0,8	7,23 ± 0,8	7,23 ± 1,1
Hgb (g/dL)	8,0 - 16,0	0.	10,63 ± 1,7	9,43 ± 1,5	11,08 ± 1,4	9,73 ± 0,5	12,03 ± 2,3
		14.	11,0 ± 1,7	11,02 ± 1,0	12,55 ± 0,7	10,82 ± 0,7	10,7 ± 1,7
Hct (%)	24,0 - 50,0	0.	27,33 ± 5,2	23,75 ± 3,9	28,62 ± 3,7	24,78 ± 1,4	30,80 ± 5,8
		14.	27,13 ± 4,3	26,37 ± 3,4	30,48 ± 1,8	26,17 ± 1,4	26,45 ± 3,8

Tabela 13. Prosečne vrednosti hematoloških parametara ($\bar{x} \pm SD$) u različitim ispitivanim grupama pre i 14 dana nakon tretmana, ukupno na obe farme

Table 13. Average values of haematological parameters (mean ± standard deviation) in different tested groups before and 14 days after the treatment, in total from both examined farms

Parametri	Referentne vrednosti	Dan	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Mentha x piperita</i>	<i>Satureja montana</i>	Albendazol, K (+)	Suncokretovo ulje, K(-)
WBC (K/uL)	4,0 - 12,0	0.	8,21 ± 1,8	8,04 ± 1,8	9,61 ± 2,0	9,59 ± 1,6	8,78 ± 2,9
		14.	8,82 ± 2,0	8,08 ± 2,25	9,95 ± 2,5	9,45 ± 2,6	8,74 ± 2,3
RBC (M/uL)	8,0 - 16,0	0.	8,1 ± 0,9	7,78 ± 0,9	7,67 ± 1,4	7,50 ± 0,5	8,01 ± 1,0
		14.	7,58 ± 1,0	7,63 ± 0,6	7,74 ± 0,9	7,66 ± 0,6	7,45 ± 1,1
Hgb (g/dL)	8,0 - 16,0	0.	11,35 ± 1,6	10,58 ± 1,3	10,83 ± 1,3	10,43 ± 0,5	11,65 ± 1,8
		14.	11,0 ± 1,6	10,90 ± 0,8	11,43 ± 0,9	11,08 ± 0,8	10,96 ± 1,7
Hct (%)	24,0 - 50,0	0.	28,37 ± 4,1	26,48 ± 2,9	27,57 ± 3,3	26,41 ± 1,6	29,38 ± 4,7
		14.	26,63 ± 3,6	26,08 ± 2,0	28,03 ± 1,9	27,30 ± 1,8	27,35 ± 4,2

MCV (fL)	23,0 - 48,0	0.	35,0 ± 2,1	34,08 ± 1,4	36,41 ± 3,9	35,17 ± 1,7	36,75 ± 2,4
		14.	35,08 ± 2,3	34,27 ± 1,8	36,50 ± 3,0	35,67 ± 2,0	36,75 ± 1,8
MCH (Pg)	9,0 - 12,0	0.	13,95 ± 0,7	13,61 ± 0,4	14,28 ± 1,4	13,94 ± 0,6	14,56 ± 0,8
		14.	14,5 ± 0,8	14,29 ± 0,47	14,86 ± 1,1	14,52 ± 0,7	14,73 ± 0,8
MCHC (g/dL)	31,0 - 38,0	0.	39,97 ± 1,5	39,93 ± 1,2	39,24 ± 0,9	39,53 ± 1,0	39,69 ± 0,8
		14.	41,26 ± 1,0	41,81 ± 1,4	40,75 ± 0,8	40,45 ± 0,7	40,14 ± 0,9
RDW (%)	-	0.	16,11 ± 0,8	15,46 ± 0,8	15,97 ± 1,0	15,52 ± 0,5	15,93 ± 0,7
		14.	15,93 ± 0,6	15,44 ± 0,7	16,18 ± 0,9	15,77 ± 0,5	15,69 ± 0,8
Pit (K/uL)	250 - 750	0.	763,4 ± 220,3	656,9 ± 220,9	567,3 ± 215,6	517,0 ± 119,0	545,1 ± 189,1
		14.	631,2 ± 207,8	594,6 ± 183,1	522,2 ± 179,9	468,2 ± 142,0	483,0 ± 207,7
MPV (fL)	-	0.	11,77 ± 1,5	12,20 ± 1,4	11,48 ± 2,1	11,34 ± 1,5	11,13 ± 1,3
		14.	11,73 ± 1,8	12,07 ± 1,5	11,50 ± 1,9	11,42 ± 1,6	10,78 ± 1,3
Pct (%)	-	0.	0,60 ± 0,1	0,70 ± 0,2	0,57 ± 0,2	0,60 ± 0,6	0,58 ± 0,2
		14.	0,60 ± 0,2	0,66 ± 0,2	0,61 ± 0,3	0,54 ± 0,2	0,46 ± 0,1
PDW (%)	-	0.	5,98 ± 9,3	3,04 ± 4,7	6,22 ± 8,4	5,43 ± 4,5	5,83 ± 8,0
		14.	5,77 ± 8,7	4,47 ± 4,9	9,51 ± 9,50	4,59 ± 5,0	9,23 ± 9,6
Lin (K/uL)	-	0.	4,63 ± 1,1	4,39 ± 1,5	5,73 ± 1,3	4,94 ± 1,3	4,16 ± 1,1
		14.	4,72 ± 1,3	4,78 ± 1,4	5,97 ± 1,9	5,41 ± 2,5	4,73 ± 1,6
Lin (%)	40 - 75%	0.	56,67 ± 7,2	53,75 ± 11,2	59,50 ± 6,9	51,83 ± 12,0	52,83 ± 12,3
		14.	55,60 ± 8,8	58,80 ± 6,2	60,27 ± 1,9	56,42 ± 17,1	54,17 ± 6,8
Gra (K/uL)	-	0.	3,58 ± 1,1	3,65 ± 1,0	3,88 ± 1,0	4,65 ± 1,4	4,09 ± 2,4
		14.	4,09 ± 1,3	3,31 ± 1,1	3,98 ± 1,3	4,04 ± 1,7	4,01 ± 1,2
Gra (%)	-	0.	43,33 ± 7,2	46,25 ± 1,1	40,50 ± 6,9	48,17 ± 12,0	47,17 ± 12,3
		14.	44,40 ± 8,8	41,20 ± 6,2	39,73 ± 10,8	43,58 ± 17,1	45,83 ± 6,8

*Nisu utvrđene statistički značajne razlike prilikom poređenja vrednosti na dan 14. u odnosu na dan 0., kao ni prilikom poređenja vrednosti za različite grupe u istom danu ($p > 0,05$)

5.4.3. Analiza biohemijskih parametara krvi

Ukupno na obe farme, vrednosti ureje i kreatinina kao markera funkcije bubrega su bile u svim ispitivanim grupama slične ($p > 0,05$) pre i 14 dana nakon tretmana. Takođe, u oba vremenska intervala posmatranja, vrednosti su bile slične poredeći različite grupe. Kada se posmatra AST, vrednosti su bile slične poredeći različite grupe u istim vremenskim intervalima, kao i poredeći vrednosti u istim grupama pre i posle tretmana, osim u slučaju pitome nane gde je zabeleženo značajno smanjenje ($p < 0,05$). Najznačajnije promene su zabeležene posmatrajući parametar GGT, gde je 14. dana nakon tretmana zabeleženo statistički značajno smanjenje u svim grupama osim u kontrolnoj (suncokretovo ulje), a zabeležene su i izvesne razlike poredeći vrednosti u različitim grupama 14. dana nakon tretmana (Tabela 14). Dobijeni rezultati hematoloških i biohemijskih analiza krvi govore u prilog odsustvu neželjenih i toksičnih efekata primenjenih etarskih ulja na parametre krvi, odnosno na funkciju bubrega i jetre.

Tabela 14. Prosečne vrednosti ($\bar{x} \pm SD$) biohemijskih parametara krvi u različitim ispitivanim grupama pre i 14 dana nakon tretmana, ukupno sa obe farme

Table 14. Average values ($\bar{x} \pm SD$) of biochemical blood parameters in different tested groups before and 14 days after the treatment, in total from both examined farms

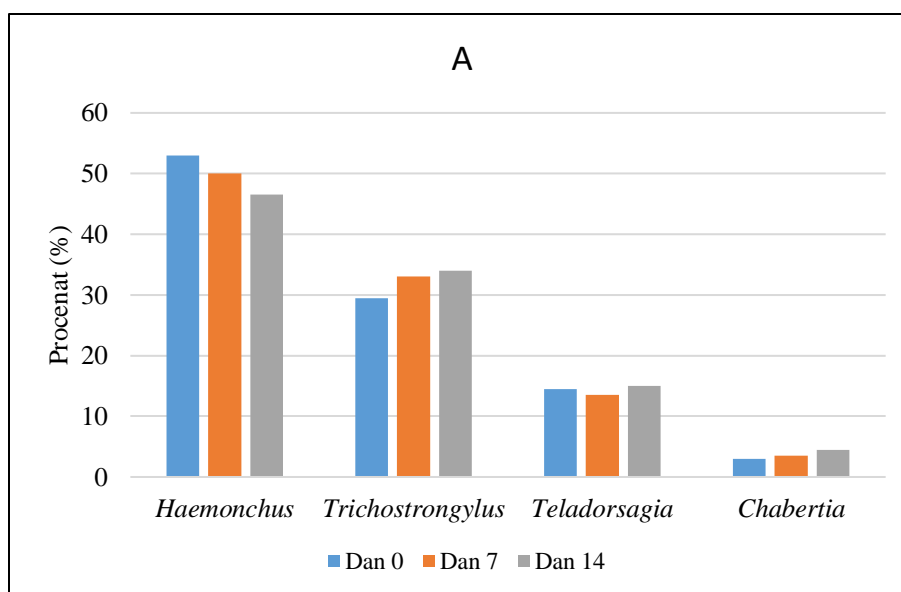
Etarsko ulje	Dan	Ureja (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	AST (UI/l)	GGT (UI/l)
<i>Origanum vulgare</i>	Dan 0	31,0 ± 7,41 ^{Aa}	13,58 ± 3,68 ^{Aa}	164,4 ± 48,64 ^{Aa}	72,75 ± 7,62 ^{Aa}
	Dan 14	28,42 ± 6,71 ^{Aa}	14,08 ± 3,53 ^{Aa}	173,1 ± 46,08 ^{Aa}	66,42 ± 4,72 ^{Bab}
<i>Mentha piperita</i>	Dan 0	29,25 ± 7,24 ^{Aa}	12,92 ± 3,48 ^{Aa}	225,2 ± 47,47 ^{Aa}	69,83 ± 8,01 ^{Aa}
	Dan 14	30,25 ± 3,93 ^{Aa}	13,50 ± 2,91 ^{Aa}	156,8 ± 49,99 ^{Ba}	65,00 ± 6,09 ^{Bb}
<i>Satureja montana</i>	Dan 0	31,0 ± 8,74 ^{Aa}	14,08 ± 3,03 ^{Aa}	180,3 ± 61,10 ^{Aa}	71,75 ± 7,62 ^{Aa}
	Dan 14	30,83 ± 6,98 ^{Aa}	11,83 ± 3,41 ^{Aa}	157,8 ± 42,10 ^{Aa}	65,00 ± 3,77 ^{Bb}
Albendazol	Dan 0	27,58 ± 9,45 ^{Aa}	12,42 ± 2,75 ^{Aa}	173,3 ± 82,72 ^{Aa}	72,00 ± 8,86 ^{Aa}
	Dan 14	28,42 ± 6,07 ^{Aa}	13,42 ± 3,68 ^{Aa}	163,0 ± 50,72 ^{Aa}	66,50 ± 5,54 ^{Bab}
Sunc. ulje	Dan 0	29,83 ± 7,87 ^{Aa}	12,42 ± 2,84 ^{Aa}	189,7 ± 72,63 ^{Aa}	72,50 ± 7,82 ^{Aa}
	Dan 14	29,33 ± 4,91 ^{Aa}	12,83 ± 3,04 ^{Aa}	206,9 ± 56,32 ^{Aa}	73,67 ± 5,30 ^{Aa}

*Velika slova poredе vrednosti dobijene za jedan parametar kod istih tretmana u različitim vremenskim intervalima, a mala slova vrednosti za jedan parametar u istom vremenskom intervalu kod različitim tretmana.

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)

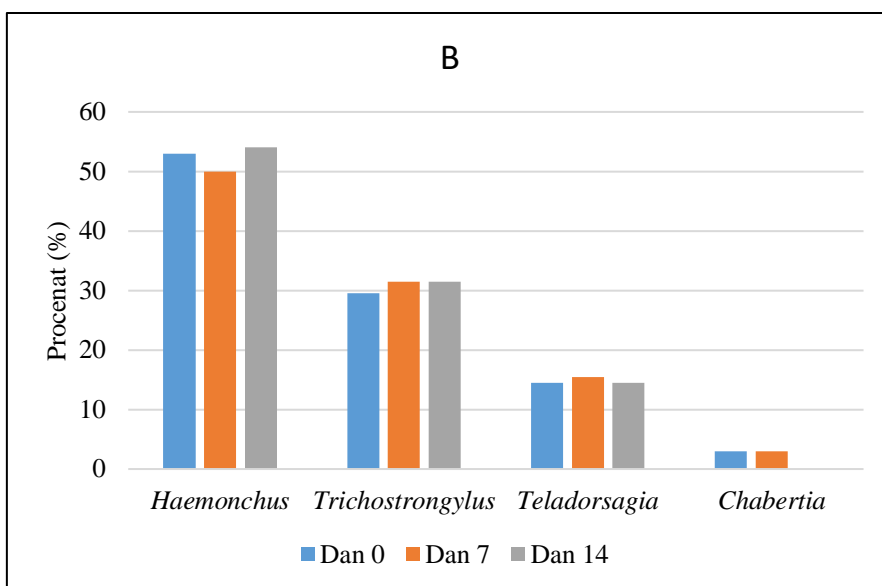
5.5. Koprokultura

Četiri roda gastrointestinalnih nematoda je identifikovano prilikom ispitivanja koprokulture na ispitivanim farmama u oba istraživanja. Ukupno u prvom istraživanju, njihova zastupljenost pre tretmana je bila sledeća: *Haemonchus* 53%, *Trichostrongylus* 29,5%, *Teladorsagia* 14,5% i *Chabertia* 3%. Nakon tretmana, njihova zastupljenost se menjala u određenoj meri u zavisnosti od grupe (Grafikoni 10-13). Procenat *Haemonchus*-a je opadao praktično u svim grupama, te je 14. dana njegov procenat iznosio u grupi tretiranoj uljem timijana 46,5%, fenbedazolom 45,5% i suncokretovim uljem 50%. U istim grupama, procenat roda *Teladorsagia* je rastao pa je 14. dana iznosio 15%, 20% i 18%, redom. Procenat roda *Trichostrongylus* se takođe povećavao pa je 14. dana iznosio u grupi tretiranoj timijanom 34%, kombinacijom linalool:estragol 31,5% i fenbendazolom 32%. Procenat roda *Chabertia*-a se nije menjao, osim povećanja u grupi tretiranoj timijanom (4,5%, 14. dana) i izostanka (0%) u grupi tretiranoj linalool:estragolom 14. dana nakon tretmana. Međutim, ni za jednu od ovih promena osim navedene nije utvrđena statistička značajnost, a zastupljenost rodova je bila slična u svim grupama ($p > 0,05$). Ipak, utvrđeno je ukupno značajno smanjenje ($p < 0,05$) procenta roda *Haemonchus* 7. dana (48,75%) u poređenju sa periodom pre tretmana (53%).



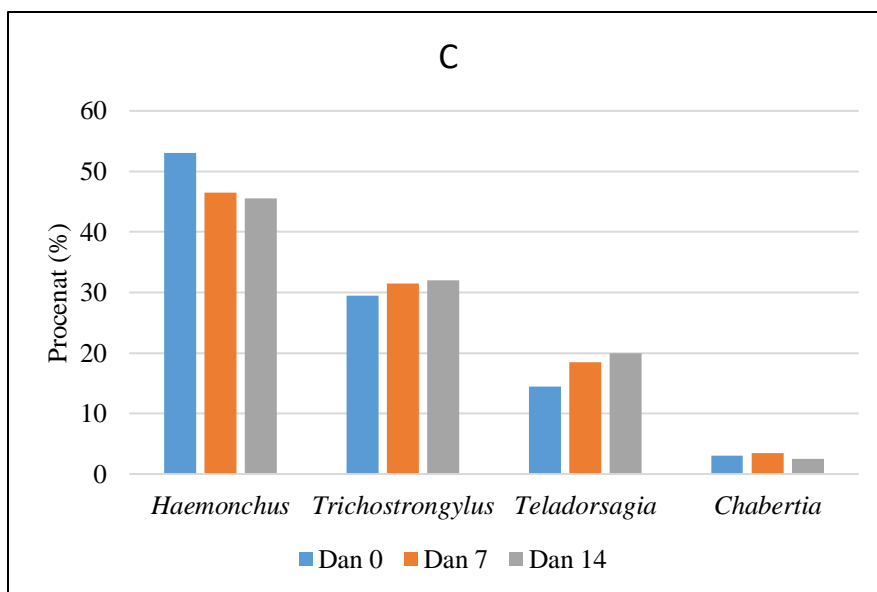
Grafikon 10. Procentualna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je tretirana etarskim uljem timijana

Graph 10. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received thyme essential oil



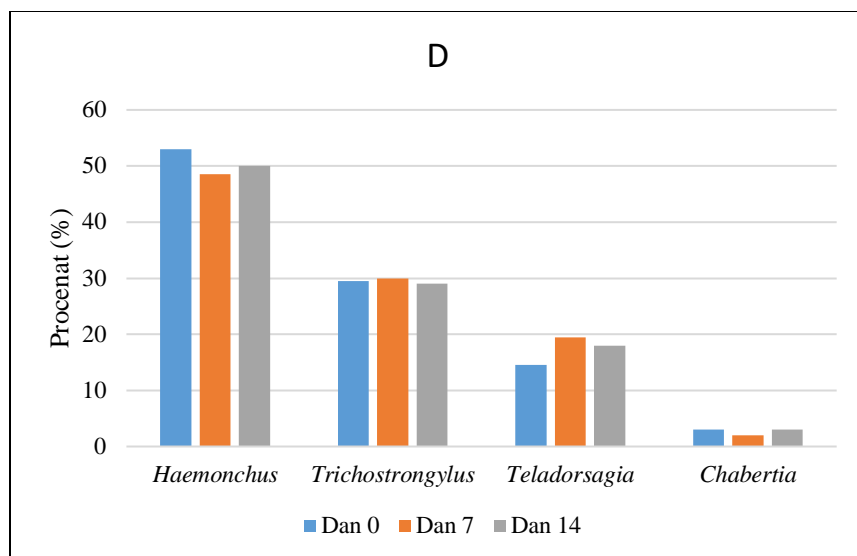
Grafikon 11. Procentualna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je tretirana kombinacijom linaloola i estragola

Graph 11. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received combination of linalool and estragole



Grafikon 12. Procentualna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je tretirana fenbendazolom (pozitivna kontrola)

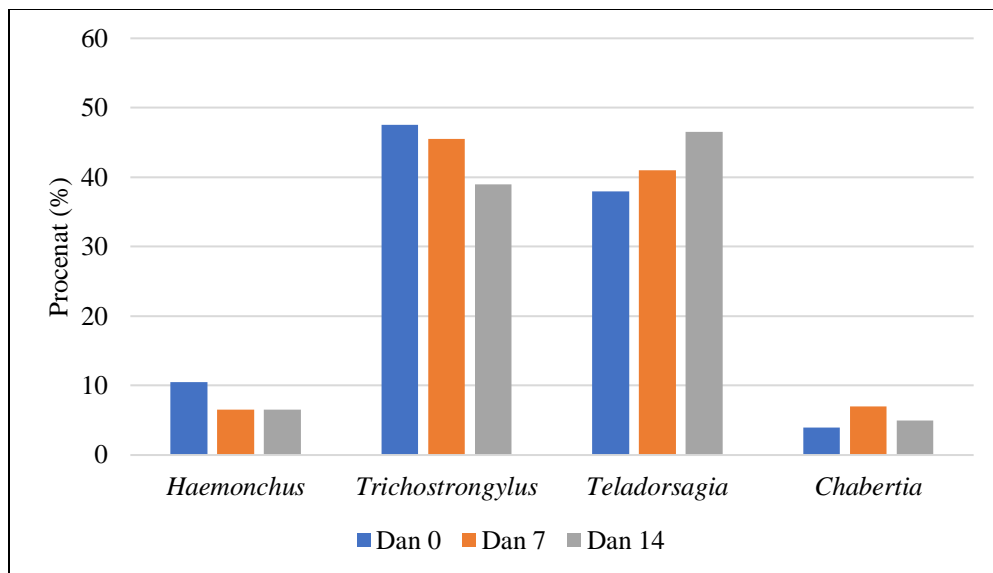
Graph 12. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received fenbendazole (positive control)



Grafikon 13. Procentaulna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je primila suncokretovo ulje (negativna kontrola)

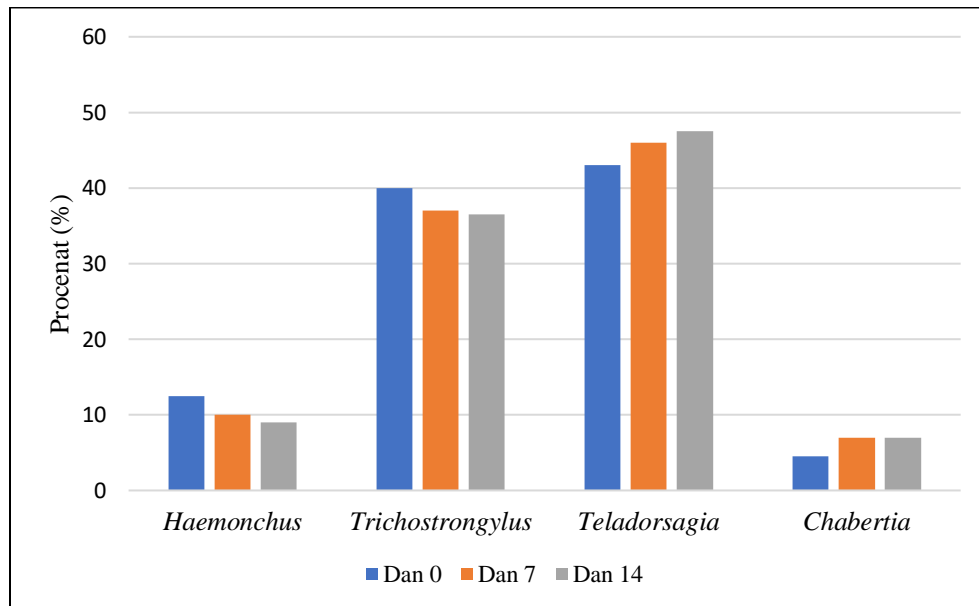
Graph 13. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received sunflower oil (negative control)

U drugom istraživanju sprovedenim na istim farmama, ispitivanjem koprokulture su ponovo identifikovani isti rodovi. U ovom slučaju, zastupljenost ukupno na obe farme se pratila pre, kao i 7. i 14. dana nakon tretmana u grupi ovaca tretiranim uljem origana i suncokretovim uljem, pri čemu je pre tretmana bila sledeća: *Haemonchus* 10,5%, *Trichostrongylus* 47,5%, *Teladorsagia* 38% i *Chabertia* 4%. Nakon toga, slično kao i u prethodnom istraživanju, beleži se pad zastupljenosti roda *Haemonchus*, ali i roda *Trichostrongylus*, dok je procenat ostalih rodova rastao. Tako je zastupljenost 7. i 14. dana bila *Haemonchus* 6,5% i 6,5%, *Trichostrongylus* 45,5% i 39%, *Teladorsagia* 41% i 46,5% i *Chabertia* 7% i 8%, redom (Grafikon 14) u grupi tretiranoj uljem origana, odnosno *Haemonchus* 10% i 9%, *Trichostrongylus* 37% i 36,5%, *Teladorsagia* 46% i 47,5% i *Chabertia* 7% i 7%, redom u grupi tretiranoj suncokretovim uljem (Grafikon 15).



Grafikon 14. Procentualna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je primila etarsko ulje origana (drugo istraživanje)

Graph 14. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received origano essential oil (second study)



Grafikon 15. Procentualna zastupljenost rodova gastrointestinalnih nematoda ovaca pre i nakon tretmana, grupa koja je primila suncokretovo ulje (drugo istraživanje)

Graph 15. The percentage representation of sheep gastrointestinal nematodes genera before and after the treatment, group that received sunflower oil (second study)

6.0. DISKUSIJA

6.1. *In vitro* ispitivanje antihelmintičke efikasnosti

Ispitivanje antihelmintičke efikasnosti etarskih ulja zahteva upotrebu adekvatnih metoda. Pri tome treba imati u vidu da razvoj nekog novog antihelmintičkog preparata nije jednostavan i zahteva laboratorijska i terenska ispitivanja, kao i studije toksičnosti. U tom lancu, prve u nizu su *in vitro* studije koja uključuju ranije pomenute testove poput EHT, LDT, LWMT i AWMT. Ove studije, pri čemu je je test izleganja larvi (EHT) jedan od najčešće preporučenih i korišćenih testova [16,195], su veoma korisne i imaju za cilj inicijalnu ocenu antihelmintičkog potencijala neke nove aktivne supstance. Kod ispitivanja npr. različitih biljnih preparata su korisna i za selekciju onih koja pokazu najveću efikasnost, za dalja terenska ispitivanja. Prednosti ovih studija su brzina izvođenja, niska cena, visoka reproducibilnost, lakoća izvođenja i odsustvo eksperimentalnih životinja [153]. Zbog toga se često koriste u eksperimentalnim istraživanjima, ali je njihov rezultat potrebno potvrditi u kasnijim *in vivo* ispitivanjima.

Kada je u pitanju prvo istraživanje (Tabela 8, Grafikoni 1 i 2), većina ulja su pokazala veoma visok antihelmintički potencijal, među kojima se izdvajaju origano, morač, rtański čaj, čubar i timijan iz dva izvora. Naime, Svetsko udruženje za unapređenje veterinarske parazitologije (eng. *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, WAAVP) je postavilo kriterijume za *in vitro* ispitivanja antihelmintika, gde se ona sa efikasnošću više od 90% mogu smatrati efektivnim u kontroli nematoda [139,196,197]. S obzirom da su prethodno navedena ulja uspela maksimalno (100%) ili približno maksimalno (>95%) da inhibišu razvoj jaja nematoda u larve pri svim ispitivanim koncentracijama, mogu se smatrati izuzetno obećavajućim za dodatna ispitivanja. Po istom kriterijumu, efikasnim se mogu smatrati i kleka i pitoma nana koji su pri većini ispitivanih koncentracija inhibisale izleganje larvi za više od 90%, kao i hajdučka trava hemotip 1 i kombinacija linalool:estragol, gde su više koncentracije prouzrokovale ovakav efekat.

Drugi kriterijum prema kome se mogu porediti ulja jeste koncentracija potrebna da se inhibiše tačno 50% jaja za razvoj u L₁ oblik larvi (IC₅₀) i ovaj kriterijum se najčešće koristi u drugim istraživanjima, kao i kod poređenja efikasnosti različitih ulja. IC₅₀ u prvom istraživanju kod pojedinih ulja nije bilo moguće odrediti s obzirom na dobijene izuzetno visoke efikasnosti,

odnosno kod origana, morača i rtanjskog čaja usled pokazane maksimalne efikasnosti, kao ni kod timijana tip 1 usled neispoljavanja dozno-zavisnog efekta. Od ostalih ulja, posmatrajući IC_{50} parametar, najaktivnija su bila timijan tip 2 (0,098 mg/ml), čubar (0,187 mg/ml), pitoma nana (0,281 mg/ml) i kleka (0,495 mg/ml). Na kraju, prema trećem kriterijumu odnosno poređenju rezultata ulja sa kontrolama, može se zapaziti da se efekat već navedenih ulja origana, morača, rtanjskog čaja, čubra i timijana iz dva izvora nije značajno razlikovao od pozitivne kontrole ni pri jednoj od ispitanih koncentracija ($p > 0,05$), dok su rezultati za većinu ili polovinu koncentracija mente, kleke, hajdučke trave tip 1 i kombinacije linalool:estragol takođe bili slični tiabendazolu (0,025 mg/ml). Na kraju, sve ispitane koncentracije svih ulja u prvom istraživanju osim dve najniže za linalool:estragol su pokazale znatno veću ovicidnu aktivnost u poređenju sa negativnom kontrolom (3% Tween 80) ($p < 0,05$).

U drugom *in vitro* istraživanju (Tabela 9, Grafikoni 3 i 4), kao što je već navedeno, dobijeni rezultati se u izvesnoj meri razlikuju od prethodnog s obzirom na drugačiju postavku eksperimenta vezanih za koncentracije (dobijanje opadajućih koncentracija metodom razblaživanja umesto mikropipetama i uvođenje još dve niže koncentracije). Zbog toga je dozno-zavisni efekat kod ulja iz ovog istraživanja mnogo više izražen, pa se rezultati ova dva istraživanja u tom smislu ne mogu porediti već samo ulja unutar istog istraživanja. To se i može zapaziti na primeru origana i rtanjskog čaja, čiji isti uzorci su ispitani u oba navrata. Prema prvom kriterijumu postavljenom od strane WAAVP-a, najefikasnija su bila ulja origana, bosiljka i divlje nane čije tri najviše koncentracije su imale ovicidnu aktivnost višu od 90%. Etarsko ulje citriona je pri dve najviše koncentracije imalo navedenu aktivnost, a miloduh i pitoma nana pri najvišoj.

Prema drugom kriterijumu, situacija je nešto drugačija s obzirom da je najniža IC_{50} vrednost dobijena za ulje korijandera (0,04 mg/ml), a potom divlja nana (0,07 mg/ml), bosiljak (0,08 mg/ml) i origano (0,15 mg/ml). Visoku aktivnost prema ovom kriterijumu su pokazali i miloduh (0,19 mg/ml), lavanda (0,31 mg/ml) i pitoma nana (0,43 mg/ml), dok je najslabiji efekat pokazalo ulje limuna sa IC_{50} 2,52 mg/ml, s obzirom na lošu aktivnost pri koncentracijama 3,125 mg/ml i nižim. I po trećem kriterijumu su ulja origana, bosiljka i divlje nane bili najefikasniji s obzirom da su tri najviše koncentracije pokazale sličan efekat sa obe koncentracije pozitivne kontrole, odnosno tiabendazolom pri 0,025 i 0,0125 mg/ml ($p > 0,05$). Takođe, ulje limuna je

pokazalo sličan efekat pri dve, a miloduh i pitoma nana pri jednoj koncentraciji sa obe koncentracijama pozitivne kontrole, dok su najviše koncentracije žalfije i korijandera pokazale sličan efekat sa nižom koncentracijom pozitivne kontrole. Efekat svih koncentracija etarskih ulja origana, miloduha, korijandera, lavande i bosiljka je bio značajno veći ($p < 0,05$) od obe negativne kontrole, 3% Tweena 80 i destilovane vode, a efekat pitome nane, rtanjskog čaja, žalfije i slatke narandže od destilovane vode, dok im je efekat kod dve najniže koncentracije bio sličan sa efektom emulgatora 3% Tween-a 80 ($p > 0,05$). U svakom slučaju, može se zaključiti da je ovoidni efekat etarskog ulja origana bio najviši u oba istraživanja.

Ukoliko se ovi rezultati uporede sa do sada sprovedenim istraživanjima (Tabela 4), može se zaključiti da su etarska ulja iz naših istraživanja pokazala veoma visok *in vitro* antihelmintički potencijal. To pokazuju i izračunate IC_{50} vrednosti za timijan 2 i čubar, odnosno korijander, divlju nanu, bosiljak, origano i miloduh koje su među najnižima ikada dobijenim (ukazuje na izuzetno visoku aktivnost), a i prema drugim kriterijumima se navedena ulja iz naših istraživanja (uz morač) takođe izdvajaju. U svakom slučaju, doprinos naših istraživanja je i u tome što je antihelmintička efikasnost ispitivana na uzorcima fecesa dobijenih od životinja u uslovima prirodno mešane infekcije koja obuhvata nekoliko rodova gastrointestinalnih nematoda, što i jeste najčešći slučaj u praksi. Za razliku od toga, druga istraživanja su se uglavnom bazirala na ispitivanje efikasnost ulja samo protiv *H. contortus* (u uslovima veštačke infekcije), ali je korišćeno više različitih *in vitro* testova (Tabela 4).

Antihelmintička efikasnost etarskog ulja timijana protiv *H. contortus* je ispitana u istraživanju Ferreira i sar. (2016) [139]. Hemijski sastav je u najvećoj meri odgovarao timijanu 2 iz našeg istraživanja, s obzirom da su kao glavni sastojci u veoma sličnim procentima dominirali timol (50,22%), *p*-cimen (23,76%) i γ -terpinen (6,00%). Uzorak je slično pokazao visoku *in vitro* ovoidnu i larvicidnu aktivnost (EHT i LDT IC_{50} 0,436 i 0,0131 mg/ml), ali i aktivnost protiv pokretljivosti larvi (IC_{50} 0,338 mg/mL) i adulta (0% pokretljivost nakon 8h izlaganja koncentraciji od 0,5 mg/mL). Međutim, u tom istraživanju timijan nije pokazao *in vivo* efekat pri različitim dozama od 75, 150 i 300 mg/kg, a različit rezultat između tog i ovog istraživanja se, između ostalog, potencijalno može objasniti sa različitim hemijskim sastavom između timijana 1 koji je u našem slučaju korišćen za FECRT i timijana iz tog istraživanja.

Ovicidnu aktivnost origana protiv *H. contortus* su ispitali Jiménez-Penago i sar. (2021) [160]. Međutim, glavni sastojak je u ovom slučaju je bio eugenol (76,3%), dok je karvarkol bio zastupljen u veoma malom procentu (1,1%). Etarsko ulje je svakako pokazalo visoku ovicidnu aktivnost sa IC_{50} 0,17-0,28 $\mu\text{g/ml}$, kao i larvicidnu sa IC_{50} 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Dalje, kao što se može videti iz pregleda literature, etarsko ulje pitome nane je nekoliko puta ispitano i predstavljalo je jedno od najefikasnijih ulja. U istraživanju Katiki i sar. (2011) [136], pokazalo je visoku ovicidnu i larvicidnu aktivnost protiv *H. contortus* 95% i *Trichostrongylus spp.* 5% (IC_{50} 0,26 mg/ml u EHT i LDT), što je slična vrednost dobijena u našem prvom istraživanju, iako je hemijski sastav bio različit i više odgovara sastavu pitome nane iz drugog istraživanja (glavni sastojci u tom istraživanju su bili mentol 42,5%, menton 27,4% i eukaliptol 4,6%). U studiji Chagas i sar. (2018) [138], IC_{50} vrednost za pitomu nanu u EHT je bila nešto niža, 1,44 mg/ml, a larvicidna veoma dobra, 0,01 mg/ml protiv *H. contortus*, pri čemu je mentol takođe bio glavni sastojak, 30,5%.

Etarsko ulje korijandera je takođe često bilo predmet ispitivanja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Tako je dokazana njegova ovicidna (IC_{50} 0,97 mg/ml) i nešto slabija larvicidna (IC_{50} 2,32 mg/ml) aktivnost protiv *H. contortus* u istraživanju Macedo i sar. (2013) [147]. Uzorak ulja korijandera je u našem istraživanju pokazao višu ovicidnu aktivnost, iako je hemijski sastav korijandera u tom istraživanju (beta linalool 73,21%, kamfor 4,25% terpinen 3,10%) bio veoma sličan sa našim. U istraživanju Helal i sar. (2020) [157] je dokazana i različita inhibitorna aktivnost korijandera na pokretljivost larvi nematoda u zavisnosti od vrste, sa IC_{50} od 0,11% protiv *T. circumcinta* do 3,31% protiv *C. oncophora* (% u finalnoj koncentraciji), dok je kod mešane infekcije IC_{50} vrednost bila 0,22%.

U pomenutom istraživanju Ferreira i sar. (2018) [153], etarsko ulje lavande, čiji je glavni sastojak za razliku od naše lavande bio limonen (56,37%), je pokazalo ovicidnu (IC_{50} 0,316 mg/ml, vrednost veoma slična dobijenoj u našem istraživanju), larvicidnu (IC_{50} 0,280 mg/ml) i 100% inhibitornu aktivnost protiv adulta *H. contortus* 14h nakon izlaganja pri koncentraciji 0,5 mg/ml. Sa druge strane, etarsko ulje slatke narandže veoma sličnog sastava kao u našem istraživanju (limonen 96%) je pokazalo još višu ovicidnu aktivnost u poređenju sa našim rezultatima (IC_{50} i IC_{90} 0,27 odnosno 0,99 mg/ml), a takođe je dokazana i larvicidna aktivnost u

određenoj meri (IC₅₀ i IC₉₀ 0,97 odnosno 2,32 mg/ml) protiv *H. contortus*, u ispitivanju Gaínza i sar. (2015) [151].

Iako biljni ekstrakti ne predstavljaju isto što i etarska ulja (razlike se pre svega ogledaju u načinu dobijanja proizvoda [198]), takođe su često bila predmet istraživanja u smislu antihelmintičke efikasnosti protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Tako je ispitana efikasnost vodenog (94,44%) i alkoholnog (88,88%) ekstrakta hajdučke trave u istraživanju Tariq i sar. (2008) [169]. Oba ekstrakta su pokazala značajan *in vitro* efekat protiv *H. contortus* inhibišući njegovu pokretljivost (LC₅₀ 0,05 i 0,11 mg/ml), a još značajnije je što je doza od 2 g/kg prouzrokovala *in vivo* smanjenje od 88,40% (vodeni) i 76,53% (alkoholni) broja jaja nematoda u fecesu, 15. dana nakon tretmana kod ovaca sa mešanom infekcijom. Ekstrakt čubra je u istraživanju Urban i sar. (2008) [173] pokazao ovoidni potencijal sa efikasnošću od 68,74-90,69% za koncentracije 62,5 - 2000 µg/ml. Poređenja radi, u istom istraživanju ekstrakt timijana je pokazao nešto niži efekat od 58,14-93,11% za iste koncentracije, ali su oba ekstrakta bila jedna od najefikasnijih među 16 testiranih. U istraživanju iz 2014. godine istih autora [174], ekstrakt čubra je pokazao visoku aktivnost u vidu inhibicije *C. ovina* sa IC₅₀ (mg/ml) od 1,15, 1,26 i <0,25, 6h, 24h i 38h nakon ekspozicije, pri čemu je opet bio među najefikasnijim ekstraktima, a timijan je imao sledeće vrednosti: >2, 1,82 i <0,25 posmatrano u istim vremenskim tačkama.

U ispitivanju Váradyová i sar. (2018) [190], metanolni ekstrakt miloduha pri koncentraciji 1024 µg/ml nije pokazao značajnu ovoidnu aktivnost protiv *H. contortus* (3,7%), kao ni vodeni pri koncentraciji 1563 µg/ml (8,3%), a sličan rezultat je dobijen i za morač (18,9% i 8,7% za metanolni i vodeni ekstrakt testiranim pri navedenim koncentracijama). U poređenju sa ovim istraživanjem, etarska ulja obe biljke su u našim istraživanjima pokazala znatno višu ovoidnu aktivnost, pri čemu miloduh 42,7-91,3% u zavisnosti od koncentracije, dok je morač bio maksimalno efikasan pri svim testiranim koncentracijama. Sa druge strane, u pomenutom istraživanju ekstrakti su pokazali višu larvicidnu aktivnost u poređenju sa ovoidnom (miloduh - IC₅₀ 998 i 216 µg/ml i morač - 786 i 263 µg/ml). Ipak, ove razlike govore u prilog varijacijama u efikasnosti između korišćenja etarskih ulja i ekstrakata od određenih biljaka, kao i varijacijama između samih ekstrakata (metanolni i vodeni).

6.2. *In vivo* ispitivanje antihelmintičke efikasnosti

Za razliku od laboratorijskih *in vitro* testova, *in vivo* testovi se koriste za ispitivanje aktivnih supstanci u terenskim uslovima, tj. konkretno na životinjama, odnosno u slučaju antihelmintičkih ispitivanja kod jedinki prirodno ili veštački zaraženih parazitima. U tom smislu predstavljaju najpouzdanije indikatore antihelmintičke efikasnosti različitih supstanci uključujući i biljne formulacije [16,47,64], te pružaju najjasniju sliku o efikasnosti i mogućnosti upotrebe etarskih ulja u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Iz tog razloga, bez obzira na to što mogu biti intenzivni, zahtevni i skupi, a pri tome zahtevaju i životinje za testiranje pa se ređe primenjuju u poređenju sa *in vitro* testovima, ovi testovi se sprovode kao sledeći korak u dokazivanju efikasnosti i razvoja nekog preparata.

Ukoliko se poredе istraživanja iz 2019. i 2021., vrednosti EPG-a govore u prilog tome da su životinje iz drugog istraživanja bile više inficirane, iako je i u jednom i u drugom istraživanju u pitanju prirodna infekcija, a korišćene su iste farme. Takođe se mogu zapaziti vrlo visoka odstupanja od prosečnih vrednosti (standardna devijacija), koja u nekim slučajevima čak prevazilaze prosečne vrednosti. To sugerise na veoma visoke razlike u stepenu inficiranosti između pojedinih životinja. Ovaj rezultat nije neobičan imajući u vidu činjenicu da su gastrointestinalne nematode kod malih preživara visoke agregirane i prekomerno rasute unutar domaćina, prilikom čega se veliki deo populacije parazita prisutan u stadu (oko 80%) nalazi unutar svega 20-30% domaćina [31,76]. Sa druge strane, to takođe sugerise i na značaj ciljanih selektivnih tretmana [75] koji uključuju tretiranje samo onih životinje kojima je potreban tretman usled zdravstvenih i produktivnih razloga, ili sa aspekta njihove dobrobiti, a sve u cilju racionalne upotrebe lekova.

Sva ulja testirana *in vivo* u našim istraživanjama su pokazala određen stepen redukcije broja jaja nematoda u fecesu životinja nakon tretmana. U prvom istraživanju, pri dozi od 100 mg/kg i peroralnom načinu davanja u usnu duplju uz pomoć šprica, postignute efikasnosti su iznosile 25,23% (timijan, 7. dana) i 25,90% (linalool:estragol, 14. dana) (Tabela 10, Grafikoni 5 i 6), a u drugom, pri dozi od 150 mg/kg i peroralnom davanju uz pomoć tube direktno u rumen, 33,0% (rtanjski čaj), 46,04% (pitoma nana) i 60,13% (origano) 14. dana nakon tretmana (Tabela 11, Grafikoni 7-9), što sugerise na višu efikasnost ovih ulja, ovakvog načina primene uz nešto

višu dozu. Naime, aplikacija direktno u burag je omogućila izbegavanje interakcije aktivnih sastojaka etarskih ulja sa različitim materijama prisutnim u gornjim partijama digestivnog trakta, a samim tim i njihovu inaktivaciju. Sa druge strane, to je omogućilo veću zastupljenost ulja u formulaciji sa suncokretovim uljem (1:4,5 u poređenju sa 1:9 kod prvog istraživanja) koje je korišćeno u cilju zaštite sluzokože, što je sve zajedno dovelo do povećanja efikasnosti. Kao što je već rečeno, navedeni stepeni redukcije su bili još veći, ali su korigovani uz pomoć formule koja eliminiše uticaj nekih drugih faktora uz pomoć vrednosti dobijene za negativne kontrole u oba istraživanja. Takođe, efikasnost je bila veća znatno viša na drugoj farmi, usled vezanog načina držanja koji je omogućio precizniju aplikaciju.

Ukoliko se ovi rezultati uporede sa ostalim *in vivo* ispitivanjima (Tabela 5), zapaže se da je efikasnost u našim istraživanjima, pogotovo kada su u pitanju origano i menta, najviša postignuta pri testiranoj dozi, ali i generalno. To još više dobija na značaju ukoliko se ima u vidu da su ulja u našim istraživanjima aplikovana samo jednom, dok su u većini drugih studija ulja aplikovana peroralno u više navrata (npr. tri dana uzastopno) ili čak i duže putem hrane i vode. Ipak, treba naglasiti da je veoma ograničen broj *in vivo* ispitivanja do sada sproveden, zbog već spomenutih razloga. Takođe se zapaža da je efikasnost ulja generalno niža u terenskim ispitivanjima u poređenju sa laboratorijskim (slučaj i kod naših rezultata), a u nekim studijama je bilo i ulja koja nisu pokazala nikakav efekat, iako su pre toga bila efikasna u *in vitro* testovima. To se može objasniti mnogobrojnim faktorima koji mogu uticati na efikasnost *in vivo* primenjenih formulacija, a pre svega anatomsko-fiziološkim karakteristikama digestivnog trakta preživara [199]. Naime, digestivni trakt kod preživara je znatno složeniji u poređenju sa monogastričnim životinjama, te poseduje brojne materije sa kojima aktivne supstance mogu doći u dodir i na taj način dolazi do njihove inaktivacije. Za razliku od toga, različita *in vitro* ispitivanja oslikavaju direktan kontakt aktivnih sastojaka sa različitim stadijumima parazita, te na taj način isključuju različite faktore koji utiču na *in vivo* efikasnost. Dalje, etarska ulja poseduju neke negativne osobine poput nestabilnosti, s obzirom da su sklona isparavanju i degradaciji [200][201], te i navedeno može doprineti delimičnoj ili totalnoj inaktivaciji njihovih aktivnih sastojaka u organizmu životinja, pre njihovog dospevanja na ciljno mesto dejstva u abomazusu ili crevima. Iz ovih razloga je *in vivo* efikasnost etarskih ulja još uvek najčešće niža u poređenju sa komercijalnim preparatima [196].

Postoji više različitih načina za prevazilaženje ovih problema. S obzirom da nakon peroralne primene etarska ulja kod preživara treba da prođu dug put do mesta dejstva, neki istraživači predlažu drugačiji način primene kao što je npr. upotreba blokova za lizanje koji mogu omogućiti eventualni dugotrajniji efekat [202]. Kada je u pitanju doza, u našim ispitivanjima nisu zabeleženi nikakvi toksični efekti, što pruža mogućnost povećanja doze u cilju eventualnog povećanja efikasnosti, pogotovo kada su u pitanju origano ili menta koji su i pri relativno niskim dozama (za botaničke antihelmintike) pokazali dobru efikasnost. Dalje, otvara se i mogućnost višestruke aplikacije ulja iz naših istraživanja, npr. sukcesivno tokom tri dana ili eventualnu dugotrajniju primenu putem hrane i vode. Na kraju, savremene tehnike inkapsulacije poput nanoemulzije [203] bi mogle omogućiti zaštitu aktivnih sastojaka etarskih ulja od evaporacije i degradacije i na taj način omogućiti njihovu bolju bioraspoloživost u organizmu životinja i višu *in vivo* antihelmintičku efikasnost. Sa druge strane, ove tehnike su pogodne i za kontrolisano oslobađanje aktivnih sastojaka, kao i za redukciju neprijatnog mirisa i ukusa etarskih ulja, što je vrlo značajno prilikom peroralne primene ili primene u hrani ili vodi za životinje [134,201,204]. U svakom slučaju, postignuta efikasnost u našim istraživanjima je dovoljna za korišćenje testiranih etarskih ulja kao vrednog dodatka u budućoj integrisanoj kontroli gastrointestinalnih nematoda kod preživara u cilju smanjenja upotrebe komercijalnih preparata, što je vrlo važno sa aspekta borbe protiv rezistencije.

Potencijalni značaj inkapsulacije se može videti iz sledećih primera. U istraživanju Mesiquita i sar. (2013) [205], emulzifikovano ulje eukaliptusa (*Eucalyptus staigeriana*), aplikovano peroralno ovcama u dozi 365 mg/kg jednokratno, smanjilo je ukupan broj nematoda kod ovaca u gastrointestinalnom traktu za 60,79%, što je bilo efikasnije od ivermektina koji je smanjio za 48,70%. Štaviše, redukcija abomazalnih nematoda je bila znatno veća u grupi tretiranoj sa etarskim uljem u poređenju sa ivermektinom (83,75% u poređenju sa 35,0%). Efekat nanoemulzije istog ulja primenjenog u dozi od 250 mg/kg jednokratno u istraživanju Ribeiro i sar. (2017) [206] je bio sličan ($p > 0,05$) sa levamizolom u 8 od 10 posmatranih dana. Dalje u ispitivanju Katiki i sar. (2019) [207], pri aplikaciji 250 mg/kg inkapsulisane formulacije anetol:karvon davane u hrani jaganjcima tokom 45 dana, zabeleženo je značajno smanjenje broja jaja nematoda u fecesu 43. i 45. dana, pri čemu je efekat pripisan smanjenju veličine mužjaka i smanjenom fekunditetu ženki nematoda.

Ako se uporede čista i inkapsulisana ulja, nanoinkapsulisano ulje *E. citriodora* je pokazalo viši ovicidni (IC_{50} 0,5 u poređenju sa 1,3 mg/ml) i sličan larvicidni (IC_{50} oba 1,7 mg/ml), ali nešto manji *in vivo* efekat u testu redukcije broja fekalnih jaja pri dozi od 250 mg/kg (40,5% u poređenju sa 55,9%, 10. dana posle tretmana), u ispitivanju Ribeiro i sar. (2014) [148]. Međutim, u istraživanju Macedo i sar. (2019) [155], nanoemulzija limunske trave (*Cymbopogon citratus*) (51,7%) je pokazala jasno bolji efekat u poređenju sa čistim uljem (19,6%) 8. dana nakon tretmana, prilikom čega su formulacije date u dozama 450 i 500 mg/kg, redom, a u isto vreme je pokazalo i nižu toksičnost. U većini ovih istraživanja je kao nosač korišćen hitozan. Međutim, potreban je veći broj ovakvih ispitivanja da se dokaže jasan pozitivan uticaj inkapsulacije na upotrebu etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca.

6.3. Bioaktivne supstance od značaja za antihelmintičku efikasnost

Farmakološke aktivnosti etarskih ulja poput antihelmintičke potiču od njihovog složenog hemijskog sastava i različitih bioaktivnih jedinjenja. To uglavnom podrazumeva glavno jedinjenje [104], ili 2-3 najzastupljenija, iako sva jedinjenja koja ulaze u sastav mogu biti važna za dejstvo zbog sinergističkog efekta. Sastojci etarskih ulja se mogu značajno razlikovati po stepeni antihelmintičke aktivnosti, kao što je i pokazano u pojedinim istraživanjima [142]. U našem prvom istraživanju (Tabela 6), visoka aktivnost etarskih ulja je bila povezana sa sastojcima poput karvakrola, anetola, timola, p-cimena i γ -terpinena, imajući u vidu da su se ulja u čiji sastav ulaze u visokim procentima pokazala kao najefikasnija (origano, timijan, morač, rtanjski čaj i čubar). U studiji Katiki i sar. (2017) [142] su uz cinamaldehyd (glavni sastojak etarskog ulja cimeta) i karvon, najvišu ovicidnu aktivnost pokazali upravo anetol, karvakrol i timol sa IC_{50} vrednostima od 0,07, 0,11 i 0,13, redom. Andre i sar. (2016) [163] su takođe dokazali visoku *in vitro* ovicidnu (IC_{50} 0,17 mg/ml) i larvicidnu (IC_{50} 0,2 mg/ml) aktivnost karvakrola, a njegov acetilovani derivat, karvakrol-acetat, je u *in vivo* istraživanju redukovao broj jaja nematoda u fecesu životinja za 35,4% i 65,9%, 8. i 16. dana posle peroralnog tretmana pri dozi 250 mg/kg, jednokratno. Isti istraživači su dokazali i visoku *in vitro* antihelmintičku aktivnost timola, nešto nižu u poređenju sa karvakrolom, sa ovicidnom i larvicidnom aktivnošću od IC_{50} 0,8 i 1,0 mg/ml, redom, ali je acetilovani derivat timol-acetat u *in vivo* istraživanju imao efikasnost od 35,4 i 76,2%, pri istoj dozi i načinu primene kao i karvakrol-acetat (Andre i sar.,

2017) [164]. Sa druge strane, ovicidni efekat anetola je dokazan u istraživanju Camurca-Vasconcelos (2007) [143] sa IC_{50} od 0,69 mg/ml, dok je larvicidni efekat bio nešto slabiji, IC_{50} 2,11 mg/ml.

U drugom istraživanju (Tabela 7), pored origana sa već istaknutim hemijskim sastavom, treba istaći značaj mentola i mentona kao značajnih sastojaka pitome i u određenoj meri divlje nane, kod koje je karvon kao glavni sastojak bio zastupljen u visokom procentu. Kada je u pitanju miloduh, zapaža se dominacija cis i trans pinokamfon i u određenoj meri limonena, sastojka koji je pronađen kod svih ispitanih ulja i glavnog sastojka limuna i slatke narandže. Kod korijandera, linalool je kao glavni sastojak bio visoko zastupljen (84,5%), znatno više npr. nego kod lavande kod koje je takođe bio glavni sastojak (37,5%), što sugerise na značaj toga na glavni sastojak bude zastupljen u odgovarajućem procentima, imajući u vidu da je korijander pokazao bolju efikasnost od lavande. U istraživanju Katiki i sar. (2017) [142], zapaža se da je karvon bio među antihelmintički najaktivnijim sastojcima sa ovicidnom efikasnošću IC_{50} od 0,085 mg/ml. U istom istraživanju je dokazan i ovicidni potencijal linaloola sa IC_{50} od 0,29 mg/ml, ali je zato limonen pokazao slab efekat. Iako čist mentol nije pokazao *in vivo* efekat u istraživanju Chagas i sar. (2018) [138], ulja u čiji sastav je ušao kao glavni sastojak, npr. *Mentha arvensis* (86,7%) je uz veoma visok *in vitro* (IC_{50} od 0,10 i 0,015 mg/ml u EHT i LDT, redom), pokazalo i visok *in vivo* efekat pri dozi 200 mg/kg protiv *H. contortus* i *Trichostrongylus* spp. sa redukcijom EPG u fecesu životinja od 61,6% (1. dan), 48,1% (14. dan) i 44,9% (21. dan nakon tretmana). Ovaj rezultat ukazuje na značaj i ostalih jedinjenja pored glavnog sastojka za antihelmintičku aktivnost ulja (sinergizam sastojaka). U navedenom istraživanju, odsustvo *in vivo* efekta samog mentola je objašnjeno ograničenoj bioraspoloživosti terpena u organizmu životinja, kao i činjenicom da se mentol eliminiše u vidu glukuronida putem urina.

Rezultati dobijeni u prvom istraživanju takođe ukazuju na činjenicu da nivo efikasnosti etarskih ulja ne zavisi od broja prisutnih jedinjenja. Tako je, na primer, u prvom istraživanju manji broj identifikovanih jedinjenja bio povezan sa visoko efikasnim etarskim uljima (origano - 10, morač - 12 i čubar - 13) u suprotnosti sa velikim brojem jedinjenja koji je odgovarao niže efikasnim uljima (smilje - 30, hajdučka trava 1 - 28, hajdučka trava 2 - 27). Nasuprot tome, u drugom istraživanju su etarska ulja sa visokim brojem identifikovanih jedinjenja (npr. divlja nana 34, miloduh 35) bila efikasnija od onih sa manjim brojem (limun - 10, slatka narandža 8). Čini se

ipak da je od broja jedinjenja važnije prisustvo i zastupljenost pojedinih, kao i zastupljenost glavnog jedinjenja, što je već navedeno kod poređenja efikasnosti ulja korijandera i lavande. Naime, etarska ulja kod kojih je osnovni sastojak je bio zastupljen u visokom procentu (linalool kod korijandera 84,5%, karvakrol kod origana 76,2%, anetol kod morača 73,4%, karvon kod divlje nane 64,5%, timol kod timijana 2 52,2% i cis-pinokmafon kod miloduha 47,6%) su u sprovedenim istraživanjima i pokazala najvišu efikasnost, što je verovatno posledica toga da je potrebna određena količina glavnog sastojaka sa određenim mehanizmom delovanja koji će doprineti visokoj aktivnosti etarskog ulja. To se i slaže sa pomenutim navodom da su farmakološke osobine ulja povezane sa osnovnim sastojkom [111]. Ipak, prisustvo ostalih jedinjenja je takođe poželjno radi sinergističkog efekta i povećanja ukupne aktivnosti kroz različite mehanizme dejstva. Zbog toga, cela etarska ulja obično pokazuju veću efikasnost u poređenju sa njihovim izolovanim jedinjenjima kada se aplikuju samostalno [138,139,143].

U pregledu literature su pomenuti brojni faktori koji mogu uticati na hemijski sastav etarskih ulja a samim tim i na njihove farmakološke osobine, što važi i za ona dobijena iz iste biljne vrste. Tu spadaju brojni egzogeni i endogeni, odnosno biotički i abiotički faktori [112,116]. U našem istraživanju je najbolji primer za navedeno hajdučka trava, gde su dva ispitana tipa pokazala jasne razlike u hemijskom sastavu. Iako su je postojao određen broj zajedničkih jedinjenja (negde oko 50%), njihova procentualna zastupljenost se u velikoj meri razlikovala, što je sve dovelo do razlika u njihovoj oxicidnoj aktivnosti protiv nematoda, koja je bila značajna ($p < 0,05$) za većinu ispitanih koncentracija. Pored pomenutih faktora, ove razlike se mogu pripisati geografskim (poreklo tipa 1 sa Radana, a tipa 2 sa Golije), ali pre svega drugim biljnim varijetetima korišćenim za izolaciju etarskih ulja. U slučaju timijana korišćenog iz dva izvora se takođe mogu primetiti značajne razlike u hemijskom sastavu koje su dovele do određenih razlika i u njihovoj efikasnosti, mada su oba uzorka bila veoma efikasna. U ovom slučaju se razlike mogu prevashodno pripisati drugačijem geografskom poreklu korišćenih izolata (jedan je iz Srbije, a drugi iz Francuske), što samim tim podrazumeva i nešto drugačije uslove u kojima biljke rastu, odnosno klimat i mikroklimat, a koji utiču na hemijski sastav. Na kraju, uzorci mente iz dva istraživanja su bili različiti odnosno nabavljeni iz drugih izvora, sa očiglednim razlikama u hemijskom sastavu, što je dovelo i do drugačijeg *in vitro* efekta. U istraživanju Camurça-Vasconcelos i sar. (2007) [143], ispitana su dva uzorka etarskog ulja *Croton zehneri* dobijena u dva različita vremenska intervala, sa određenim varijacijama u

hemijskom sastavu (uzorak 1 glavni sastojci anetol 39,34%, anisaldehyd 20,17%, estragol 14,95%, ukupan broj identifikovanih jedinjenja 15, a uzorak 2 anetol 63,88%, estragol 21,84%, germakren B 5,07%, broj identifikovanih jedinjenja 13). Ove razlike su dovele i do nešto različitog ovicidnog (IC_{50} vrednosti 0,55 i 0,74, redom) i larvicidnog (IC_{50} vrednosti 1,17 i 1,37, redom) potencijala protiv *H. contortus*, što potvrđuje gore navedene tvrdnje.

Sve napomenuto govori u prilog izuzetnom značaju određivanja prisutnih sastojaka ulja za istraživanja njihove efikasnosti, te gasna hromatografija i masena spektrometrija koje su preporučene i najčešće koriste za analizu hemijskog sastava etarskih ulja [208,209] predstavljaju neizostavni deo istraživanja koja imaju za cilj razvoj preparata za upotrebu u veterinarskoj medicini. Dakle, zaključci izvedeni iz ovog i sličnih istraživanja sugerišu da se pre same selekcije biljnih etarskih ulja trebaju raditi hemijske analize, odnosno da one mogu ukazati na ulja sa najboljim potencijalom za ispitivanja, čime se može značajno uštedeti i vreme i novac. Međutim, jasno je da za konstantnu i širu upotrebu etarskih ulja u praksi potrebna stalnost njihovog sastava, a koja bi dovela i do konstantne efikasnosti. U tom smislu problem varijabilnosti sastava a samim tim i aktivnosti etarskih ulja bi mogao biti rešen na sledeće načine: 1) da se izolacija nekog ulja sa dokazanim efektom vrši pod istim uslovima (biljna vrsta i varijetet, sezona, geografsko podneblje, klimat i mikroklimat, deo biljka i njena starost, način izolacije) ili 2) da se simulira njegov sastav izolacijom jedinjenja u odgovarajućim procentima i razvojem odgovarajuće formulacije. Još jedna od opcija jeste pravljenje različitih kombinacija izolovanih dokazano efikasnih aktivnih sastojaka, kao što je rađeno u studiji Katiki i sar. (2017) [142], gde su ispitane različite binarne, tercijarne i kvaternarne kombinacije poput cinamaldehyd:karvakrol (1:1), anetol:karvon (1:1), cinamaldehyd+karvakrol+anetol (1:1:1) i anetol+karvon+cinamaldehyd+karvon (1:1:1:1) sa vrlo visokim pokazanim efektom u vidu IC_{50} vrednostima u EHT od 0,012, 0,013, 0,037 i 0,02 mg/ml, redom protiv *H. contortus*. U našem istraživanju, binarna kombinacija linalool:estragol (0,14:0,86) je pokazala dobar efekat protiv gastrointestinalnih nematoda sa IC_{50} od 0,98 mg/ml, ali je čitavo ulje bosiljka bilo efikasnije sa IC_{50} od 0,08 mg/mL.

6.4. Studije toksičnosti

Kao što je već navedeno, rezultati sprovedenih studija toksičnosti u ovom istraživanju su pokazale bezbednost primenene *in vivo* ispitivanih formulacija. Naime, primena ispitanih ulja nije dovela do neželjenih reakcija zapaženih na kliničkom pregledu tretiranih životinja. Dalje, imajući u vidu da se vrednosti svih ispitivanih hematoloških parametara u drugom istraživanju u tretiranim grupama nisu značajno promenile nakon tretmana, kao i to da se nisu značajno razlikovale od kontrolnih grupa ($p > 0,05$), može se zaključiti da nije bilo toksičnih efekata ni kada su u pitanju parametri krvi (Tabela 13). Štaviše, na prvoj farmi primena rtajskog čaja i pitome nane je dovela do izvesnog ublažavanja simptoma anemije prouzrokovane nematodama koje sisaju krv poput *H. contortus* (Tabela 12). Kada je u pitanju funkcija jetre, primena niti jednog od ispitanih ulja nije dovela do povećane aktivnosti enzima jetre ($p > 0,05$), koja sugeriše na oštećenje jetre. Naime, vrednosti AST se nisu značajno menjale ($p > 0,05$) niti u jednoj ispitanoj grupi osim smanjenja u grupi koja je tretirana uljem pitome nane ($p < 0,05$), a vrednosti GGT su se, osim u grupi koja je primila suncokretovo ulje, u svim ispitanim grupama uključujući i albendazol statistički značajno smanjile ($p < 0,05$). Na kraju, odsustvo bilo kakvih promena u vrednostima kreatinina i ureje, bilo u odnosu na period pre tretmana, ili u odnosu na kontrole ($p > 0,05$), sugeriše na zaključak da primena ispitanih formulacija nije dovela ni do oštećenja funkcije bubrega (Tabela 14). Dobijeni rezultati ukazuju da bi se etarska ulja origana, pitome nane i rtajskog čaja mogla koristiti u praksi sa aspekta sigurnosti primene kod ovaca, barem kada su u pitanju kratkoročni efekti. Međutim, ostaje pitanje da li bi njihova dugoročna aplikacija mogla prouzrokovati neke negativne efekte, što bi mogla biti tema posebnog istraživanja, kao i određivanje LC_{50} i LC_{99} parametara.

Iako veoma bitne sa aspekta bezbednosti i uopšte mogućnosti primene određenih formulacija, studije toksičnosti su usled zahtevnosti (potrebne životinje, cena itd.) najređe sprovedene u ispitivanjima koja se tiču primene etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca, barem na samim životinjama domaćinima. U istraživanju Katiki i sar. (2012) [165], životinje su tretirane etarskim uljem limunske trave (*Cymbopogon schoenanthus*) u dozama 180 i 360 mg/kg tokom tri dana, peroralno putem šprica. Parametri funkcije jetre koji su se ispitivali su pored AST i GGT uključivali i AP i albumin, a funkcije bubrega kreatinin i ureja kao i u našem

istraživanju. Rezultati su pokazali odsustvo statistički značajne razlike u vrednostima pomenutih parametara 5., 10. i 20. dana nakon aplikacije ulja. Međutim, kod jedne životinje tretirane nižom dozom su se pojavili znaci hepatične insuficijencije (povećane aktivnosti enzima i žutica). S obzirom da je u pitanju sporadičan slučaj čija veza sa aplikacijom ulja nije dokazana, autori su zaključili da je ulje limunske trave primenjeno na naveden način bezbedno za upotrebu kod ovaca. U istraživanju istih autora iz 2019. godine [207], ispitana je primena 25 i 50 mg/kg inkapsulisane kombinacije anetola i karvona u lipidnom matriksu tokom 45 dana u hrani za životinje, pri čemu su ispitani hematološki parametri, kao i parametri funkcije jetre i bubrega, slično kao i u našim istraživanjima. Takođe, nisu dokazani neželjeni efekti primenjenih formulacija na hematološke parametre, osim što su 45. dana posmatranja inficirane životinje imale niže vrednosti hemoglobina i hematokrita u poređenju sa kontrolnim, što se može pripisati infekciji. Takođe, pri većoj testiranoj dozi a slično našim rezultatima, vrednosti ureje, kreatinina i AST se nisu značajno menjale dok su vrednosti GGT bile ispod referentnih vrednosti, pa su autori zaključili da primena formulacije nema negativnih efekata na funkciju jetre i bubrega.

U većini drugih istraživanja, studije toksičnosti primene etarskih ulja su ispitane na miševima. Tako je u slučaju Andre i sar. (2016 i 2017) [163,164], dobijena LD₅₀ doza određena za karvakrol i timol iznosila 919 i 1350,9 mg/kg, a za njihove acetilovane derivate karvakrol-acetat (CA) i timol-acetat (TA) 1544,4 i 4144,4 mg/kg, redom. S obzirom na činjenicu da se peroralno primenjene supstance iznad 1000 mg/kg u ovakvim istraživanjima smatraju bezbednim ili nisko toksičnim [210], timol, CA i TA se mogu smatrati sigurnim, dok se dodatne studije trebaju sprovesti za karvakrol. U istraživanju Ribeiro i sar. (2014) [148], etarsko ulje eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora*) je klasifikovano kao bezbedno s obzirom na dobijenu LD₅₀ vrednost od 2643,0 mg/kg kod miševa. Peroralna primena etarskog ulja majorana (*Origanum majorana*) pri različitim dozama od 1000-5000 mg/kg nije prouzrokovala znake toksičnosti niti dovela do fatalnog efekta kod nijednog od tretiranih miševa tokom perioda posmatranja od 24 sata (Abidi i sar. 2020 [156]). Prema Chagas i sar. (2018) [138], neki sastojci etarskih ulja poput mentola imaju veoma nisku akutnu oralnu toksičnost (LD₅₀ > 2000 mg/kg). Sva ova istraživanja i navodi ukazuju na nisku toksičnost etarskih ulja i njihovih sastojaka za životinje.

6.5. Koprokultura

Kada su u pitanju rezultati koprokulture, određeno je prisustvo četiri roda gastrointestinalnih nematoda ovaca u na ispitivanim farmama. Ukupno, pre primene bilo kojih tretmana, njihova zastupljenost je bila *Haemonchus* 53%, *Trichostrongylus* 29,5%, *Teladorsagia* 14,5% i *Chabertia* 3% (prvo istraživanje), odnosno *Haemonchus* 10,5%, *Trichostrongylus* 47,5%, *Teladorsagia* 38% i *Chabertia* 4% (drugo istraživanje). Nakon tretmana su zapažene neke promene u ovim procentima, pri čemu je u većini grupa u prvom istraživanju zabeleženo opadanje zastupljenosti roda *Haemonchus* koje je u ukupnom procentu bilo značajno 7. dana, kao i porast zastupljenosti rodova *Trichostrongylus* i *Teladorsagia* (Grafikoni 10-13). U drugom istraživanju je u grupi tretiranoj uljem origana, ali i suncokretovim uljem zabeležen isti trend kao u prvom, osim opadanja i zastupljenosti roda *Trichostrongylus* (Grafikoni 14 i 15). Ove promene pojedinačno nisu bile statistički značajne, što sugerise na činjenicu da nijedan od korišćenih tretmana nije bio specifičan samo za jedan rod ili je ova specifičnost izražena u manjoj meri. Međutim, ukoliko se rezultati u grupama tretiranim uljima koje su praćene uporede se negativnom kontrolom, takođe se zapaža tda su ulja najviše delovala na rod *Haemonchus*.

U istraživanju Macedo i sar. (2019) [150], gde je ispitana efikasnost čistog i inkapsulisanog etarskog ulja limunske trave (*Cymbopogon citratus*), a koprokultura je sprovedena pre i 15. dana nakon tretmana, zapažen je sličan trend smanjenja procenta roda *Hamonchus* uz porast roda *Trichostrongylus* i trećeg identifikovanog roda *Oesophagostomum*. Pri tome su ove promene bile izraženije u grupi ovaca tretiranoj sa inkapsulisanim uljem (pad procenta *Haemonchus*-a sa 80 na 64%, a porast *Trichostrongylus*-a sa 19 na 27%), koje je ujedno pokazalo i višu ukupnu efikasnost, dok u grupi tretiranoj negativnom kontrolom nisu zabeležene praktično nikakve promene kada su ovi rodovi u pitanju. Zanimljivo, u istom istraživanju je na kontrolisanom testu posmatrana efikasnost primenjenih formulacija odvojeno protiv *H. contortus* i *T. colubriformis*, uz znatno bolji rezultat protiv prve vrste (kod čistog ulja 66,4% naspram 38,4%, a kod inkapsulisanog čak 83,1% naspram 27,9%). Sličan rezultat je dobijen i u istraživanju Camurça-Vasconcelos i sar. (2008) [162], kada je na kontrolisanom testu etarsko ulje egzotične biljke *Lippia sidoides*, primenjeno peroralno u dozi 283 mg/kg tokom 5 dana, dovelo do redukcije broja *Haemonchus* spp. za 56,9% u poređenju sa *Trichostrongylus* spp., 39,3%.

Imajući u vidu ove rezultate, kao i činjenicu da je efikasnost etarskih ulja uglavnom ispitivana samo protiv *H. contortus*, ipak se može zaključiti da postoje određene razlike u njihovoj efikasnosti u zavisnosti od roda gastrointestinalnih nematoda. Ove razlike bi se mogle objasniti jednostavnom činjenicom da rod *H. contortus* parazitira u abomazumu, gde je bioraspoloživost aktivnih sastojaka etarskih ulja veća u poređenju sa tankim crevom gde parazitira najvećih broj *Trichostrongylus* vrsta, a kao posledica navedenih osobina etarskih ulja poput nestabilnost i parcijalne inaktivacije njihovih sastojaka duž digestivnog trakta.

6.6. Prednosti i nedostaci antihelmintičke primene etarskih ulja

Poznavanje mehanizma dejstva etarskih ulja odnosno njihovih aktivnih sastojaka je od praktične važnosti za kontrolu nematoda s obzirom da može pružiti važne informacije o njihovom dejstvu, kao i o pronalasku najpogodnijih formulacija za upotrebu u praksi [211]. Međutim, sadašnje razumevanje mehanizma dejstva je još uvek nepotpuno usled čega je primetan porast broja istraživanja i na ovom polju. Do sada je dokazan ili predložen određen broj mehanizama nematocidne aktivnosti etarskih ulja, što uključuje ometanje nervnog sistema parazita, inhibiciju aktivnosti acetil-holin esteraze, interferenciju sa neuromodulatorom oktopaminom ili GABA-vezanim hloridnim kanalima, poremećaje ćelijske membrane sa menjanjem permeabilnosti, poremećaje membrane i jonskih kanala koji modifikuju aktivnost proteina vezanih za membranu i intracelularnih signalnih puteva i dr. [211]. Aktivnost fenolnih jedinjenja poput karvakrola i timola može biti povezana sa oštećenjem kutikule i digestivnog aparata na larvama nematoda. Pored toga, ova jedinjenja su najverovatnije povezana sa neurotoksičnim efektom na slobodnoživeće nematode, pošto su u interakciji sa SER-2 tiraminskim receptorima. Kutikularne promene i moguća neurotoksičnost mogu ometati permeabilnost kutikule i pokretljivost, ometajući održavanje homeostaze unutar ovih parazita. Dakle, različiti sastojci etarskih ulja izazivaju različite neurološke i strukturne promene u nematodama, koje mogu dovesti do njihove parazlitičnosti i smrti [163,164]. U istraživanju Marjanović (2019) [212], dokazano je da karvakrol poseduje osobine antagoniste nikotinskog acetilholinskog receptora (nAChR) nematode *Ascaris suum* uz efikasnu i značajnu inhibiciju kontrakcije neuromišićnog preparata izazvane rastućim koncentracijama acetilholina, a pokazano je takođe i da karvakrol potencira inhibitorne efekte GABA na neuromišićnom preparatu.

Takođe, rezultati iste studije su pokazali i da karveol i mentol pojačavaju kontrakcije neuromišićnog aparata *A. suum* izazvane acetilholinom.

U pregledu literature je dat prikaz budućih strategija za kontrolu gastrointestinalnih nematoda ovaca (koje se mogu primeniti i na druge parazite), a koje uključuju racionalnu upotrebu antihelmintika uz primenu odgovarajućih alternativa, što dakle podrazumeva integrisan pristup. U tom kontekstu bi upotreba etarskih ulja i njihovih sastojaka mogla biti veoma značajna. Naime, različita istraživanja su pokazala moguću svrsishodnost njihove upotrebe u kombinaciji sa komercijalnim antihelminticima, a u cilju povećanja ukupne efikasnosti. Tako je u istraživanju Shalaby i sar. (2012) [213] dokazano da bi ivermektin u kombinaciji sa *Nigella sativa* uljem imao višu antihelmintičku aktivnost sa morfološkog aspekta gledišta protiv *H. contortus*, ali i *Moniezia expansa* i *Fasciola gigantica*, u poređenju sa njegovom samostalnom primenom. Rezultati prethodno pomenutog istraživanja Marijanović (2019) [212] su pokazali sinergističko inhibitorno dejstvo kombinacije karvakrola i monepantela na kontrakcije neuromišićnog preparata testirane nematode, kao i to da karvakrol značajno potencira inhibitorne efekte piperazina, što ukazuje na mogućnost primene ovih sinergističkih kombinacija u terapijske svrhe u cilju povećanja efikasnosti pomenutih antihelmintika. Takođe, zaključak pomenutog istraživanja je i da bi se efekat karveola i mentola u smislu pojačanja kontrakcije neuromišićnog aparata izazvanog acetilholinom mogao iskoristiti za pojačavanje efekta svih lekova agonista nikotinsko-holinergičkog receptora nematoda. Ispitivane su i kombinacije više različitih alternativa, na primer ishrane bogate kondenzovanim taninima i selekcije otpornih rasa životinja u istraživanju Werne i sar. (2013) [72]. Iako nije jasno dokazan aditivni ili sinergistički efekat ovog integrisanog pristupa, udeo od 55% esparzete u ishrani je doveo do značajno nižeg FEC-a gastrointestinalnih nematoda, u poređenju sa kontrolnom ishranom. Studija Keeton (2016) [14] je pokazala pozitivan uticaj kombinovane strategije dodatka ishrani biljke *Sericea lespedeza* jagnjadima i ovcama i TST sa česticama žice bakar oksida zasnovanog na FAMACHA skoru na smanjenje broja jaja kokcidija. Slično tome, a kada su u pitanju bakterije, u istraživanju Bekka-Hadji i sar. (2022) je dokazano sinergističko dejstvo etarskog ulja *Artemisia herba alba* i cefoksitina protiv meticilin rezistentne *Staphylococcus aureus*, kao i ulja *Mentha pulegium* i amikacina protiv imepenem rezistentne *Acinetobacter baumannii* [214]. Navedena istraživanja pokazuju da bi, pored eventualne samostalne upotrebe, različite biljke, etarska ulja i njihovi

sastojci mogli biti korišćeni za pojačavanje efekta komercijalnih antiparazitika i antibiotika, ili biti korišćena sa drugim alternativama u cilju kontrole različitih parazita i mikroba.

Prednosti upotrebe različitih biljnih formulacija poput etarskih ulja u kontroli gastrointestinalnih nematoda ovaca, ali i drugih parazita su brojne [215-221]. Naime, brojna bioaktivna jedinjenja iz njihovog hemijskog sastava koja pripadaju različitim hemijskim grupama mogu doprineti visokoj antiparazitskoj aktivnosti kroz različite mehanizme delovanja i sinergizam. Isti razlozi mogu doprineti i manjoj podložnosti razvoju antihelmintičke rezistencije u poređenju sa komercijalnim preparatima [17,196]. Dalje, prirodno poreklo botaničkih antihelmintika može doprineti manjoj toksičnosti za životinje domaćine i manjim količinama rezidua u mesu i mleku [153,222]. Iako se ovi navodi još uvek trebaju potvrditi, prirodni preparati su svakako bolje prihvatljiva opcija za životnu sredinu u poređenju sa hemijskim preparatima. Na kraju, korišćenje sintetskih preparata je sve manje održiv pristup ne samo usled razvoja rezistencije, već i sa finansijskog aspekta, s obzirom na rast cena ovih lekova [223,224]. Takođe, sa tog aspekta posmatranja, uvođenje upotrebe biljnih formulacija u svakodnevnu praksu može biti održivija i prihvatljivija opcija s obzirom na obično veoma prihvatljivu cenu i lakoću nabavke, pogotovo u državama i regionima sa razvijenim biodiverzitetom [153], kao što je i Srbija.

Nedostaci koji prate trenutno stanje vezano za upotrebu biljnih preparata u kontroli nematoda [215-221] jeste svakako još uvek nedovoljan broj ispitivanja na ovu temu, pri čemu su podaci o njihovoj efikasnosti u mnogim slučajevima anegdotski i zasnovani na posmatranju od strane farmera [121]. Nedovoljan broj podataka o potvrdi efikasnosti etarskih ulja protiv nematoda i mogućnosti njihove primene u savremenoj praksi se naročito odnose na različite *in vivo* studije, a pogotovo na studije toksičnosti na samim domaćinima, a bez kojih nije moguća široka upotreba ovih preparata. Dalje, kao što se može videti iz Tabele 5, postignute efikasnosti u terenskim uslovima još uvek nisu dovoljne za njihovu širu samostalnu upotrebu u cilju kontrole parazita, a efikasnost je još uvek inferiorna u odnosu na komercijalno dostupne preparate. Međutim, pronalazak adekvatne formulacije (vrsta biljke, aktivni principi iz hemijskog sastava, način primene, doza itd.) kako bi se postigla odgovarajuća efikasnost u različitim uslovima nije jednostavan zadatak i zahteva veliki broj ispitivanja. Sa tim u vezi, iz Tabela 4. i 5. se može zapaziti jasan porast broja ovakvih ispitivanja i sve veće interesovanje naučnika iz različitih

delova sveta, što svakako doprinosi rešavanju ovog problema. Dodatno, upotreba tehnika inkapsulacije ima brojne pozitivne efekte za primenu etarskih ulja generalno u veterinarskoj medicini te njeno uvođenje se takođe može pozitivno odraziti. Bez obzira, do sada postignuta efikasnost u različitim ispitivanjima, u našim origana i mente pogotovo, se već može smatrati dovoljnom za njihovu upotrebu kao važnog dodatka u budućim, integrisanim terapijskim pristupima kontrole nematoda u cilju smanjenju upotrebe komercijalnih preparata i usporavanja širenja rezistencije. Na ovaj način zasnovane strategije, uz integraciju racionalne upotrebe antihelmintika i korišćenja različitih alternativa uključujući i etarska ulja, mogu doprineti održivoj kontroli gastrointestinalnih nematoda malih preživara u bliskoj budućnosti.

7.0. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Hemijski sastav ispitanih etarskih ulja je složen i sastoji se od jedinjenja iz različitih hemijskih grupa (terpeni, terpenoidi i fenilpropanoidna jedinjenja), pri čemu je broj jedinjenja po jednom ulju varirao od 10-35. Hemijski sastav se razlikovao u zavisnosti od biljke iz koje je izolovano etarsko ulje, pa čak i unutar iste biljne vrste u određenoj meri, što je dovelo i do različitog stepena efikasnosti;
- *In vitro* test izleganja larvi je pokazao visok antihelmintički potencijal testiranih etarskih ulja, pri čemu je efekat zavisio od vrste i hemotipa biljke, proizvođača ulja, kao i od testiranih koncentracija (50; 12,5; 3,125; 0,781; 0,195; 0,049 i u drugom ispitivanju 0,025 i 0,0125 mg/ml). Posebno su se istakla ulja origana, morača i rtanjskog čaja (100% pri svim ispitivanim koncentracijama), čubra (99,3-100%) i timijana (tip 1 95,3-100%; tip 2, 98,5-100%) u prvom, odnosno miloduha (42,7-91,3%), bosiljka (23,3-93,3%), divlje nane (13-92,7%), pitome nane (21,0-90,3%), korijandera (29,0-88,7%) i ponovo origana (71,3-93,3%) u drugom istraživanju. Efekat je za većinu ispitivanih ulja bio doznozavistan, posebno u drugom istraživanju, s obzirom na drugačiji način pripreme koncentracija (metod razblaživanja). Visoka ovoidna aktivnost testiranih ulja potiče od bioaktivnih jedinjenja kao što su karvakrol, timol, anetol, p-cimen, γ -terpinen, pinokamfon, karvon, mentol i linalool;
- *In vivo* test redukcije broja jaja nematoda u fecesu životinja je pokazao antihelmintičku efikasnost etarskih ulja primenjenih jednokratno, peroralno. U određenoj meri, efikasnost je dokazana za sva ispitana ulja, ali su se posebno istakli origano i pitoma nana, s obzirom na procenat redukcije EPG 7. dana (43,21% i 26,86%) i 14. dana (60,13% i 46,04%) nakon tretmana i značajnost njegovog smanjenja u odnosu na period pre tretmana. Pri tome se intraruminalni način primene ulja u drugom istraživanju pokazao efikasnijim. Takođe, u drugom istraživanju, efikasnost je bila veća na drugoj farmi (vezani način držanja) u poređenju sa prvom farmom (slobodni način držanja), kao što je dokazano za ulje origana (78,26% u poređenju sa 41,99% 14. dana nakon tretmana), ali i za ostala ispitana ulja.

- Studije toksičnosti, odnosno klinički pregled tretiranih životinja, hematološke i biohemijske analize krvi nisu pokazale prisustvo neželjenih i toksičnih efekata *in vivo* primenjenih formulacija. Na to je ukazalo odsustvo kliničkih znakova ili simptoma kod životinja, vrednosti hematoloških parametara koje se nisu značajno menjale nakon tretmana što se odnosi i na vrednosti ureje i kreatinina, kao i vrednosti AST i GGT koje su bile slične ili niže u poređenju sa vrednostima pre tretmana. Dobijeni rezultati sugerišu na odsustvo toksičnih efekata primenjenih formulacija na funkciju bubrega i jetre;
- Koprokulturom, sprovedenom pre tretmana, je potvrđeno prisustvo četiri roda gastrointestinalnih nematoda ovaca u datoj oblasti (Južna Italija): *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* i *Chabertia*. U prvom istraživanju gastrointestinalne nematode iz roda *Haemonchus* su bile najzastupljenije (53%), dok su u drugom istraživanju paraziti iz roda *Trichostrongylus* bili najzastupljeniji (47,5%). Njihova zastupljenost se u određenoj meri menjala nakon tretmana, pri čemu se zapaža opadanje procenta parazita iz roda *Haemonchus* u svim ispitivanim grupama;
- Razvoj antihelmintičke rezistencije zahteva primenu novih održivih strategija za kontrolu parazita kod domaćih životinja. Dokazana efikasnost i bezbednost primene odabranih etarska ulja u ovim istraživanjima može da posluži kao osnova za izbor budućih alternativnih rešenja u integrisanom pristupu kontrole gastrointestinalnih nematoda kod ovaca. Dodatno, povećanjem doze ili višestrukom aplikacijom, odnosno upotrebom tehnika inkapsulacije, postoji mogućnost razvoja preparata i za samostalnu upotrebu.

8.0. LITERATURA

1. <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (Pristupljeno 10.03.2022.)
2. <https://www.fao.org/livestock-systems/production-systems/ruminant/en/> (Pristupljeno 13.02.2022.)
3. Nastić L.M., Ivanović S.M., Radivojević D.Ž. Analize visine i strukture investicionih ulaganja u ovčarske i kozarske farme u Evropskoj uniji i Republici Srbiji. *J Agric Sci* 2017, 62(1): 79-88.
4. Morris S.T. Overview of sheep production systems. In: *Advances in Sheep Welfare*, Eds by Ferguson D.M., Lee C., Fisher A., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Ilionis, USA, 2017, p. 19-35.
5. <https://www.stat.gov.rs/oblasti/poljoprivreda-sumarstvo-i-ribarstvo/stocarstvo/> (Pristupljeno 17.02.2022.)
6. Mavrot F., Hertzberg H., Torgerson P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systemic review and meta-analysis. *Parasit Vectors* 2015, 8: 557.
7. Szewc M., De Waal T., Zintl A. Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *Vet J* 2021, 268: 105602.
8. Seyoum Z., Demessie Y., Bogale B., Melaku A. Field evaluation of the efficacy of common anthelmintics used in the control of gastrointestinal nematodes of sheep in Dabat district, Northwest Ethiopia. *Ir Vet J* 2017, 70: 18.
9. Fox M.T. Gastrointestinal parasites of sheep and goats. *MSD Manual, Veterinary Manual*, 2014, dostupno na: <https://www.msdevetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/gastrointestinal-parasites-of-sheep-and-goats> (25.02.2022.)
10. Kulišić Z., Aleksić N., Đorđević M., Gajić B., Tambur Z., Stevanović J., Stanimirović Z. Prevalence and intensity of infection with gastrointestinal nematodes in eastern Serbia. *Acta Vet-Beograd* 2013, 63(4): 429-36.
11. Pavlović I., Becskei Z., Ivanović S., Petrović M.P., Savić M., Petrović V.C., Bojkovski J.A. Biodiversity of helminths of sheep breed in Vojvodina (northern Serbia). *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca* 2017, 74(2): 162-6.

12. Potârniche A.V., Mickiewicz M., Olah D., Cerbu C., Spînu M., Hari A., Györke A. et al. First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. *Animals* 2021, 11(10): 2761.
13. Zeineldin M., Abdelmegeid M., Barakat R., Ghanem M. A review: herbal medicine as an effective therapeutic approach for treating digestive disorders in small ruminants. *Alex J Vet Sci* 2018, 56(1): 33-44.
14. Keeton S.T.N. Integrated methods for controlling gastrointestinal nematode infections in ewes and lambs. Doctoral dissertation, Louisiana State University, 2016
15. Shalaby H.A. Anthelmintic resistance; How to overcome it? *Iran J Parasitol* 2013, 8(1): 18-32.
16. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., de Oliveira L.M.B., Macedo I.T.F., Rondon F.C.R., Bevilaqua C.M.L. 2018. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Sci Vet* 2018, 46: 1522.
17. Borges D.G.L., Borges F.A. Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda* 2016, 3: e92016.
18. Lalošević V., Boboš S., Simin S. 2008. Nalaz gastrointestinalnih i plućnih parazita kod ovaca. *Contemp Agric*, 57(3-4): 1-8.
19. Lalošević V., Simin S. 2008. Efekat doramektina na želudačno-crevne i plućne nematode ovaca. *Ann Agron*, 32(1): 127-32.
20. Roeber F., Jex A.R., Gasser R.B. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnol Adv* 2013, 31(8): 1135-52.
21. Stear M.J., Bishop S.C., Henderson N.G., Scott I. A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Anim Health Res Rev* 2003, 4(1): 45-52.
22. Wang C.R., Gao J.F., Zhu X.Q., Zhao Q. Characterization of *Bunostomum trigonocephalum* and *Bunostomum phlebotomum* from sheep and cattle by internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Res Vet Sci* 2013, 92(1): 99-102.
23. Albrechtová M., Langrová I., Vadlejch J., Špakulová M. A revised checklist of Cooperia nematodes (Trichostrongyloidea), common parasites of wild and domestic ruminants. *Helminthologia* 2020, 57(3): 280-7.

24. Nath T.C., Lee D., Park H., Choe S., Ndosu B.A., Kang Y., Bia M.M. et al. Morphometrical and molecular characterization of *Oesophagostomum columbianum* (Chabertiidae: Oesophagostominae) and *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae: Haemonchinae) isolated from goat (*Capra hircus*) in Sylhet, Bangladesh. *J Parasitol Res* 2021, 2021(3): 1-9.
25. El-Ashram S., Suo X. Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains. *Sci Rep* 2017, 7(1): 70.
26. Waller P.J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim Feed Sci Technol* 2006, 126(3-4): 277-89.
27. Giovanelli F., Mattellini M., Fichi G., Flamini G., Perrucci S. In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Sci* 2018, 5(3): 78.
28. Ramos F., Portella L.P., Rodrigues F.D.S., Reginato C.Z., Cezar A.S., Sangioni L.A., Vogel F.S.F. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesqui Vet Bras* 2018, 38(1): 48-52.
29. Abebe T., Yobsan T., Debela A. Prevalence of major gastrointestinal nematode and degree of parasite infestation in sheep of Bako agricultural research center community based breeding program project small holder farms at Horro district. *Dairy and Vet Sci J* 2018, 8(3): 555740.
30. Beleckè A., Kupčinskas T., Stadalienė I, Höglund J, Thamsborg S.M., Stuen S, Petkevičius S. Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Vet Scand* 2021, 63: 18.
31. Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Ianniello D., Paola Maurelli M. et al. The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasit Vectors* 2020, 13: 457.
32. Preston S.J.M., Sandeman M., Gonzales J., Piedrafita D. Current status of gastrointestinal nematode diagnosis of small ruminants: where are we and where we are going? *J Immunol Res* 2014, 2014: 210350.
33. Knoll S., Dessì G., Tamponi C., Meloni L., Cavallo L., Mehmood N., Jacquet P. et al. Practical guide for microscopic identification of infectious gastrointestinal nematode larvae in sheep from Sardinia, Italy, backed by molecular analysis. *Parasit Vectors* 2021, 14: 505.
34. van Wyk J.A. and Mayhew E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res* 2013, 80(1): E1-E14.

35. Pinto N.B., de Castro L.M., Azambuja R.H.M., Capella G.D.A., de Moura M.Q., Terto W.D., Freitag R.A. et al. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Rev Bras Parasitol Vet* 2019, 28(4): 807-11.
36. Domke A.V.M., Chartier C., Gjerde B., Leine N., Vatn S., Østerås O., Stuen S. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. *Acta Vet Scand* 2011, 53(1): 29.
37. Fleming S.A., Craig T., Kaplan R.M., Miller J.E., Navarre C., Rings M. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J Vet Intern Med* 2006, 20(2): 435-44.
38. Jezdimirović M. Veterinarska farmakologija - IV dopunjeno izdanje. Fakultet veterinarske medicine, Univeritet u Beogradu, 2010.
39. Bosco A., Maurelli M.P., Ianniello D., Morgoglione M.E., Amadesi A., Coles G.C., Cringoli G. et al. The recovery of added nematode eggs from horse and sheep faeces by three methods. *BMC Vet Res* 2018, 14: 7.
40. Abbas R.Z., Zaman M.A., Sindhu Z.U.D., Sharif M., Rafique A., Saeed Z., Rehman T.U. et al. Anthelmintic effects and toxicity analysis of herbal dewormer against the infection of *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in goat. *Pak Vet J* 2020, 40(4): 455-60.
41. Geary T.G., Hosking B.C., Skuce P.J., Von Samson-Himmelstjerna G., Maeder S., Holdsworth W.P., Vercruyse J. WAAVP Guideline on anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Vet Parasitol* 2012, 190: 306-16.
42. Arsenopoulos K., Minoudi S., Symeonidou I., Triantafyllidis A., Katsafadou A.I., Lianou D.T., Fthenakis G.C. et al. Frequency of resistance to benzimidazoles of *Haemonchus contortus* helminths from dairy sheep, goats, cattle and buffaloes in Greece. *Pathogens* 2020, 9(5): 347.
43. Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Vet Parasitol* 2012, 189(1): 85-8.
44. Mederos A.E., Ramos Z., Banchemo G.E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasit Vectors* 2014, 7: 598.
45. Fissiha W. and Kinde M.Z. Anthelmintic resistance and its mechanism: A review. *Infect Drug Resist* 2021, 14: 5403-10.
46. Vineer H.R., Eric M.R., Hertzberg H., Bartley D.J., Bosco A., Charlier J., Chartier C. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite* 2020, 27: 69.

47. Mphahlele M., Molefe N., Tsotetsi-Khambule A., Oriol T. Anthelmintic resistance in livestock, In Book: Helminthiasis. Okwa O.O., editor, IntechOpen, UK, 2019.
48. Salgado J.A. and Santos C.D.P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016, 25(1): 3-17.
49. Ihler C.F. Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. *Acta Vet Scand* 2010, 52(Suppl 1): S24.
50. James C.E., Hudson A.L., Davey M.W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* 2007, 25(7): 328-35.
51. Prichard R.K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol* 2001, 17(9): 445-53.
52. Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N.C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 2004, 20(10): 469-76.
53. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A. et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006, 136(3-4): 167-85.
54. Mickiewicz M., Czopowicz M., Moroz A., Potărniche A.V., Szaluś-Jordanow O., Spinu M., Górski P. et al. Prevalence of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in Polish goat herds assessed by the larval development test. *BMC Vet Res* 2021, 17: 19.
55. Mphahlele M., Tsotetsi-Khambule A.M., Moerane R., Komape D.M., Thekiso O.M.M. Anthelmintic resistance and prevalence of gastrointestinal nematodes infecting sheep in Limpopo Province, South Africa. *Vet World* 2021, 14(2): 302-13.
56. Dorny P., Claerebout E., Vercruyse J., Sani R., Jalila A. Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Vet Parasitol* 1994, 55(4): 327-42.
57. Coles G.C., Papadopoulos E., Himonas C.A. Tubulin, resistance and worms. *Parasitol Today* 1995, 11: 183-5.
58. Smith G., Greenfel B.T., Isham V., Cornell S. Anthelmintic resistance revisited: under-dosing, chemoprophylactic strategies, and mating probabilities. *Int J Parasitol* 1999, 29(1): 77-91.
59. Reinemeyer C.R., Rohrbach B.W., Grant V.M., Radde G.L. A survey of ovine parasite control practices in Tennessee. *Vet Parasitol* 1992, 42(1-2): 111-22.

60. Geerts S, Brandt J, Kumar V, Biesemans L. Suspected resistance of *Ostertagia ostertagi* in cattle to levamisole. *Vet Parasitol* 1987, 23(1-2): 77–82.
61. van Wyk J.A., Malan F.S., Gerber H.M., Alves R.M.R. The problem of escalating resistance to *H. contortus* to the modern anthelmintics in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1989, 56(1): 41–9.
62. Shoop W.L. Ivermectin resistance. *Parasitol Today* 1993, 9(5): 154–9.
63. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-anthelmintic-resistance_en-1.pdf (Pristupljeno 12.03.2022.)
64. Kebede A. Review on anthelmintic drug resistance nematodes and its methods of detection in Ethiopia. *J Vet Med Animal Sci* 2019, 2(1): 1013.
65. Cringoli G., Maurelli M.P., Levecke B., Bosco A., Vercruysse J., Utzinger J., Rinaldi L. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat Protoc* 2017, 12(9): 1723–32.
66. Álvarez-Sánchez M.A., Mainar-Jaime R.C., Pérez García J., Rojo-Vázquez F.Á. A review of the methods for the detection of anthelmintic resistance. *Rev Iber Parasitol* 2002, 62(1-2): 51-9.
67. Vercruysse J., Albonico M., Behnke J., Kotze A., McCarthy J., Prichard R. et al. Monitoring anthelmintic efficacy for soil transmitted helminths (STH), Working group on Soil-transmitted helminthiasis, WHO, 2008, dostupno na: <https://www.who.int/> (Pristupljeno 22.04.2022.)
68. von Samson-Himmelstjerna G., Coles G.C., Jackson F., Bauer C., Borgsteede F., Cirak V.Y., Demeler J. et al. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Res* 2009, 105(3): 825-34.
69. Robles-Pérez D., Martínez-Pérez J.M., Rojo-Vázquez F.A., Martínez-Valladares M. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet Parasitol* 2014, 203(1-2): 217-21.
70. Mondragón-Ancelmo J., Olmedo-Juárez A., Reyes-Guerrero D.E., Ramírez-Vargas G., Ariza-Román A.E., López-Arellano M.E., de Gives P.M. et al. Detection of gastrointestinal nematode populations resistant to albendazole and ivermectin in sheep. *Animals* 2019, 9(10): 775.
71. Dever M.L., Kahn L.P., Doyle E.K. Integrated parasite management improves control of gastrointestinal nematodes in lamb production systems in a high summer rainfall region, on the Northern Tablelands, New South Wales. *Anim Prod Sci* 2015, 57(5): 958-68.

72. Werne S., Isensee A., Maurer V., Perler E., Drewek A., Heckendorn F. Integrated control of gastrointestinal nematodes in lambs using a bioactive feed × breed approach. *Vet Parasitol* 2013, 198(3-4): 298-304.
73. Hodgkinson J.E., Kaplan R.M., Kenyon F., Morgan E.R., Park A.W., Paterson S., Babayan S.A. Refugia and anthelmintic resistance: concepts and challenges. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist* 2019, 10: 51-7.
74. Sing D. and Swarnkar C.P. Role of refugia in management of anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants - a review. *Indian J Small Ruminants* 2008, 14(2): 141-80.
75. Calvete C., González J.M., Ferrer L.M., Ramos J.J., Lacasta D., Delgado I., Uriarte J. Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Vet Parasitol* 2020, 277: 109018.
76. Kenyon F., Greer A.W., Coles G.C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret, J., Berrag, B. et al. The role of target selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 2009, 164(1): 3–11.
77. Abbott K.A., Taylor M., Stubbings L.A. Sustainable worm control strategies for sheep, 4th Ed., A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers, SCOPS, UK, 2017; pp: 40.
78. Tamponi C., Dessì G., Varcasia A., Knoll S., Meloni L., Scala A. Preliminary assessment of body condition score as a possible marker for the targeted selective treatment of dairy sheep against gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitol* 2021, 67(1): 362-8.
79. Hoste H., Le Frileux Y., Goudeau C., Chartier C., Pors I., Broqua C., Bergeaud J.P. Distribution and repeatability of nematode faecal egg counts in dairy goats; a farm survey and implications for worm control. *Res Vet Sci* 2002, 72: 211-5.
80. Hoste H., Chartier C., Le Frileux Y., Goudeau C., Broqua C., Pors I., Bergeaud J.P., Dorchies P. Targeted application of anthelmintics to control trichostrongylosis in dairy goats: a result of a 2-year survey in farms. *Vet Parasitol* 2002, 110: 101-8.
81. Soto-Barrientos N., Chan-Pérez I.I., España-España E., Novelo-Chi L.K., Palma-Ávila I., Ceballos-Mendoza A.C., Sarabia-Hernández J.A. et al. Comparing body condition score and FAMACHA© to identify hair-sheep ewes with high faecal egg counts of gastrointestinal nematodes in farms under hot tropical conditions. *Small Rumin Res* 2018, 167, 92-9.
82. Torres-Acosta J.F.J., Pérez-Cruz M., Canul-Ku H.L., Soto-Barrientos N., Cámara-Sarmiento

- R., Aguilar-Caballero A.J., Lozano-Argáes I. et al. Building a combined targeted selective treatment scheme against gastrointestinal nematodes in tropical goats. *Small Rumin Res* 2014, 121(1): 27-35.
83. Utzinger J, Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother* 2004, 5(2): 263-85.
84. Zvinorova P.I., Halimani T.E., Muchadeyi F.C., Matika O., Riggio V., Dzama K. 2016. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes – the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Vet Parasitol* 2016, 225: 19-28.
85. McRae K.M., McEwan J.C., Dodds K.G., Gemmell N.J. Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. *BMC Genom* 2014, 15: 637.
86. Eady S.J., Woolaston R.R., Barger I.A. Comparison of genetic and non-genetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livest Prod Sci* 2003, 81(1): 11-23.
87. Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Aguilar-Caballero A.J., Cámara-Sarmiento R., Alonso-Díaz M.A. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Rumin Res* 2012, 103(1): 28-40.
88. Busson M., Chetty J., Robin M., Aubertot J. Biocontrol: Definition. *Dictionnaire d'Agroecologie*. 2012, Dostupno na: <https://dicoagroecologie.fr/en/en> (12.04.2022)
89. Worku E., Kiros A., Asgedom H., Tadesse B. Alternative control methods of gastrointestinal nematode infections in small ruminants: biological method and use of medicinal plant extracts. *ARC J Anim Vet Sci* 2017, 3(2): 11-27.
90. Kotze A.C., Grady J., Gough J.M., Pearson R., Bagnall N.H., Kemp D.H., Akhurst R.J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life stages of economically important nematode parasites of livestock. *Int J Parasitol* 2005, 35: 1013-22.
91. Aguilar-Marcelino L., Mendoza-de-Gives P., Torres-Hernández G., López-Arellano M.E., González-Garduño R. *Butlerius butleri* (Nematoda: Diplogasteridae) feeds on *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infective larvae and free-living nematodes in sheep faecal cultures under laboratory conditions: preliminary report. *Acta Parasitol* 2020, 65(4): 865-73.

92. Waghorn T.S., Leathwick D.M., Chen L.Y., Gray R.A.J., Skipp R.A. Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia* (Teladorsagia) circumcincta in New Zealand. *Vet Parasitol* 2002, 104(2): 119-29.
93. González J.F., Hernández J.N., Machín C., Pérez-Hernández T., Wright H.W., Corripio-Miyar Y., Price D.R.G., Matthews J.B., Tom N. McNeilly & Alasdair J. Nisbet. Impacts of breed type and vaccination on *Teladorsagia circumcincta* infection in native sheep in Gran Canaria. *Vet Res* 2019, 50(1): 29.
94. Ehsan M., Hu R.S., Liang Q.L., Hou J.L., Song X., Yan R., Zhu X.Q., Li X. Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines* 2020, 8(3): 555.
95. Bassetto C., Almeida F., Newlands G.F.J., Smith W., Castilhos A., Fernandes S., Siqueira E. et al. Trials with the *Haemonchus* vaccine, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. *Vet Parasitol* 2018, 264: 52–7.
96. Britton C., Emery D.L., McNeilly T.N., Nisbet A.J., Stear M.J. The potential for vaccines against scour worms of small ruminants. *Int J Parasitol* 2020, 50(8): 533-53.
97. Rodrigues E., Carlini E.L.A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. *Arq Bras Fitomed Cientif* 2003, 1: 80-87.
98. Nery O.S., Duarte E.R., Martins E.R. Eficácia de plantas para o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminants: revisão de estudos publicados. *Rev Bras de Plantas Medicinai*s 2009, 11: 330-338.
99. Mravčáková D., Váradyová Z., Kopčáková A., Čobanová K., Grešáková L., Kišidayová S., Babják M. et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. *BMC Vet Res* 2019, 15: 302.
100. Acamovic T., Brooker J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc Nutr Soc* 2005, 64: 403-412.
101. Azaizeh H., Mreny R., Markovics A., Muklada H., Glazer I., Landau S.Y. Seasonal variation in the effects of Mediterranean plant extracts on the exsheathment kinetics of goat gastrointestinal nematode larvae. *Small Rumin Res* 2015, 131: 130-135.
102. Dekebo A. Plant extracts. Intechopen, London, UK, 2018.

103. Hussein R.A., El-Anssary A.A. Plants secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. In: Herbal Medicine, ed. Bulders P.F., chapter 2. Intechopen, London, UK, 2019.
104. Jamwal K., Bhattacharya S., Puri S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2018, 9: 26–38.
105. Alonso-Diaz M.A., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Hoste H. 2010. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Rumin Res* 2010, 89(2-3): 164-73.
106. Villalba J.J., Miller J., Ungar E.D., Landau S.Y., Glendinning J. Ruminant self-medication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. *Parasite* 2014, 21:31.
107. Hoste H, Torres-Acosta JFJ. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solution for changing worms in a changing world. *Vet Parasitol* 2011, 180: 144-54.
108. Brunet S., Fourquaux I., Hoste H. Ultrastructural changes in the third stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol Int* 2011, 60: 419-24.
109. Delgado-Núñez E.J., Zamilpa A., González-Cortazar M., Olmedo-Juárez A., Cardoso-Taketa A., Sánchez-Mendoza E., Tapia-Maruri D. et al. Isorhamnetin: A nematocidal flavonoid from *Prosopis laevigata* leaves against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Biomolecules* 2020, 10(5): 773.
110. Butnariu M. Sarac I. Essential oils from plants. *Int J Biotech Biomed Sci* 2018, 1(4): 35-43.
111. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines* 2016, 3(4): 25.
112. Fokou J.B.H., Dongmo P.M.J., Boyom F.F. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In El-Shemy H, editor. *Essential oils - oils of nature*. Intechopen, London, UK, 2020, chapter no. 2.
113. Vučinić M., Nedeljković-Trailović J., Trailović S., Ivanović S., Milovanović M., Krnjajić D. Mogućnost primene etarskih ulja u veterinarskoj medicini i stočarstvu s posebnim osvrtom na etarsko ulje origana. *Vet Glas* 2012, 66(5-6): 407-16.
114. Morsy N.F.S. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. In Book: *Active ingredients from aromatic and medicinal plants*. El-Shemy H., editor, Intechopen, London, UK, 2017, chapter no. 11.

115. da Silva B.D., Bernardes P.C., Pinheiro P.F., Fantuzzi E., Roberto C.D. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Sci* 2021, 176: 108463.
116. Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Nat Prod Commun* 2009, 4(8): 1147-54.
117. Baser K.H.C. and Franz C. Essential oils used in veterinary medicine. In: K.H.C. Baser, G. Buchbauer: *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Applications*. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, pp: 881-894.
118. Franz CM. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragr J* 2010, 25(3): 112-3.
119. Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *Int J Curr Res* 2011, 33(2): 86-98.
120. Steflitsch, W. and Steflitsch, M. Clinical aromatherapy. *J Mens Health* 2008, 5(1): 74-78.
121. Muthee J.K. Anthelmintic efficacy of selected medicinal plants against gastrointestinal nematodes in naturally infected sheep in Kenya. *J Phytopharm* 2018, 7(2): 111-5.
122. Ebani V.V. and Mancianti F. Use of essential oils in veterinary medicine to combat bacterial and fungal infections. *Vet Sci* 2020, 7(4): 193.
123. Abbas A., Abbas R.Z., Masood S., Iqbal Z., Khan M.K., Saleemi M.K., Raza M.A. Acaricidal and insecticidal effects of essential oils against ectoparasites of veterinary importance. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat* 2018, 17(5): 441-52.
124. Guz L., Ziętek J., Puk K., Adaszek Ł. Inhibitory activities of essential oils against *Babesia canis*. *Pol J Vet Sci* 2020, 1: 161-3.
125. Sidiropoulou E., Skoufos I., Marugan-Hernandez V., Giannenas I., Bonos E., Aguiar-Martins K., Lazari D. et al. In vitro anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth performance, fecal oocyst output, and intestinal microbiota in vivo. *Front Vet Sci* 2020, 7: 420.
126. Popruk S., Thima K., Udonsom R., Chiabchalard R., Mahittikorn A., Palukul K., Thepouypom A. Activity of plant essential oils against *Giardia duodenalis*. *Southeast Asian J Trop Med Public* 2017, 48(4): 756-61.
127. Harisson A.P., Turfa J.M. Were natural forms of treatment for *Fasciola hepatica* available to the Etruscans? *Int J Med Sci* 2010, 7(6):s16-s25.

128. Pensel P.E., Maggiore M.A., Gende L.B., Eguaras M.J., Denegri M.G., Elissondo M.C. Efficacy of Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014, 2014: 693289.
129. Trailović S.M., Rajković M., Marjanović Đ.S., Neveu C., Charvet C.L. Action of carvacrol on *Parascaris* sp. and antagonistic effect on nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmaceutics* 2021, 14(6): 505.
130. Trailović S.M., Marjanović Đ.S., Nedeljković Trailović J., Robertson A.P., Martin R.J. Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitol Res* 2015, 114(8): 3059-68.
131. Monteiro J.N.M., Archanjo A.B., Passos G.P., Costa A.V., Porfirio L.C., Martins I.V.F. *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil and ethanol extract on control of canine *Ancylostoma* spp. *Semina: Cienc Agrar* 2017, 38(4): 1947.
132. Nardoni S., Pistelli L., Baronti I., Najar B., Pisseri F., Reidel R.V.B., Papini R. et al. Traditional Mediterranean plants: characterization and use of an essential oils mixture to treat *Malassezia* otitis externa in atopic dogs. *Nat Prod Res* 2017, 31(16): 1891-4.
133. Mugnaini L., Nardoni S., Pinto L., Pistelli L., Leonardi M., Pisseri F., Mancianti F. In vitro and in vivo antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. *J Mycol Med* 2012, 22(2): 179-84.
134. Mucha W. and Witkowska D. The applicability of essential oils in different stages of production of animal-based foods. *Molecules* 2021, 26(13): 3798.
135. Amer A.M. and Amer M.M. Efficacy and safety of essential oils mixture on tick infestation in dogs. *Adv Anim Vet Sci* 2020, 8(4): 398–407.
136. Katiki L.M., Bizzo H.R., Ferreira J.F.S., Amarantee A.F.T. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Vet Parasitol* 2011, 183(1-2): 103-08.
137. Akkari H, Ezzine O., Dhahri S., B'chir F., Rekik M., Hajaji S., Darghouth M.A. et al. Chemical composition, insecticidal and in vitro anthelmintic activities of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) essential oil. *Ind Crops Prod* 2015, 74: 745-51.

138. Chagas A.C.C., Figueiredo A., Politi F.A.S., Moro I.J., Esteves S.N., Bizzo H.R., Gama P.E. et al. Efficacy of essential oils from plants cultivated in the Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes in sheep. *J Parasitic Dis* 2018, 42(3): 357-64.
139. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., França S.C., Contini S.S.H.T., Chagas A.C.S., Beleboni R.O. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Parasitol* 2016, 228: 70–6.
140. Castilho C.V.V., Fantatto R.R., Gaínza Y.A., Bizzo H.R., Barbi N.S., Leitão S.G., Chagas A.C.S. In vitro activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtoides* on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Farmacogn* 2017, 27(1): 70-6.
141. Gaínza Y.A., Fantatto R.R., Chaves F.C.M., Bizzo H.R., Esteves S.N., Chagas A.C.D.S. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016, 25(4): 383-93.
142. Katiki L.M., Barbieri A.M.E., Araujo R.C., Veríssimo C.J., Louvandini H., Ferreira J.F.S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Vet Parasitol* 2017, 243: 47–51.
143. Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol* 2007, 148(3-4): 288–94.
144. Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.L., de Oliveira L.M.B., Camurca-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.D.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M. et al. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Eucalyptus globulus* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009, 18(3): 62-6.
145. Zhu L., Dai J., Yang L., Qui J. Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol* 2013, 148(1): 311-6.
146. Zhu L., Dai J., Yang L., Qui J. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Vet Parasitol* 2013, 195(1-2): 112-7.
147. Macedo I.T.F., de Oliveira L.M.B., Camurca-Vasconcelos A.L.F., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L., de Morais S.M., de Paula H.C.B. et al. In vitro effects of *Coriandrum sativum*,

Tagetes minuta, Alpinia zerumbet and Lantana camara essential oils on Haemonchus contortus, Rev Bras Parasitol Vet 2013, 22(4): 463-9.

148. Ribeiro J.C., Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Paula H.C.B., Araújo Filho J.V. et al. Efficacy of free and nanoencapsulated Eucalyptus citriodora essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. Vet Parasitol 2014, 204(3-4): 243-8.

149. Qi H., Wang V.X., Dai J.L., Zhu L. In vitro Zanthoxylum simulans essential oil against Haemonchus contortus. Vet Parasitol 2015, 211(3-4): 223-7.

150. Macedo I.T.F., de Oliveira L.M.B., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L., Silva K.D.C., Filho J.V.D.A., Camurca-Vasconcelos A.L.F. Anthelmintic activity of Cymbopogon citratus against Haemonchus contortus. Rev Bras Parasitol Vet 2015, 24(3): 268-75.

151. Gaínza Y.A., Domingues L.F., Perez O.O., Rabelo M.D., López E.R., Chagas A.C.D.S. Anthelmintic activity in vitro of Citrus sinensis and Melaleuca quinquenervia essential oil from Cuba on Haemonchus contortus. Ind Crops Prod 2015, 76: 647-52.

152. Grando T.H., de Sá M.F., Baldissera M.D., Oliveira C.B., de Souza M.E., Raffin R.P., Santos R.C.V. et al. In vitro activity of essential oils of free and nanostructured Melaleuca alternifolia and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of Haemonchus contortus. J Helminthol 2016, 90(3): 377-82.

153. Ferreira L.E., Benincasa B.I., Fachin A.L., Contini S.H.T., França S.C., Chagas A.C.S., Beleboni R.O. Essential oils of Citrus aurantifolia, Anthemis nobile and Lavandula officinalis: In vitro anthelmintic activities against Haemonchus contortus. Parasit Vectors 2018, 11: 269.

154. de Araújo-Filho J.V., Ribeiro W.L.C., André W.P.P., Cavalcante G.S., Rios T.T., Schwinden G.M., da Rocha L.O. et al. Anthelmintic activity of Eucalyptus citriodora essential oil and its major component, citronellal, on sheep gastrointestinal nematodes. Rev Bras Parasitol Vet 2019, 28(4): 644-51.

155. Macedo I.T.F., de Oliveira L.M.B., Andre W., Filho J.V.D.A., dos Santos J.M.L., Ribeiro W.L.C., Camurca-Vasconcelos A.L.F. et al. Anthelmintic effect of Cymbopogon citratus essential oil and its nanoemulsion on sheep gastrointestinal nematodes. Rev Bras Parasitol Vet 2019, 28(3): 522-27.

156. Abidi A, Sebai E., Dhibi M., Darghouth M.A., Akkari H. Chemical analyses and evaluation of the anthelmintic effects of *Origanum majorana* essential oil, in vitro and in vivo studies. *Vet Med (Praha)* 2020, 65(11): 495-505.
157. Helal M.A., Abdel-Gawad A.M., Kandil O.M., Khalifa M.M.E., Cave G.W.V., Morrison A.A., Bartley D.J. et al. Nematocidal effects of a coriander essential oil and five pure principles on the infective larvae of major ovine gastrointestinal nematodes in vitro. *Pathogens* 2020, 9(9): 740.
158. Boyko O.O. and Brygadyrenko V.V. Nematicidal activity of aqueous tinctures of plants against larvae of the nematode *Strongyloides papillosus*. *Trop Biomed* 2021, 38(2): 85-93.
159. Sousa A.I.P., Silva C.R., Costa-Júnior H.N., Silva N.C.S., Pinto J.A.O., Blank A.F., Soares A.M.S. et al. Essential oils from *Ocimum basilicum* cultivars: analysis of their composition and determination of the effect of the major compounds on *Haemonchus contortus* eggs. *J Helminthol* 2021, 95: e17.
160. Jiménez-Penago G, González-Garduño R., Martínez-Bolaños L., Maldonado-Siman E., Cruz- Tamayo A.A., Mendoza-de Gives P. In vitro anthelmintic activity of *Pimenta dioica* and *Origanum vulgare* essential oils on gastrointestinal nematodes from sheep and cattle. *J Parasitic Dis* 2021, 45(3): 583-91.
161. Squires J.M., Foster J.G., Lindsay D.S., Caudell D.L., Zajac A.M. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. *Vet Parasitol* 2010, 172(1-2): 95-9.
162. Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2008, 154(1-2): 167-70.
163. André W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Morais S.M. et al. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Vet Parasitol* 2016, 218: 52–8.
164. André W.P.P., Cavalcante, G.S., Ribeiro W.L.C., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Morais S.M. et al. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. *Rev Bras Parasitol Vet* 2017, 26(3): 323-30.

165. Katiki L.M., Chagas A.C.S., Takahira R.K., Juliani H.R., Ferreira J.F.S., Amarante A.F.T. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2012, 186(3-4): 312-18.
166. Ribeiro J.C., Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Macedo I.T.F., Santos J.M.L., Paula H.C.B., Araújo Filho J.V. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Vet Parasitol* 2014, 204(3-4): 243-48.
167. Galovičová L., Borotová P., Valková V., Vukovic N.L., Vukic M., Štefániková J., Ďúranová H. et al. *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants (Basel)*, 2021, 10(9): 1959.
168. Daniel P.S., Lourenço E.L.B., da Cruz R.M.S., Gonçalves C.H.D.S., Das Almas L.R.M., Hoscheid J., da Silva C. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oil of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Aust J Crop Sci* 2020, 14(03): 545-550.
169. Tariq K.A., Chishti M.Z., Ahmad F., Shawl A.S. Anthelmintic efficacy of *Achillea millifolium* against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *J Helminthol* 2008, 82(3): 227-33.
170. Maccelli A., Vitanza L., Imbriano A., Frascetti C., Filippi A., Goldoni P., Maurizi L. *Satureja montana* L. essential oils: chemical profiles/phytochemical screening, antimicrobial activity and O/W nanoemulsion formulations. *Pharmaceutics* 2020, 12(1): 7.
171. Vitanza L., Maccelli A., Marazzato M., Scazzocchio F., Comanducci A., Fornarini S., Crestoni M.E. *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathog* 2019, 126: 323-31.
172. Fierascu I., Dinu-Pirvu C.E., Fierascu R.C., Velescu B.S., Anuta V., Ortan A., Jinga V. Phytochemical Profile and Biological Activities of *Satureja hortensis* L.: A Review of the Last Decade. *Molecules* 2018, 23(10): 2458.
173. Urban J., Kokoska L., Langrova I., Matejkova J. In vitro anthelmintic effects of medicinal plants used in Czech Republic. *Pharm Biol* 2008, 46(10-11): 808-13.
174. Urban J., Tauchen J., Langrova I., Kokoska L. In vitro motility inhibition effect of Czech medicinal plant extracts on *Chabertia ovina* adults. *J Anim Plant Sci* 2014, 21(2): 3293-302.

175. Bellassoued K., Hsouna A.B., Athmouni K., van Pelt J., Ayadi F.M., Rebai T., Elfeki A. Protective effects of *Mentha piperita* L. leaf essential oil against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Lipids Health Dis* 2018, 17(1): 9.
176. Singh P. and Pandey A.K. Prospective of essential oils of the genus *mentha* as biopesticides: A review. *Front Plant Sci* 2018, 9: 1295.
177. Borotová P., Galovičová L., Valková V., Ďúranová H., Vuković N., Vukić M., Babošová M. et al. Biological activity of essential oil from *Foeniculum vulgare*. *Acta Horti Regiotecturae* 2021, 24(2): 148-52.
178. Reidell R.V.B., Cioni P.L., Ruffoni B., Cervelli C., Pistelli L. Aroma profile and essential oil composition of *Helichrysum* species. *Nat Prod Commun* 2017, 12(6): 977-82.
179. Jan S., Rashid M., Abd_Allah E.F., Parvaiz A. Biological efficacy of essential oils and plant extracts of cultivated and wild ecotypes of *Origanum vulgare* L. *BioMed Res Int* 2020, 2020: 8751718.
180. Leyva-López M., Gutiérrez-Grijalva E.P., Vazquez-Olivo G., Heredia J.B. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules* 2017, 22(6): 989.
181. Buci A., Hodaj-Çeliku E., Manaj H., Abazi S., Drushku S., Lazari D. Essential oil composition from *Juniperus communis* originated from Albania. *J Int Environmental Application & Science* 2018, 13(1): 15-19.
182. Bais S., Gill N.S., Rana N., Shandil S. A phytopharmacological review on a medicinal plant: *Juniperus communis*. *Int Sch Res Notices* 2014, 2014: 634723.
183. Favela-Hernández J.M.J., González-Santiago O., Ramírez-Cabrera M.A., Esquivel-Ferriño P.C., Camacho-Corona M.D.R. Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules* 2016, 21(2): 247.
184. Dosoky N.S. and Setzer W.N. Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils. *Int J Mol Sci* 2018, 19(7): 1966.
185. Panara K., Joshi K., Nishteswar K. A review on phytochemical and pharmacological properties of *Citrus medica* linn. *Int J Pharm Biol* 2012, 3(6):1292-97.
186. Vahidi R., Pourahmad R., Mahmoudi R. Chemical compounds and antibacterial and antioxidant properties of citron (*Citrus medica* L.) peel essential oil. *J Food Bioprocess Eng* 2019, 2(1): 71-6.

187. Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.N., Abu-Zaitoun S.Y., Khasati A.I., Kalbouneh S.R. Biological properties and bioactive components of *Mentha spicata* L. essential oil: focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019, 2019: 3834265.
188. Mandal S. and Mandal M. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015, 5(6): 421-8.
189. Sharifi-Rad J., Quispe C., Kumar M., Akram M., Amin M., Iqbal M., Koirala N., Hyssopus essential oil: an update of its phytochemistry, biological activities, and safety profile. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 2022: 8442734.
190. Váradyová Z., Pisarčíková J., Babják M., Hodges A., Mravčáková D., Kišidayová S., Königová A. et al. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol* 2018, 195: 71-7.
191. Khedher M.R.B., Khedher S.B., Chaieb I., Tounsi S., Hammami M. Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI J* 2017, 16: 160–73.
192. Hamidpour M., Hamidpour R., Hamidpour S., Shahlari M. Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *J Tradit Complement Med* 2014, 4(2): 82–8.
193. Prusinowska R., Smigielski K. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. *Herba Pol* 2014, 60(2): 56-6.
194. Mueen A., Mueen C., Naz S.B., Sharif A., Akram M. Biological and pharmacological properties of the sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Br J Pharm Res* 2015, 7(5): 330-9.
195. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992, 44(1-2): 35–44.
196. Macedo I.T.F., Bevilaqua C.M.I., de Oliveira L.M.B., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Vieira L.S., Oliveira F.R., Queiroz-Junior E.M. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2010, 173(1-2): 93–8.

197. Fonseca Z.A.A.S., Coelho W.A.C., Andre W.P.P., Ribeiro W.L.C., Bessa E.N., Galindo V.R., Pereira J.S. et al. Use of herbal medicines in control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: Efficacies and prospects. *Rev Bras Hig Sanid Anim* 2013, 7(2): 233–49.
198. George D.R., Finn R.D., Graham K.M., Sparagano O.A.E. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasit Vectors* 2014, 7: 28.
199. Hoste H., Torres-Acosta J.F., Alonso-Diaz M.A., Brunet S., Sandoval-Castro C., Adote S.H. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Trop Biomed* 2008, 25(1 Suppl): 56–72.
200. Maes C., Bouquillion S., Fauconnier M.L. Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: A review. *Molecules* 2019, 2019: 2539.
201. Nehme R., Andrés S., Pereira R.B., Jemaa M.B., Bouhallab S., Cecilian F., López S. et al. Essential oils in livestock: From health to food quality. *Antioxidants* 2021, 10(2): 330.
202. Junkuszew A., Milerski M., Bojar W., Szczepaniak K., Le Scouarnec J., Tomczuk K., Dudko P. Effect of various antiparasitic treatments on lamb growth and mortality. *Small Rumin Res* 2015, 123(2-3): 306-13.
203. Kumar M., Bishnoi R.S., Shukla A.K., Jain C.P. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. *Prev Nutr Food Sci* 2019, 24(3): 225-34.
204. Radunz M., Helbig E., Borges C.D., Gandra T.K.V., Gandra E.A. A mini-review on encapsulation of essential oils. *J Anal Pharm Res* 2018, 7(1): 00205.
205. Mesquita M.D.A., Júnior J.B.E.S., Panassol A.M., de Oliveira E.F., Vasconcelos A.L.C.F., de Paula H.C.B., Bevilaqua C.M.L. Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Parasitol Res* 2013, 112(9): 3161-5.
206. Ribeiro W.L.C., Camurça-Vasconcelos A.L.F., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., Ribeiro J.D.C., de Oliveira E.F., de Paula H.C.B. The use of *Eucalyptus staigeriana* nanoemulsion for control of sheep haemonchosis. *Pesqui Vet Bras* 2017, 37(03): 221-6.
207. Katiki L.M., Araujob R.C., Ziegelmeyera L., Gomesa A.C.P., Gutmanisa G., Rodriguesa L., Bueno M.S. et al. Evaluation of encapsulated anethole and carvone in lambs artificially- and naturally-infected with *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol* 2019, 197: 36-52.

208. Marriot P.J., Shellie R., Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J Chromatogr A* 2001, 936(1-2): 1-22.
209. Adams R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition, Allured Business Media, Illinois, USA, 2012.
210. Clark E.G.C. and Clarke M.L. *Veterinary Toxicology*. Cassel and Collier Macmillan, Publishers London, UK, 1977, pp: 268-277.
211. Andrés MF, González-Coloma A., Sanz J., Burillo J., Sainz P. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochem Rev* 2012, 11(4): 371-90.
212. Marjanović Đ. Ispitivanje mehanizma antinematodnog dejstva odabranih monoterpenoidnih i diterpenoidnih aktivnih sastojaka esencijalnih biljnih ulja. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 2019.
213. Shalaby H.A., Abu El Ezz N.M.T., Farag T.K., Abou-Zeina H.A.A. In vitro efficacy of a combination of ivermectin and *Nigella sativa* oil against helminth parasites. *Glob Vet* 2012, 9: 465-73.
214. Bekka-Hadji F., Bombarda I., Djoudi F., Bakour S., Touati A. Chemical composition and synergistic potential of *Mentha pulegium* L. and *Artemisia herba alba* Asso. essential oils and antibiotic against multi-drug resistant bacteria. *Molecules* 2022, 27(3): 1095.
215. Štrbac F., Bosco A., Rinaldi L., Amadesi A., Stojanović D., Simin N., Orčić D. et al. In vitro ovicidal effect of common juniper (*Juniperus communis* L.) essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Review* 2020, 1(1): 152-9.
216. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D. et al. In vitro ovicidal activity of two chemotypes of the yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oil against sheep gastrointestinal nematodes. *Arch Vet Med* 2020, 13(2): 59-76.
217. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Mangieri G., Stojanović D., Simin N. et al. In vitro ovicidal activity of mixture of linalool and estragole against gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet Review* 2021, 2(1): 49-59.
218. Štrbac F., Petrović K., Stojanović D., Ratajac R. Possibilities and limitations of the use of essential oils in dogs and cats. *Vet J Rep Srpska* 2021, XXI(1-2): 238-65.
219. Štrbac F., Bosco A., Amadesi A., Rinaldi L., Stojanović D., Simin N., Orčić D. et al. Ovicidal potential of five different essential oils to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Pak Vet J* 2021, 41(3): 353-8.

220. Štrbac F., Bosco A., Maurelli M.P., Ratajac R., Stojanović D., Simin N., Orčić D. et al. Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal nematodes in sheep - in vitro and in vivo studies. *Vet Sci* 2022, 9(2): 93.
221. Štrbac F., Bosco A., Pušić I., Stojanović D., Simin N., Cringoli G., Rinaldi L. et al. The use of essential oils against sheep gastrointestinal nematodes. In book: *Animal Health Perspectives*, eds by Abbas R.Z., Khan A., Liu P., Saleemi M.K., Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, Vol. I, 2022, p. 86-94.
222. Veerakumari L. Botanical anthelmintics. *Asian J Sci Technol* 2015, 6: 1881-94.
223. Junsoo Lee M.S., Heesoo J., Maskery B.A., Alpern J.D., Park C., Weinberg M., Stauffer W.M. Increases in anti-infective drug prices, subsequent prescribing, and outpatient costs. *JAMA Netw Open* 2021, 4: e2113963.
224. Prakash P., Kumar M., Pundir A., Puri S., Prakash S., Kumari N., Thakur M. et al. Documentation of commonly used ethnoveterinary medicines from wild plants of the high mountains in Shimla district, Himachal Pradesh, India. *Horticulturae* 2021, 7(10): 351.

9.0. BIOGRAFIJA KANDIDATA



Filip Štrbac je rođen 28.11.1993. u Novom Sadu, Srbija. Osnovnu školu „Đorđe Natošević” u Novom Sadu je pohađao u period od 2000. do 2008. godine, kada upisuje prirodno-matematički smer gimnazije „Jovan Jovanović Zmaj” u Novom Sadu. Srednju školu završava 2012. godine, nakon čega upisuje integrisane akademske studije veterinarske medicine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu. Studije završava u roku, 2017. godine, kao student generacije sa prosečnom ocenom 9,58. Tema diplomskog rada je bila „Proteini krvne plazme tovnih hibrida pilića”. Dobitnik je brojnih nagrada i priznanja za uspeh tokom studiranja, među kojima se izdvajaju Povelja za ostvaren najbolji uspeh na petoj godini studija u školskoj

2016/2017. godini, kao i Nagrada za završene studije (za ostvarenu prosečnu ocenu 9,58) u školskoj 2017/2018. godini, a bio je i dobitnik različitih stipendija tokom studiranja. Tokom školskih 2013/2014. i 2014/2015., primao je studentsku stipendiju Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Nakon toga, bio je stipendista Fonda za stipendiranje i podsticanje napredovanja darovitih studenata i mladih naučnih radnika i umetnika Univerziteta u Novom Sadu u školskoj 2015/2016. godini. Tokom školske 2016/2017. godine, bio je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije (Dositeja) od strane Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije. U toku integrisanih akademskih studija, realizovao je i jedno studentsko putovanje, tokom jula i avgusta 2016. godine, kada je putovao u Rusiji (Krasnodar, Soči i Moskva) na međunarodnu smotru studenata u okviru AIESEC programa.

Doktorske studije upisuje 2017. godine na Departmanu za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. U periodu od februara 2018. do februara 2019.

kao stažista volontira na veterinarskoj klinici u sklopu pomenutog Departmana, a u periodu od oktobra 2019. do oktobra 2020. je angažovan kao demonstrator u praktičnoj nastavi na predmetu „Opšta klinička dijagnostika“ takođe na Departmanu. Od maja 2018. godine postaje doktorand stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja angažovan na projektu „Unapređenje zdravlja i dobrobiti visokoproduktivnih krava identifikacijom i otklanjanjem stresogenih faktora“ (TR31062) u pomenutoj instituciji. Tokom ovog perioda se aktivno bavi naučno-istraživačkim radom, a prevashodne oblasti istraživanja su mu farmakologija sa toksikologijom, kao i parazitologija i parazitske bolesti. U toku doktorskih akademskih studija, realizovao je dva naučna-stručna boravka odnosno specijalizacije na Departmanu za veterinarsku medicinu i animalnu proizvodnju, Univerziteta u Napulju Federiko II i regionalnom istraživačkom centru CREMOPAR u Eboliju (SA), Republika Italija. Prvi boravak je realizovan tokom oktobra i novembra 2019. godine u trajanju od 40 dana, u vidu kratkoročne naučne misije pod imenom „*The methodology of the diagnostics of parasitic infections and methods for evaluating the efficacy of antiparasitic drugs*“, u sklopu međunarodne kost akcije COMBAR (eng. *Combating anthelmintic resistance in ruminants*). Drugi boravak je realizovan tokom septembra i oktobra 2021. godine u trajanju od 25 dana, u vidu naučnog putovanja pod imenom „*Anthelmintic efficacy of selected plant essential oils against gastrointestinal nematodes of sheep*“ sufinansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u istim institucijama kao i prvi boravak. Cilj ovih boravaka je bila edukacija iz oblasti dijagnostike parazitskih infekcija i metoda za ispitivanje efikasnosti antihelmintičkih lekova i detekciju antihelmintičke rezistencije, odnosno ispitivanje efikasnosti novih antihelmintičkih sredstava poput biljnih formulacija. Cilj je bio i sprovođenje nekoliko istraživanja na temu ispitivanje efikasnosti i mogućnosti primene biljnih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca, koja su realizovana u saradnji sa stranim i domaćim kolegama i čiji rezultati i čine ovu doktorsku disertaciju. Autor je poglavlja u međunarodnoj monografiji, kao i brojnih radova objavljenih u domaćim ili međunarodnim časopisima i/ili prezentovanim na domaćim i međunarodnim skupovima. Temu doktorske disertacije pod imenom „Antihelmintička efikasnost odabranih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca“ je prijavio u aprilu 2021. godine. Od oktobra 2022. godine, u svojstvu istraživača-saradnika za naučnu oblast Veterinarske nauke, uža naučna oblast Farmakologija i toksikologija, radi na Odseku za nauke o živim sistemima na Institutu za multidisciplinarna istraživanja (IMSI), Univerziteta u Beogradu.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Антихелминтичка ефикасност одабраних етарских уља против гастроинтестиналних нематода оваца
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Регионални центар за праћење паразитоза КРЕМОПАР, Еболи (СА), Италија б) Департман за ветеринарску медицину и анималну производњу, Универзитет у Напуљу Федерико II, Напуљ, Италија в) Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, Србија г) Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Србија д) Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад, Србија, Србија ђ) Институт за мултидисциплинарна истраживања, Универзитет у Београду, Србија
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, Ветеринарска медицина, ужа научна област Фармакологија и токсикологија
1. Опис података
<p><i>1.1 Врста студије</i></p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Докторска дисертације се бави могућношћу примене одабраних биљних етарских уља против гастроинтестиналних нематода оваца, а у циљу проналажења алтернатива у борби против антихелминтичке резистенције. Истраживања обухватају пет одвојених ентитета: анализе хемијског састава испитаних етарских уља; <i>in vitro</i> испитивање антихелминтичке ефикасности одабраних етарских уља; <i>in vivo</i> испитивање антихелминтичке ефикасности етарских уља; студије токсичности; и копрокултуру. Због обимности података, испитивања су спроведена у виду два одвојена истраживања (фазе) спроведена током 2019. и 2021. године. У првом, извршена је анализа хемијског састава 12 узорака етарских уља, <i>in vitro</i> је испитано 12 уља у 4 понављања (плус контроле), док је <i>in vivo</i> испитано 2 уља у по два понављања (две фарме, на</p>

свакој по 4 групе (уља плус контроле) од по 12 животиња, $n=96$). Даље, студије токсичности су извршене путем клиничког прегледа тестираних животиња, док су испитивања копрокултуре такође вршена на две фарме у виду групних узорака за сваку групу (4 групе, уља плус контроле, од по 12 животиња, $n=96$). У другом истраживању, извршена је анализа хемијског састава 10 узорака етарских уља, *in vitro* је испитано 11 уља у 3 понављања (плус контроле) док је *in vivo* испитано 3 уља у по два понављања (две фарме, на свакој по пет група (уља плус контроле) од по 12 животиња, $n=120$). Студије токсичности су извршене путем клиничког прегледа испитиваних животиња и путем анализе хематолошких (две фарме, на свакој по 5 група (уља плус контроле) од по 6 животиња, $n=60$) и биохемијских параметара крви (две фарме, на свакој по 5 група (уља плус контроле) од по 6 животиња, $n=60$), а испитивања копрокултуре су извршена на две фарме у виду групних узорака за групе животиња третираних ориганом ($n=12$ /фарма) и негативном контролом ($n=12$ /фарма) (укупно $n=48$)

1.2 Врсте података

а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: фецес и крв животиња, јаја и ларве гастроинтестиналних нематода, биљна етарска уља

ђ) снимци, **фотографије:** .jpg формат фотографија

е) **текст:** литературни извори

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека **.xlsx**

б) SPSS фајл, датотека _____

в) PDF фајл, датотека **.pdf**

г) Текст фајл, датотека **.doc**

д) JPG фајл, датотека **.jpg**

е) Остало, датотека **GraphPad Prism 9.2.0. (GraphPad Holdings, LLC, San Antonio, CA, USA), .pzfx**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: **одговарајући број**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): **етарска уља - за 22 испитан хемијски**

састав, 23 испитана *in vitro*, 5 испитана *in vivo*, 5 испитана за студије токсичности (3 за хематолошке и биохемијске анализе), укупан број оваца коришћених за различите тестове: 216 + додатна за изолацију јаја нематода, велики број мерења

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је: код *in vivo* испитивања 0., 7. и 14. дан (оба истраживања); код испитивања копрокултуре 0., 7. и 14. дан (прво истраживање), код анализе хематолошких и биохемијских параметара 0. и 14. дан (друго истраживање)

б) варијабле које се више пута мере односе се на: *in vitro* испитивање, у првом истраживању 6 концентрација сваког уља (плус контроле) у четири понављања, у другом истраживању 8 концентрација сваког уља (плус контроле) у три понављања

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: **интервенцијска проспективна студија**

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Гасни хроматограф, масени спектрометар, сита са отворима различитих величина (1 mm, 250 μm, 212 μm и 38 μm), епрувете, центрифуга, плоче са бунарчићима (24 по плочи), пипете, микропипете, инкубатор, електронски микроскопи, mini и fil-FLOTAC апарати, монитор, шприцеви, тубе, хематограм, целофанске кесе

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је понављањем експерименталних мерења, анализом и поређењем резултата измерених при експерименталном испитивању путем статистичких тестова (дескриптивна статистика, једнофакторијална и мултифакторијална анализа варијансе, нелинеарна регресија - логаритамска дистрибуција)

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола је извршена провером сваког појединачног податка након уноса у матрицу, статистичком контролом, као и упоређивањем података са литературним подацима

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (НарДУС) и у репозиторијуму докторских дисертација у Новом Саду (ЦРИС)

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

„Сирови подаци“ ће бити депоновани у приватном репозиторијуму докторанта и уског круга истраживача, док ће подаци обраде који су добијени анализом и обрадом (подаци анализе хемијског састава уља, *in vitro* анализа, *in vivo* анализа, студија токсичности и копрокултуре итд) анализом, бити приложени у докторату.

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

Стандард који примењује Репозиторијум докторских дисертација Универзитета у Новом Саду

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

- б) Подаци су анонимизирани
ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

јавно доступни

- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Филип Штрбац, strbac.filip@gmail.com; filip.strbac@imsi.bg.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Филип Штрбац, strbac.filip@gmail.com; filip.strbac@imsi.bg.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Филип Штрбац, strbac.filip@gmail.com; filip.strbac@imsi.bg.ac.rs