

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10
11 23. jun 2021. godine, 217. sednica, Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske
12 medicine Univerziteta u Beogradu

13
14 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
15 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
16 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

17 **Napomena:** redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih
18 institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upi suje
19 pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.

20
21 1. **Milica Kovačević Filipović**, redovni profesor, patološka fiziologija, 2016. godina, Fakultet
22 veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

23
24 2. **Svetlana Milanović**, vanredni profesor, biohemija, 2018. godina, Fakultet veterinarske
25 medicine, Univerzitet u Beogradu

26
27 3. **Vanja Krstić**, redovni profesor, klinička dijagnostika, patologija i terapija domaćih životinja,
28 2011. godina, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

29
30 4. **Milena Radaković**, naučni saradnik, biologija, 2020. godina, Fakultet veterinarske
31 medicine, Univerzitet u Beogradu

32
33 5. **Anđelo Beletić**, naučni saradnik i specijalista medicinske biohemije, biologija, 2020.
34 godina, Centar za medicinsku biohemiju, Univerzitetski klinički centar Srbije

35
36 II PODACI O KANDIDATU:

37
38 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Kristina, Adam, Spariosu

39
40 2. Datum rođenja, opština, Republika: 28. februar 1988. godine, Pančevo, Srbija

41
42 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*: /

43
44 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*: /

45
46 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

47
48 Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *Babesia*
49 *canis*

50
51 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
52 grafikona i sl.):

53
54 Doktorska disertacija je napisana na 74 strane i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (dve strane),
55 Pregled literature (18 strana), Cilj i zadaci (jedna strana), Materijal i metode (osam strana),
56 Rezultati (20 strana), Diskusija (osam strana), Zaključci (jedna strana), Literatura (16 strana).
57 Naslovne strane doktorske disertacije koje obuhvataju naziv na srpskom i engleskom jeziku,
58 imena mentora i članova Komisije, izvor finansiranja doktorske disertacije, sažetak
59 na srpskom i engleskom jeziku, lista skraćenica i sadržaj date su na prvih 12 strana koje nisu
60 numerisane. Pored navedenog, na poslednje četiri strane doktorske disertacije nalaze se

1 Biografija kandidata, Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
2 doktorskog rada i Izjava o korišćenju i te strane nisu numerisane. Doktorska disertacija je
3 dokumentovana uz pomoć šest tabela, četiri slike i devet grafikona.
4

5 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
6 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
7 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
8 **nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u**
9 **doktorskoj disertaciji):**

10
11 U **Uvodu** je ukratko opisan predmet istraživanja i osnovne hipoteze. Naime, opisana je
12 klinička slika i osnovni laboratorijski nalazi na osnovu kojih se pacijenti mogu razvrstati na one
13 koji imaju nekomplikovanu ili komplikovanu kliničku sliku sa i bez sindroma sistemskog
14 inflamatornog odgovora (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* - SIRS) i poremećaja
15 funkcije organa i organskih sistema. Potom su navedene funkcije pojedinih vrsta leukocita i
16 promene u njihovoj aktivnosti koje su do sada ispitane kod akutne infekcije pasa *B. canis*.
17 Takođe je naglašeno koje funkcije leukocita nisu ispitane i objašnjeno je koji bi bili potencijalni
18 mehanizmi kojima *B. canis* i druge protozoe modulišu imunski odgovor organizma. Takođe je
19 ukratko opisana opasnost po oštećenje sopstvenog tkiva koju nosi preterana aktivacija
20 oksidativnog praska u neutrofilnim granulocitima, kao i neadekvatno lučenje matriks
21 metaloproteinaza (MMP). Na kraju je objašnjeno da je hipoteza ove studije da je stepen
22 promena aktivnosti leukocita veći kod pacijenata koji zadovoljavaju kriterijume za SIRS, u
23 odnosu na SIRS negative pacijente i zdrave kontrole.

24 U **Pregledu literature**, u prvom poglavlju je opisana babezioza pasa. Najpre je ukratko
25 opisan životni ciklus etiološkog faktora - *B. canis*, odnosno stadijumi razvoja ove protozoe,
26 kao i činjenica da ovo oboljenje spada u vektorski prenosiva oboljenja kod kojih je krpelj *D.*
27 *reticulatus* glavni vektor. Potom je sažeto prikazana patogeneza akutne babezioze pasa
28 izazvane *B. canis*, sa posebnim osvrtom na nastanak SIRS. Nakon toga, ukratko je objašnjen
29 značaj urođenog i stečenog imunskog odgovora sa naglaskom na imunski odgovor domaćina
30 na infekciju protozoama. Zatim je opisana uloga neutrofilnih granulocita, monocita/makrofaga,
31 kao i T i B limfocita u imunskom odgovoru domaćina. Potom, detaljno su prikazani receptori
32 na leukocitima koji prepoznaju patogene, među kojima su najdetalnije obrađeni *Toll-like*
33 receptori. Takođe je objašnjena uloga citokina u imunskim reakcijama sa posebnim osvrtom
34 na interleukin 8 (IL-8), monocitni hemoatraktantni protein 1 (MCP-1) i interferon γ (IFN- γ), s
35 obzirom na to da je do sada u literaturi opisan porast koncentracije ovih citokina kod pasa
36 akutno inficiranih *B. canis*. Potom su objašnjeni mehanizmi hemotakse leukocita, fagocitoze i
37 nastanka oksidativnog praska u neutrofilnim granulocitima i ćelijama monocitno/makrofagnog
38 sistema, te je podvučena njihova uloga u oštećenju tkiva samog pacijenta. Nakon toga su vrlo
39 detaljno opisani mehanizmi oksidativnog oštećenja ćelija, kao i antioksidativne zaštite, a
40 navedeni su i literaturni podaci povezani sa oksidativnim stresom ili poremećajima redoks
41 homeostaze koji nastaju prilikom različitih protozoarnih infekcija, kao i mehanizmi
42 antioksidativne zaštite kojima se protozoe štite od nepovoljnih uslova mikrosredine unutar
43 domaćina i dejstva leukocita. Potom su, vrlo originalno, proteini akutne faze – ceruloplazmin
44 (CEP), haptoglobin (HPT) i paraoksonaza 1 (PON-1), opisani ne samo sa aspekta
45 inflamatornog odgovora organizma, već i sa aspekta njihovog učešća u antioksidativnoj
46 zaštiti. Posebno poglavlje je posvećeno želatinazama, enzimima koji spadaju u grupu MMP,
47 koji se metodom zimografije mogu detektovati u formi zimogena (proMMP) i/ili aktivnoj formi
48 (MMP). Navedene su osnovne činjenice vezane za MMP-2, koju luče endotelne ćelije, a
49 najdetalnije je obrađena MMP-9, koju luče neutrofilni ganulociti i čija je uloga da obezbedi
50 transendotelijalnu migraciju ovih ćelija, ali i aktivaciju ili deaktivaciju brojnih citokina i
51 hemokina.

52 U **Ciljevima i zadacima** je definisan jedan uopšteni cilj i šest zadataka. Taj cilj je bio da se
53 utvrdi kako prirodna infekcija pasa protozooom *B. canis* utiče na funkcionalnu aktivnost
54 ukupnih leukocita, neutrofila i limfocita u perifernoj krvi pasa, kao i da se ispita da li se taj
55 uticaj razlikuje između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih jedinki čiji je zdravstveni status
56 okarakterisan sa kliničkog stanovišta, analizom hematoloških i biohemijskih parametara,
57 stepenom inflamacije i oksidativnog stresa, kao i nivoima izlučenih želatinaza. Na osnovu
58 tako postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci istraživanja: 1. Prilikom dijagnostike
59 oboljenja (prezentacija), a na osnovu kliničkih i hematoloških parametara formirati grupe SIRS
60 pozitivnih i SIRS negativnih pasa; 2. Odrediti da li postoji poremećaj funkcije organa analizom

1 biohemijskih parametara seruma na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka; odrediti nivo
2 proteina akutne faze kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa; 3. *In vitro* analizama ispitati
3 funkcionalnu aktivnost: neutrofila, testiranjem njihove sposobnosti fagocitoze, oksidativnog
4 praska i lučenja želatinaza; ukupnih leukocita određivanjem nivoa izlučenog IL-8 i MCP-1; T
5 limfocita, određivanjem nivoa izlučenog IFN- γ ; 4. Utvrditi funkcionalnu aktivnost B limfocita,
6 odnosno plazmocita, na osnovu koncentracije γ globulina u serumu na prezentaciji i nakon
7 kliničkog oporavka; 5. Odrediti stepen oksidativnog stresa na osnovu koncentracije
8 malondialdehida u eritrocitima i slobodnih tiolnih grupa u serumu, kao i stepen antioksidativne
9 zaštite na osnovu aktivnosti katalaze i glutation peroksidaze u eritrocitima, kod pasa na
10 prezentaciji i nakon kliničkog oporavka; 6. Odrediti serumsku aktivnost želatinaza na
11 prezentaciji i nakon kliničkog oporavka.

12 U **Materijalu i metodama** su navedeni klinički i laboratorijski kriterijumi na osnovu kojih su psi
13 uključeni u studiju, kao i njen dizajn. Opisano je da je jedan deo studije izveden tako što su
14 pacijenti (n=24) praćeni tokom postavljanja dijagnoze (prezentacija) i nakon dve nedelje od
15 terapanja, kada su dolazili na kontrolu (oporavak) i da su analize izvedene na višku seruma
16 preostalog posle dijagnostike bolesti, odnosno praćenja oporavka. Takođe su navedeni
17 kriterijumi na osnovu kojih su pacijenti bili grupisani u SIRS pozitivne i SIRS negativne.
18 Opisano je da je drugi deo studije izveden praćenjem aktivnosti leukocita u punoj krvi pasa
19 kod kojih je dijagnostikovana akutna infekcija *B. canis* (n=7) i kod zdravih kontrola (n=7). Krv
20 je inkubirana 24h na 37°C, 5% CO₂ u atmosferi zasićenoj vodenom parom, bez (bazalni
21 uslovi) i sa solubilnim antigenima babezije (SAB) u različitim koncentracijama (vakcinalni
22 antigeni vaccine Pirodog®, razblaženi 10 \times , 100 \times i 1000 \times), kao i konkanavalinom A (ConA)
23 kao pozitivnom kontrolom za stimulaciju aktivnosti leukocita. Nakon toga je ukratko opisano
24 uzorkovanje krvi, izolacija leukocita, kao i priprema uzoraka za različite analize. Navedeno je
25 da su hematološke i biohemijske analize izvedene rutinskim laboratorijskim metodama na
26 odgovarajućim automatskim analizatorima, kao i da je brza detekcija velike babezije
27 obavljena pregledom krvnog razmaza, odnosno da je dijagnoza akutne infekcije *B. canis*
28 potvrđena PCR metodom. Nakon toga su ukratko opisani test fagocitoze i test oksidativnog
29 praska u uzorcima pune krvi akutno inficiranih i zdravih pasa inkubirane bez i sa SAB, na
30 osnovu kojih je procenjena funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita. Potom je navedeno
31 da su u uzorcima plazme dobijene nakon centrifugovanja pomenutih uzoraka pune krvi,
32 koncentracije IL-8 i MCP-1 za procenu aktivnosti monocita, odnosno IFN- γ za procenu
33 aktivnosti T limfocita, određene komercijalnim ELISA kitovima. Nakon toga su ukratko
34 opisane spektrofotometrijske metode za određivanje parametara oksidativnog stresa
35 (koncentracija MDA u eritrocitima i ukupnih tiola u serumu) i antioksidativne zaštite (aktivnost
36 CAT i GPx u eritrocitima) na prezentaciji i oporavku. Potom su ukratko opisane
37 spektrofotometrijske metode za određivanje nivoa testiranih proteina akutne faze –
38 koncentracija CER i HPT, odnosno aktivnost PON-1 na prezentaciji i oporavku. Nakon toga je
39 opisana metoda agarozne elektroforeze proteina seruma na prezentaciji i oporavku, za
40 evaluaciju aktivnosti B limfocita, odnosno plazmocita, na osnovu koncentracije γ globulina.
41 Nakon toga su ukratko opisane metoda zimografije, koja je korišćena za detekciju i procenu
42 nivoa zimogenih i aktivnih, kao i Western blota koji je korišćen za detekciju zimogenih
43 želatinaza (MMP-2 i MMP-9) u uzorcima seruma i plazme dobijene nakon inkubacije (24h,
44 37°C, 5% CO₂) izolovanih leukocita i pune krvi. Na kraju Materijala i metoda navedeni su
45 primenjeni statistički testovi: Wilcoxon test za uzorke na prezentaciji i oporavku, Mann-
46 Whitney U test za SIRS pozitivne i SIRS negativne pse na prezentaciji i oporavku, Kruskal-
47 Wallis test i post-hoc analiza za akutno inficirane i zdrave pse, Spearman-ovi koeficijenti
48 korelacija za definisanje povezanosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite
49 sa hematološkim parametrima, kao i za definisanje povezanosti nivoa proMMP-9 sa brojem
50 leukocita i trombocita kao i nivoom parazitemije na prezentaciji, odnosno za definisanje
51 povezanosti promena proMMP-9 sa promenama hematoloških i biohemijskih parametara
52 tokom kliničkog oporavka.

53 **Rezultati** su podeljeni na sedam poglavlja. U prvom poglavlju Rezultati hematoloških i
54 biohemijskih parametara i proteina akutne faze na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka
55 pasa inficiranih *B. canis* predstavljene su apsolutne vrednosti i izračunate relativne promene
56 za svaki ispitivani parametar. Pokazano je da su značajne promene koje se dešavaju u
57 periodu posle prezentacije, odnosno posle dve nedelje oporavka, vezane za porast svih
58 osnovnih parametara crvene krvne loze ($p<0,001$), porast broja leukocita ($p<0,001$) i
59 trombocita ($p<0,001$), porast koncentracije ukupnih proteina ($p=0,003$) i albumina ($p<0,001$),
60 pad aktivnosti AST ($p<0,001$), porast aktivnosti ALP ($p=0,049$) i GGT ($p=0,007$), pad

1 koncentracije CER ($p=0,012$) i porast aktivnosti PON-1 ($p<0,001$). Takođe, na osnovu
2 definisanih kriterijuma za SIRS, formirane su SIRS pozitivna ($n=12$) i SIRS negativna ($n=12$)
3 grupa pasa. Pokazano je da između ove dve grupe pasa nema razlika u relativnim
4 promenama crvene krvne slike, broja trombocita i koncentracije proteina akutne faze na
5 prezentaciji i nakon dve nedelje oporavka, a za biohemijske parametre je pokazana
6 značajnost samo za relativnu promenu AST ($p=0,014$). **U drugom poglavlju** koje nosi naslov
7 Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita testovima fagocitoze i
8 oksidativnog praska je pokazano da je broj neutrofila koji imaju sposobnost fagocitoze u
9 uslovima bez stimulatora ($p=0,012$) i sa 1000x razblaženim vakcinalnim SAB ($p<0,05$) veći
10 kod akutno inficiranih pasa. Takođe, veći broj neutrofilnih granulocita kod akutno inficiranih
11 pasa je imao sposobnost oksidativnog praska u uslovima sa ConA ($p=0,040$) i sa 100x
12 ($p<0,05$) i 1000x ($p<0,05$) razblaženim antigenima u odnosu na zdrave kontrole. **U trećem**
13 **poglavlju** koje nosi naslov Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita na osnovu
14 nivoa izlučenih citokina *in vitro*, prikazano je da se koncentracija IL-8 ne razlikuje u različitim
15 grupama i uslovima. Nasuprot tome, koncentracija MCP-1 izražena na ukupan broj leukocita
16 je bila veća kod akutno inficiranih pasa u uslovu bez dodatka stimulatora ($p=0,029$) i sa 10x
17 ($p<0,05$), 100x ($p<0,05$) i 1000x ($p<0,05$) razblaženim vakcinalnim SAB. Koncentracija MCP-
18 1 izražena na broj monocita se nije razlikovala između akutno inficiranih i zdravih pasa.
19 Koncentracija MCP-1 izražena na broj limfocita je bila veća kod akutno inficiranih pasa u
20 odnosu na zdrave pse u svakom od šest primenjenih tretmana ($p<0,001$). Koncentracija IFN- γ
21 izražena na ukupan broj leukocita je bila veća kod akutno inficiranih pasa u uslovu bez
22 dodatka stimulatora ($p<0,001$) i sa dodatkom rastvarača vakcine ($p<0,05$), 10x ($p<0,05$),
23 100x ($p<0,05$) i 1000x ($p<0,05$) razblaženim vakcinalnim SAB. Isti rezultati su dobijeni i nakon
24 što je koncentracija IFN- γ izražena na broj limfocita. **U četvrtom poglavlju** pod naslovom
25 Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih
26 pasa prirodno inficiranih *B. canis* prikazani su sledeći nalazi: broj neutrofilnih granulocita koji
27 mogu da fagocituju zimozan, kao i da obave oksidativni prasak se nije razlikovao između
28 SIRS pozitivnih i negativnih pasa. Koncentracija IL-8 i MCP-1 izražena na broj monocita se
29 takođe nije razlikovala između ispitivanih grupa. Nasuprot tome, kada je koncentracija MCP-1
30 izražena na ukupan broj leukocita i na broj limfocita, kao i koncentracija IFN- γ , pokazano je
31 da je u plazmi SIRS pozitivnih pasa ta koncentracija najviša, u plazmi SIRS negativnih nešto
32 niža, dok je u plazmi zdravih kontrolnih pasa bila najniža (MCP-1, $p=0,005$; IFN- γ , $p=0,004$).
33 **U petom poglavlju** koje nosi naslov Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i
34 antioksidativne zaštite pokazan je porast koncentracije MDA ($p=0,016$) i CAT ($p=0,016$) u
35 eritrocitima, kao i održavanje aktivnosti GPx u eritrocitima i koncentracije ukupnih tiola u
36 serumu tokom dvonedeljnog oporavka. Na prezentaciji je postojala pozitivna korelacija
37 između koncentracije MDA i aktivnosti GPx u eritrocitima ($\rho=0,810$; $p=0,015$), kao i
38 koncentracije HPT u serumu i hemoglobina u krvi ($\rho=0,829$; $p=0,042$). Negativna korelacija
39 je pokazana između koncentracije tiola u serumu i broja leukocita u punoj krvi ($\rho=-0,943$;
40 $p=0,005$). Nakon oporavka, održala se pozitivna korelacija između koncentracije MDA i
41 aktivnosti GPx u eritrocitima ($\rho=0,964$; $p<0,001$), i pokazana je pozitivna korelacija između
42 aktivnosti CAT i GPx u eritrocitima ($\rho=0,786$; $p=0,036$), kao između koncentracije tiola u
43 serumu i broja limfocita u punoj krvi ($\rho=0,881$; $p=0,004$). Analiza relativnih promena između
44 prezentacije i oporavka pokazala je pozitivnu korelaciju između koncentracije MDA i aktivnosti
45 GPx ($\rho=0,857$; $p=0,014$), koncentracije tiola u serumu i broja eritrocita ($\rho=0,943$;
46 $p=0,005$), odnosno koncentracije hemoglobina u punoj krvi ($\rho=0,886$; $p=0,019$). Nivo
47 proteina akutne faze nije bio u korelaciji sa stepenom oksidativnog oštećenja. **U šestom**
48 **poglavlju**, Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnih γ -globulina i ostalih proteinskih frakcija
49 u serumu pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka, opisano je da je koncentracija γ
50 globulina bila viša posle dve nedelje oporavka nego na prezentaciji ($p=0,003$) kao i da nije
51 bilo razlike u njihovoj koncentraciji u serumu SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa. Takođe,
52 pokazani su rezultati ostalih detektovanih frakcija na gelu agaroze: povišenje albumina
53 ($p=0,004$), $\alpha 1$ ($p=0,020$) i $\alpha 2$ globulina ($p<0,001$), kao i koncentracija β globulina koja se nije
54 menjala tokom perioda oporavka. **U sedmom poglavlju** Rezultati ispitivanja prisustva i
55 aktivnosti želatinolitičkih matriks metaloproteinaza, prikazan je zimogram seruma pasa na
56 prezentaciji i oporavku na kojem se vidi prisustvo slabijeg signala proMMP-9, MMP-9 i
57 proMMP-2 na prezentaciji u odnosu na oporavak, dok MMP-2 nije detektovana. Potom je
58 pokazano da su u serumu akutno inficiranih pasa nivoi proMMP-2 ($p<0,001$) i proMMP-9
59 ($p<0,001$) niži nego posle dve nedelje oporavka, ali da se aktivnost MMP-9 ne menja. Na
60 prezentaciji je pokazana jaka pozitivna korelacija između ukupnog broja leukocita ($\rho=0,704$;

1 $p < 0,001$), odnosno neutrofilnih granulocita i nivoa proMMP-9 ($\rho = 0,741$; $p < 0,001$), kao i jaka
2 negativna korelacija između stepena parazitemije i nivoa proMMP-9 ($\rho = -0,616$; $p = 0,009$).
3 Dalje je pokazano da su SIRS pozitivni pacijenti imali manju relativnu promenu nivoa
4 proMMP-2 u odnosu na SIRS negativne pacijente ($p = 0,038$) kada se porede vrednosti
5 dobijene na prezentaciji i oporavku. Potom su pokazane korelacije između relativne promene
6 nivoa proMMP-2 i relativne promene broja eritrocita ($\rho = 0,451$; $p = 0,027$), koncentracije
7 hemoglobina ($\rho = 0,445$; $p = 0,029$) i hematokritske vrednosti ($\rho = 0,491$; $p = 0,015$) tokom
8 perioda oporavka, kao i korelacija između relativne promene nivoa proMMP-9 i relativne
9 promene aktivnosti AST tokom oporavka ($\rho = -0,461$; $p = 0,035$). Nivo proMMP-9 i MMP-9
10 izražen na ukupan broj leukocita pokazao je više vrednosti u grupi akutno inficiranih pasa u
11 uslovu bez dodatka stimulatora i sa $10\times$ razblaženim vakcinalnim SAB (proMMP-9, $p < 0,001$;
12 MMP-9, $p = 0,008$). U uzorcima plazme posle 24-časovne inkubacije pune krvi pokazan je viši
13 nivo proMMP-9 i MMP-9 izražen na ukupan broj leukocita između SIRS pozitivnih, odnosno
14 SIRS negativnih i zdravih pasa (proMMP-9, $p = 0,009$; MMP-9, $p = 0,022$). Nakon toga, prikazan
15 je zimogram supernatanta 24-časovne kulture leukocita pasa na kome se vidi signal koji
16 odgovara proMMP-9, dok signal za proMMP-2 nije bio prisutan. Potom, prikazani su rezultati
17 detektovanih proMMP-2 i proMMP-9 u serumu obolelih pasa metodom Western blota.

18 **Diskusija** sadrži analizu a) promene laboratorijskih parametara, proteina akutne faze,
19 oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, koncentracije γ globulina i prisustva i aktivnosti
20 želatinolitičkih MMP u krvi pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka pasa inficiranih *B.*
21 *canis*; b) funkcionalne aktivnosti leukocita ispitane *in vitro* u kulturama pune krvi bez i sa
22 dodatkom solubilnih antigena *B. canis*; c) uticaja SIRS na funkcionalnu aktivnost leukocita.
23 Svaka celina sadrži objašnjenja vezana za sve ispitivane parametre, navode iz literature koji
24 ih potkrepljuju kao i brojna originalna zapažanja kandidata.

25 U **Literaturi** je navedeno 345 bibliografskih jedinica.

26 27 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 28 **disertaciji):**

- 29
30 1. Kod pasa sa nekomplikovanom babeziozom usled prirodne infekcije protozooom *B.*
31 *canis* mogu se uočiti sledeće promene funkcionalne aktivnosti leukocita u perifernoj
32 krvi:
 - 33 a. Fagocitna aktivnost neutrofilnih granulocita u bazalnim uslovima i nakon *in*
34 *vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis* je izraženija nego kod zdravih
35 pasa. Analogne razlike u intenzitetu oksidativnog praska se uočavaju samo
36 nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. Prisustvo SIRS nije
37 povezano sa opisanim razlikama.
 - 38 b. T limfociti sekretuju veću količinu IFN- γ u odnosu na zdrave pse kako u
39 bazalnim uslovima, tako i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B.*
40 *canis*. Nivo IFN- γ je najviši kod SIRS pozitivnih pasa.
 - 41 c. Ukupni leukociti sekretuju veću količinu MCP-1 u odnosu na zdrave pse kako
42 u bazalnim uslovima, tako i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom
43 *B. canis*. Prisustvo SIRS nije povezano sa opisanim razlikama.
- 44 2. Tokom nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije protozooom *B. canis*
45 ukupni leukociti obolelih pasa nisu stimulisani da izlučuju veće količine IL-8 u
46 poređenju sa zdravim psima.
- 47 3. *In vitro*, leukociti pasa ne luče proMMP-2, ali luče proMMP-9 i MMP-9. Leukociti
48 obolelih pasa, a posebno SIRS pozitivnih, *in vitro* luče više proMMP-9 i MMP-9 u
49 poređenju sa leukocitima zdravih pasa, kako u bazalnim uslovima, tako i nakon
50 kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. *In vivo*, u serumu pasa sa
51 nekomplikovanom babeziozom, nivo proMMP-9 je niži nego na oporavku. Nivo
52 proMMP-9 u serumu nije povezan sa prisustvom SIRS.
- 53 4. Oporavak od nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije protozooom *B. canis*
54 prati diferencijacija B limfocita u plazma ćelije koje sintetišu imunoglobuline, na šta
55 ukazuje porast koncentracije γ globulina u serumu obolelih pasa. Porast te
56 koncentracije se ne razlikuje između SIRS pozitivnih i negativnih pasa.
- 57 5. Porast koncentracije malondialdehida u eritrocitima je odraz oksidativnog oštećenja
58 eritrocita tokom oporavka od nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije
59 protozooom *B. canis*. Istovremeni porast aktivnosti katalaze i stabilna koncentracija
60 tiola u serumu pokazatelji su očuvanosti antioksidativne zaštite tokom istog perioda.

1 Nivo proteina akutne faze i prisustvo SIRS nije povezano sa stepenom oksidativnog
2 oštećenja.
3 6. Sveobuhvatno posmatrano, rezultati upućuju na zaključak da je aktivnost neutrofilnih
4 granulocita i limfocita kod SIRS pozitivnih i negativnih pasa sa nekomplikovanom
5 babeziosom pojačana, ali da se stepen oštećenja tkiva ne razlikuje između ove dve
6 grupe, najverovatnije zahvaljujući tome što su zaštitni mehanizmi adekvatno očuvani.

7
8 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
9 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
10 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

11
12 Komisija smatra da su dobijeni rezultati ispitivanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji u
13 skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja i da zaključci proizilaze iz dobijenih
14 rezultata.

15
16 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

17
18 1. **Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

19
20 Doktorska disertacija napisana je u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

21
22 2. **Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

23
24 Doktorska disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

25
26 3. **Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

27
28 Ovo je prvo istraživanje koje se odnosi na ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod
29 pasa sa reakcijom akutne faze usled prirodne infekcije *B. canis*. Rezultati ove studije se mogu
30 koristiti kao osnova za razvijanje testa za dijagnostiku infekcije *B. canis* kod asimptomatskih
31 pasa, a na osnovu lučenja IFN- γ *in vitro*, posle kratkoročne inkubacije pune krvi ispitanika.

32
33 4. **Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
34 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne):** Ne.

35
36 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
37 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
38 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
39 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
40 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

41
42 Kristina Spariosu, Filip Janjić, Jelena Francuski Andrić, Milena Radaković, Anđelo Beletić,
43 Milica Kovačević Filipović, Svetlana Milanović, 2021. Relationship between changes in
44 hematological parameters, levels of acute phase proteins and redox homeostasis during
45 acute *Babesia canis* infection in dogs. Acta Veterinaria Beograd, 71 (2): 158-169.

46 Impakt faktor časopisa (2020): 0,800

47 Rad u međunarodnom časopisu, kategorija M23

48
49 Kristina Spariosu, Lazar Marković, Milena Radaković, Jelena Francuski Andrić, Anđelo
50 Beletić, Milica Kovačević Filipović, 2021. *In vitro* functional activity of neutrophils and
51 lymphocytes of dogs with acute *Babesia canis* infection. 7th European Veterinary Immunology
52 Workshop, 29-31 August 2021 (*online conference*).

53 Rad na međunarodnom kongresu, kategorija M34

54 **X PREDLOG:**

55
56 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
57 **ponuđenih mogućnosti):**

58 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana.
59

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

DATUM

25.08.2021. godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

dr Milica Kovačević Filipović, *redovni profesor*
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Milanović, *vanredni profesor*
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

dr Vanja Krstić, *redovni profesor*
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

dr Milena Radaković, *naučni saradnik*
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

dr Anđelo Beletić, *naučni saradnik
i specijalista medicinske biohemije*
Centar za medicinsku biohemiju
Univerzitetski klinički centar Srbije