

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 1. **Датум и назив органа који је именовео комисију:** 25.11.2015. Наставно-научно
10 веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду

11
12 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
13 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
14 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

15
16 1. Др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор, Патолошка морфологија, 2005,
17 Факултет ветеринарске медицине, Београд.

18 2. Др Никола Поповић, редовни професор, Болести дивљих животиња, копитара и
19 месоједа, 2002, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

20 3. Др Јевросима Стевановић, ванредни професор, Биологија, 2015, Факултет
21 ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

22 4. Др Дарко Маринковић, доцент, Патологија, 2011, Факултет ветеринарске медицине,
23 Универзитет у Београду

24 5. Др Иван Павловић, научни саветник, Паразитологија, 2007, Научни институт за
25 ветеринарство Србије, Београд

26
27 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

28
29 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Јожеф (Јожеф) Езвеђ - József (József) Özvegy

30
31 2. **Датум рођења, општина, Република:** 10.09.1960., Кањижа, Србија

32
33 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:** 16.12.2005. године, Факултет
34 ветеринарске медицине у Београду. "Испитивање патолошких промена на кожи и
35 коштаном-скелетном систему барских корњача из природних станишта"

36
37 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**
38 Патологија и терапија животиња

39
40 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** " Морфолошке промене у ткивима барских
41 корњача (*Emys orbicularis*) природно инфицираних хемопаразитом *Haemogregarina*
42 *stepanowi* и молекуларно - генетичка идентификација узрочника "

43
44 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
45 **шема, графикона и сл.):**

46 Докторска дисертација мр Јожефа Езвеђа, "Морфолошке промене у ткивима барских
47 корњача (*Emys orbicularis*) природно инфицираних хемопаразитом *Haemogregarina*
48 *stepanowi* и молекуларно - генетичка идентификација узрочника " написана је на 98
49 страна А4 формата и садржи 10 табела, 47 слика и 5 графикона. Дисертација садржи
50 следећа поглавља: Увод (4 стране), Преглед литературе (26 страна), Циљ и задаци (1
51 страна), Материјал и методе (12 страна), Резултати (35 страна), Дискусија (6 страна),
52 Закључци (1 страна) и Литература (128 референци, 13 страна). Дисертација на почетку
53 садржи кратак садржај на српском и енглеском језику (4 стране) и Скраћенице (1
54 страна).

55
56 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
57 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
58 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**

1 У **Уводу** кандидат износи да рептили могу бити домаћини за различите врсте
2 крвних, пре свега интраеритроцитних паразита укључујући протозое. Хемопаразити
3 барске корњаче, прилагођени су варијацијама телесне температуре домаћина,
4 репродуктивним и генетским карактеристикама као и миграторним навикама. Паразити
5 из рода *Haemogregarina* су описани до сада код шумских и слатководних корњача, ретко
6 се налазе код корњача са меканим оклопом и никада нису установљени код морских
7 корњача. У случају водених рептила, тј. код барске корњаче, најчешће се као прави
8 домаћини помињу пијавице, а ређе крпељи и комарци. У нашој земљи до сада не
9 постоје подаци о инфекцији хемогрегаринома код заштићене врсте барске корњаче
10 (*Emys orbicularis*), ни у природним стаништима, а ни у контролисаним условима (зоо врт
11 и карантин). Још мање је познат молекуларно-генетички идентитет узрочника, а затим и
12 морфолошке и имунофенотипске промене на ткивима природно инфицираних барских
13 корњача. Детаљније изучавање инфекције хемопаразитима из рода хемогрегаринома, код
14 заштићене врсте барске корњаче *Emys orbicularis*, ближе ће дефинисати цитолошке
15 промене у крвном размазу позитивних животиња, а такође ће допринети одређивању
16 карактера макроскопских и микроскопских лезија у различитим ткивима. У нашој земљи
17 осим непознате молекуларно-генетичке идентификације узрочника, недостају подаци о
18 потенцијалним векторима и о томе какву опасност они носе за друге животиње и
19 човека. Резултати ових испитивања могли би такође, да обезбеде ефикаснију
20 превентиву и терапију.

21
22 **Преглед литературе** представља синтезу радова који се односе у мањем броју
23 на макроскопске и микроскопске промене у ткивима корњача инфицираних
24 хемопаразитима и већег броја публикација које описују цитолошки налаз и развојне
25 стадијуме паразита у крви инфицираних корњача, као и етиопатогенезу и клиничке
26 манифестације обољења изазваних хемопаразитима из рода *Haemogregarina*. Поред
27 тога, литературни подаци се односе на могућности примене молекуларно-генетичке
28 идентификације узрочника *Haemogregarina stepanowi*. У овом поглављу се наглашава
29 значај цитолошких и молекуларних испитивања али и улога вектора (пијавица и
30 крпеља) у ширењу инфекције у популацији рептила у контролисаним условима и у
31 природним стаништима. Кандидат такође износи значај хематолошког и цитолошког
32 прегледа крви рептила, као и заступљеност и карактеристике крвних ћелија рептила,
33 вредности биохемијских параметара и утицај разних фактора на поменуте вредности.

34
35 **Циљ** ове дисертације био је да се утврди присуство и молекуларно-генетичка
36 идентификација хемопаразита рода *Haemogregarina* из фамилије *Haemogregarinidae*
37 код заштићене врсте барске корњаче - *Emys orbicularis* и потом испита карактер ткивних
38 лезија код угинулих природно инфицираних јединки. Постављен је задатак да се опишу
39 клиничке манифестације, цитолошке, морфолошке и имунофенотипске промене код
40 инфицираних барских корњача, пореклом из природних станишта, а тренутно збринутих
41 у карантину Зоолошког врта у Београду.

42
43 У поглављу **Материјал и методе** наводи се да је испитивањима обухваћено 36
44 барских корњача (*Emys orbicularis*), оба пола, старости од 5 до 15 година. Шест
45 клинички здравих корњача од 36 испитаних, код којих у размазима крви нису уочени
46 хемопаразити служиле су као негативна контрола за хематолошке, биохемијске и
47 молекуларно-генетичке анализе из крви.

48 Све испитане јединке заштићене врсте *Emys orbicularis*, су после узимања крви
49 враћене у своје привремено станиште у складу са чл. 78. Закона о заштити природе
50 („Службени гласник РС“, бр.5/10, 47/11). За ову врсту испитивања је добијена дозвола -
51 решење бр. 119-01-13-2-2015-09 од 12.01.2015. од Министарства пољопривреде и
52 заштите животне средине. Угинуле корњаче су обдуковане, а органи узети за
53 хистопатолошка и имунохистохемијска испитивања.

54
55 Кандидат је применио следеће методе:

- 56
- 57 • Клинички преглед, обележавање и биометријска испитивања барских
 - 58 корњача .
 - 59 • Узорковање крви пункцијом субвертебралног венског плексуса.
 - 60 • Бојење крвног размаза методом Diff Quick и цитолошко испитивање.

- 1 • Хематолошке анализе
- 2 • Биохемијске анализе: ALT, AST , глюкоза; гвожђе (FERROZINE метода);
- 3 калцијум (ARSENZO метода); Фосфор (UV спектрофокометрија); укупни протеини
- 4 (BIURET метода) - уређај за биохемију - Biosystems A15.
- 5 • PCR метода за молекуларно генетичко доказивање присуства паразита
- 6 *Haemogregarina stepanowi* у крви испитиваних корњача, применом комерцијалног сета
- 7 „KAPA Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa)
- 8 према протоколу произвођача. Амплификација 1500 bp дугачког фрагмента једарне 18S
- 9 rDNK паразита урађена је применом специфичних прајмера EF: (5'-
- 10 GAAACTGCGAATGGCTCATT-3') и ER: (5'-CTTGCGCCTACTAGGCATTC-3') према
- 11 протоколу Dvorakova i sar. (2014). Визуелизација продуката извршена је после
- 12 електрофорезе на 1.5% агарозном гелу и бојења етидијум бромидом. Након
- 13 амплификације и визуелизације амплификата узорци су послати на секвенционирање у
- 14 циљу испитивања нуклеотидне секвенце.
- 15 • Обдукција и макроскопско испитивање промена на органима угинулих
- 16 јединки.
- 17 • Узорковање ткивних исечка јетре, слезине, плућа, бубрега, срца и коже,
- 18 фиксирање у пуферизованом формалину, аутоматско процесовање, калупљење и
- 19 сечење на микротому (дебљина исечка 4 до 6 µm).
- 20 • Рутинско хистолошко бојење исечка (хематоксилин еозин - HE)
- 21 • Имунохистохемијско бојење исечка ткива фиксираних у формалину
- 22 (LSAB2 техником) коришћењем моноклонских антитела за CD3, α SMA и одговарајућих
- 23 секундарних антитела, хромогена за визуелизацију DAB, медијума за испирање и
- 24 растварање антитела. Демаскирање антигена урађено је загревањем у цитратном
- 25 пуферу (pH 6, 21 мин, 560 W).
- 26 • Статистичка испитивања математичко-статистичким методама уз
- 27 процену значајности: у статистичкој анализи добијених резултата рађени су
- 28 дескриптивни статистички параметри (аритметичка средина, стандардна девијација,
- 29 стандардна грешка, минимална и максимална вредност и коефицијент варијације). За
- 30 испитивање значајности разлика између испитаних група коришћен је одговарајући тест
- 31 (ANOVA и Tukey). Сигнификантност разлика установљена је на нивоима 5% и 1%.
- 32 Статистички пакет: PrismaPad 5,00. Добијени резултати приказани су табеларно и
- 33 графички.

34
35 Наведена испитивања су урађена на *Факултету ветеринарске медицине,*

36 *Београд (Катедра за патологију и Катедра за биологију) и Зоолошком врту града*

37 *Београда.*

38

39

40

41 Оригинални подаци који су добијени у овој дисертацији изнети су у поглављу

42 **Резултати**, а приказани су текстуално, сликама, табеларно и графикама.

43 Молекуларно-генетичком анализом (PCR методом) кандидат је први пут доказао

44 присуство *Haemogregarina stepanowi* код заштићене врсте барске корњаче (*Emys*

45 *orbicularis*) у Србији. Применом прајмера EF: (5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT-3') и ER:

46 (5'-CTTGCGCCTACTAGG- CATTC-3') амплификовани су 1500 bp дугачки фрагменти

47 једарне 18S rDNK. Након визуелизације на 1,5% агарозном гелу, амплификати су били

48 присутни код 30 одраслих корњача, 15 мужјака и 15 женки, привремено смештених у

49 карантину Зоо-врта Београд, а пореклом из природних станишта. У току молекуларно-

50 генетичке идентификације узрочника, након амплификације жељеног сегмента ДНК

51 паразита, добијени амплификати су искоришћени за секвенционирање сегмента гена

52 одговорног за синтезу 18S рибозомалне ДНК. Резултати секвенционирања (Gen Bank

53 Number KT749877) потврдили су да су сви испитивани узорци 100% идентични

54 секвенцама 18S рибозомалне ДНК, које су претходно пријављене у генској бази

(KF257929.1, KF257927.1).

55 Клиничким прегледом код свих јединки инфицираних са *Haemogregarina*

56 *stepanowi* установљена је анемија, локомоторне сметње и анорексија. Хематолошке и

57 биохемијске анализе крви код инфицираних јединки показују статистички значајан пад

58 броја еритроцита и нивоа хемоглобина – средње негативна вредност варијабли

59 еритроцит-хемоглобин (-0,51), а биохемијска испитивања указују на снижен ниво

1 серумског гвожђа и средње позитивну вредност варијабли ALT-AST (0,51). Цитолошким
2 анализама установљено је присуство развојних облика (премеронт и гамонт)
3 *Haemogregarina stepanowi* у крвним размазима инфицираних барских корњача (*Emys*
4 *orbicularis*). Паразит у неким еритроцитима домаћина дислоцира једро, а у другим
5 еритроцитима се поставља око самог једра.

6 Имајући у виду оскудне податке о патоморфолошким променама код корњача
7 природно инфицираних хемопаразитима *Haemogregarina stepanowi*, у овом раду су
8 праћене патолошке промене у ткивима као и цитолошке промене у крвним размазима
9 позитивних животиња. Описан је карактер макроскопских и микроскопских лезија у
10 различитим ткивима. Кандидат истиче да су макроскопске промене на органима биле
11 видљиве у већем или мањем обиму код испитаних угинулих животиња, а доминирала
12 су субкарапаксијална крвављења у кожи, посебно наглашена у ингвиналној и
13 аксиларној регији, фокалне некрозе на пластрону и карапаксу, крвављења и хронична
14 грануломатозна инфламација у јетри и плућима и реактивна хиперплазија слезине. Као
15 резултат микроскопских испитивања, кандидат описује ткивне лезије различитог
16 интензитета у вези са инфекцијом хемогрегаринама: од благе инфламаторне реакције
17 праћене фокалном или дифузном инфилтрацијом ткива моноклеарним ћелијама, па
18 до хеморагије и едема плућа, интерстицијалне и/или грануломатозне пнеумоније. У
19 јетри је уочен грануломатозни хепатитис, у слезини је доминирала реактивна
20 хиперплазија, у срцу еозинофилни миокардитис, а у бубрезима, интерстицијални
21 нефритис. Едем и хеморагије били су редован микроскопски налаз у кожи и плућима
22 корњача инфицираних са *Haemogregarina stepanowi*. Имунохистохемијским
23 испитивањима у грануломима су поред макрофага били експримирани CD3+ Т
24 лимфоцити, окружени доминантно α SMA + миофибробластима.

25
26
27
28 У поглављу **Дискусија** кандидат анализира резултате добијене у истраживању,
29 и износи да је цитолошки преглед крвних размаза обојених Diff Quick методом
30 иницијални корак у постављању дијагнозе, односно у откривању присуства
31 хемопаразита код барске корњаче. У нашој земљи наине, до сада не постоје
32 публиковани резултати о инфекцији барских корњача (*Emys orbicularis*), хемопаразитом
33 *Haemogregarina stepanowi*, ни у природним стаништима а ни у контролисаним условима
34 (зоо вртови, карантин). У овој дисертацији су у оквиру молекуларно-генетичке
35 идентификације узрочника, након амплификације жељеног сегмента ДНК паразита,
36 добијени амплификати који су искоришћени за секвенционирање жељеног сегмента гена
37 одговорног за синтезу 18S рибозомалне ДНК. Резултати секвенционирања (Gen Bank
38 Number KT749877) потврдили су да су сви испитивани узорци 100% идентични
39 секвенцама 18S рибозомалне ДНК, које су претходно пријављене у генској бази
40 (KF257929. 1, KF257927.1). Клинички симптоми код инфицираних корњача нису
41 специфични, а још мање су познате морфолошке и имунофенотипске промене на
42 ткивима природно инфицираних барских корњача. Имајући у виду оскудне податке у
43 литератури о патоморфолошким променама код корњача природно инфицираних
44 хемопаразитима *Haemogregarina stepanowi*, у овом раду су детаљно описане
45 патолошке промене у ткивима као и цитолошке промене у крвним размазима
46 позитивних животиња. Кандидат је детаљно описао карактер макроскопских и
47 микроскопских лезија у различитим ткивима поредећи налаз са оскудним подацима из
48 литературе који се односе углавном на друге врсте рептила инфицираних
49 хемопаразитима. Кандидат такође налази да недостају подаци о потенцијалним
50 векторима код нас, а из литературе није јасно какву опасност они носе за друге
51 животиње и човека. Изучавање промена код барских корњача природно инфицираних
52 хаемогрегаринама је веома атрактивна тема и са становишта екологије, јер
53 посматрајући карактер патолошких промена код ових животиња добијамо вредне
54 податке и о степену загађења животне средине. Питања како делују загађења животне
55 средине на ове биолошке индикаторе, како корњаче реагују на одређене стресне и
56 измењене климатске ситуације, представљају само неке од изазова за будућа
57 истраживања. Свакако је од посебног значаја и чињеница да је барска корњача (*Emys*
58 *orbicularis*) једина врста водене корњаче која је распрострањена на нашим просторима
59 и уз то је заштићена животињска врста.

1
2 Поглавље **Литература** садржи 128 библиографских јединица углавном из
3 стране литературе.

4
5
6
7
8 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА**

- 9
10
11
12 1. Молекуларно-генетичком анализом (*PCR* методом) у Србији је први пут
13 доказано присуство *Haemogregarina stepanowi* код 30 примерака заштићене
14 врсте барске корњаче (*Emys orbicularis*).
15
16 2. Клиничким прегледом код свих јединки инфицираних са *Haemogregarina*
17 *stepanowi* установљена је анемија, локомоторне сметње и анорексија.
18 Хематолошке и биохемијске анализе крви показују статистички значајан пад
19 броја еритроцита и нивоа хемоглобина ($p < 0,01$) код OG2 у односу на OG1, а
20 биохемијска испитивања код обе групе указују на пад нивоа серумског гвожђа у
21 односу на референтне вредности ($p > 0,05$).
22
23 3. Цитолошким анализама крвних размаза барских корњача (*Emys orbicularis*)
24 инфицираних са *Haemogregarina stepanowi* установљено је присуство
25 интраеритроцитних развојних облика (премеронт и гамонт). Паразит је негде
26 дислоцирао једро еритроцита домаћина или се у неким еритроцитима налазио
27 око једра.
28
29 4. Доминантне макроскопске промене у органима корњача инфицираних са
30 *Haemogregarina stepanowi* биле су: крвављење у кожи ингвиналне и аксиларне
31 регије, фокалне некрозе на пластрону и карапаксу, хронична грануломатозна
32 инфламација у јетри и плућима и реактивна хиперплазија слезине.
33
34 5. Доминантне микроскопске промене у ткивима корњача инфицираних са
35 *Haemogregarina stepanowi* биле су: интерстицијална и/или грануломатозна
36 пнеумонија, грануломатозни хепатитис, реактивна хиперплазија слезине,
37 еозинофилни миокардитис и интерстицијални нефритис. Имунохистохемијским
38 испитивањима у грануломима је уочена експресија CD3+ Т лимфоцита,
39 окружених α SMA + миофибробластима.
40

41
42
43 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

44
45 Резултати истраживања су приказани текстуално и документовани су са 47 слика, 10
46 табела и 5 графикона. Текст је написан концизно, јасним и разумљивим стилем.
47 Резултати су правилно и критички тумачени.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

1 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

2
3 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
4 **теме?**

5 Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави. Примењене
6 методе испитивања су стандардизоване и прилагођене циљу и задацима дисертације,
7 наведеним у пријави теме.

8
9 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
10 **дисертацију?**

11 Дисертација садржи све битне елементе који се захтевају за завршену докторску
12 дисертацију.

13
14 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

15
16 Оригиналан допринос науци ове дисертације огледа се у дефинисању молекуларно-
17 генетичких и морфолошких параметара значајних за дијагнозу инфекције
18 хемопаразитом *Haemogregarina stepanowi* код заштићене врсте барске корњаче (*Emys*
19 *orbicularis*) први пут у Србији, са посебним освртом на цитолошки налаз као иницијални
20 корак у постављању дијагнозе.
21
22
23
24

25 ДАТУМ

26 09.12.2015.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

27
28
29 1. Др Сања Алексић-Ковачевић, ред. професор
30 Факултет ветеринарске медицине, Београд

31
32
33 2. Др Никола Поповић, ред. професор
34 Факултет ветеринарске медицине, Београд

35
36
37 3. Др Јевросима Стевановић, ван. професор
38 Факултет ветеринарске медицине, Београд

39
40
41 4. Др Дарко Маринковић, доцент
42 Факултет ветеринарске медицине, Београд

43
44
45 5. Др Иван Павловић, научни саветник
46 Научни институт за ветеринарство Србије,
47 Београд
48
49