

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Zorana Z. Milanović

**DISPROTEINEMIJA I  
DISLIPOPROTEINEMIJA TOKOM  
ODGOVORA AKUTNE FAZE KOD PASA  
PRIRODNO INFICIRANIH SA *BABESIA*  
*CANIS***

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Zorana Z. Milanović

**DISPROTEINEMIA AND  
DISLIPOPROTEINEMIA DURING ACUTE  
PHASE RESPONSE IN DOGS  
NATURALLY INFECTED WITH *BABESIA*  
*CANIS***

PhD Thesis

Belgrade, 2018.

Članovi komisije,

Mentor: Dr Milica Kovačević Filipović, redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu

---

Drugi mentor: Dr Petar Ivanovski, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

---

Dr Svetlana Milanović, docent Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu

---

Dr Anđelo Beletić, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu

---

Datum odbrane:-----

## *Zahvalnica*

Ovom svečanom prilikom želim da izrazim zahvalnost svom mentoru profesorki Milici Kovačević Filipović koja mi je pružila ruku i uvela me u čarobni svet nauke i tokom godina korak po korak, strpljivo i požrtvovano izgradila ovu doktorsku disertaciju i mene kao mladog naučnika i čoveka.

Posebnu zahvalnost dugujem i:

Dr Nebojši Dovezenskom na prenesenom teoretskom i praktičnom znanju iz oblasti elektroforeze, savetima i podršci.

Veterinaru Vladimiru Radonjiću na nesebičnoj pomoći oko prikupljanja uzoraka, bez koga realizacija ove disertacije ne bi bila moguća.

Dr Jeleni Vekić i njenim koleginicama sa Katedre za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su mi omogućili da deo analiza uradim u njihovoj laboratoriji.

Dr Ljiljani Hajduković i njenim koleginicama sa INEP-a na realizaciji dela analiza i veoma prijatnoj saradnji.

Dr Anđelu Beletiću na savetima i pomoći u praktičnom radu.

Dr Svetlani Milanović na savetima, pomoći i konstruktivnim kritikama.

Dr Vesni Ilić sa Instituta za medicinska istraživanja Beograd na pomoći i savetima.

Koleginici Anji Ilić i mojoj prijateljici Jeleni Popović na razumevanju, moralnoj i psihološkoj podršci.

Dr Sanji Vranješ Đurić na razumevanju i podršci.

IDEXX laboratoriji na pomoći oko PCR analize i finansijskoj podršci.

Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru čijeg projekta (OI 175061) je urađena ova doktorska disertacija.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici Zoranu, Mileni, Jeleni, Dimitrisu, Tanasisu i Jani.

Zorana

## **DISPROTEINEMIJA I DISLIPOPROTEINEMIJA TOKOM ODGOVORA AKUTNE FAZE KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH SA *BABESIA CANIS***

### **Rezime**

Najveći broj ispitivanja kod ljudi i životinja ukazuje da tokom odgovora akutne faze dolazi do pada albumina, a povećanja  $\alpha$  i  $\beta$ -globulina, dok su rezultati vezani za promenu koncentracije lipida i lipoproteina manje ispitivani. Ipak, poznato je da se kod teških inflamacija najčešće javlja poremećaj reverznog transporta holesterola praćen padom lipoproteina visoke gustine (*engl. High density lipoprotein - HDL*) i apolipoproteina A-I (*engl. Apolipoprotein A-I - ApoA-I*) koji predstavlja njegov glavni apoprotein. ApoA-I se zbog toga smatra negativnim proteinom akutne faze. Istovremeno dolazi do porasta seruma amiloida A (*engl. Serum amyloid A – SAA*) koji takođe ima funkciju apoproteina HDL-a. Detaljno ispitivanje promena pojedinih frakcija proteina i lipoproteina kao i promene u apoproteinima u toku odgovora akutne faze kod pasa, izazvan infekcijom sa *B. canis* nisu do sada opisane.

Ovo istraživanje je izvedeno na višku uzoraka krvi od 30 pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* i 15 zdravih kontrolnih pasa. Određeni su hematološki i biohemijski parametri krvi i seruma, potom je izvedena elektroforeza na agaroznom gelu i analizirane su proteinske i lipoproteinske frakcije seruma. Uz primenu poliakrilamid gradijent gel elektroforeze su dobijeni podaci o dominantnim dijametrima lipoproteina seruma, a upotrebom imunoenzimskog testa (*engl. Enizime linked immunosorbent assay – ELISA*) i radioimunoeseja (*engl. Radioimmunoassay – RIA*) testa su određene koncentracije SAA i ApoA-I.

Najzastupljenije hematološke promene kod pasa akutno inficiranih sa *B. canis* su bile trombocitopenija i leukopenija. Koncentracija ukupnih proteina i triglicerida nije bila promenjena dok je koncentracija holesterola bila snižena. Disproteinemija se ogledala u smanjenju koncentracije  $\alpha$ 1- globulinske frakcije, dok ostale frakcije nisu bile promenjene. Dislipidemija se ogledala u smanjenom relativnom udelu  $\alpha$ 1- lipoproteinske frakcije u ukupnim  $\alpha$ -lipoproteinima. Osim toga pokazano je da se tokom odgovora akutne faze povećava dijametar lipoproteina koji spadaju u HDL. Koncentracija oba proteina akutne faze - SAA i ApoA-I je bila povećana.

Navedene promene nisu tipične za odgovor akutne faze te zbog toga smatramo

da odgovor akutne faze kod pasa inficiranih sa *B. canis* predstavlja jedinstven model za ispitivanje promena u metabolizmu lipida i lipoproteina u uslovima kada postoji paralelno povećanje ApoA-1 i SAA.

**Ključne reči: inflamacija, proteini akutne faze, HDL, LDL, serum amiloid A, apolipoprotein A-I**

**Naučna oblast: Veterinarska medicina**

**Uža naučna oblast: Patološka fiziologija**

**UDK broj: 619:593.1:599.742.1**

## **DYSPROTEINEMIA AND DYSLIPOPROTEINEMIA DURING ACUTE PHASE RESPONSE IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *BABESIA CANIS***

### **Abstract**

In humans and animals acute phase response (APR) is characterized by decrease in albumines and increase in  $\alpha$  i  $\beta$ -globulines. Changes in lipids and lipoproteins are less known. During severe inflammatory events high density lipoproteins (HDL) and it's major apoprotein apolipoprotein A-I (ApoA-I) are significantly decreased.

ApoA-I is considered as negative acute phase protein. Serum amyloid A (SAA) which also has apoprotein function is increased. Detail examination of protein and lipoprotein fractions changes during APR in *B. canis* infection in dogs were not done.

Present study was done on surplus material (blood and sera) from 30 dogs naturally infected with *B. canis* and 15 healthy dogs. Biochemistry and hematology parameters were determined, protein and lipoproteins were separated electrophoretically on agarose gels, and their dominant diameters were determined using polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Concentrations of SAA and ApoA-I were determined using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA) tests.

Detected hematology changes in sick dogs were thrombocytopenia and leucopenia. Total protein and triglyceride concentration were unchanged in sick dogs, and total cholesterol and phospholipids were decreased.

Dysproteinemia was characterized by drop in  $\alpha$ 1-globuline fraction. Detected dyslipidemia included decrease in relative portion of  $\alpha$ 1-lipoprotein in relation to total  $\alpha$ -lipoproteins. During APR, the dominant diameter of HDL in sick dogs was increased. Concentration of SAA and ApoA-I was increased. Those changes are not typical for APR. Based on this results we consider that APR in dogs infected with *B. canis* represent unique model for examination of lipid and lipoprotein metabolism when there is increase in both SAA and ApoA-I.

**Key words: inflammation, Acute phase proteins, HDL, LDL, Serum amyloid A, apolipoprotein A-I**

**Scientific area: Veterinary medicine**

**Specific scientific field: Pathophysiology**

**UDK number: 619:593.1:599.742.1**

*Lista skraćenica korišćenih u tekstu*

APR - *Acute phase response* (Odgovor akutne faze)

SIRS - *Systemic inflammatory response syndrome* (Sindrom sistemskog inflamatornog odgovora)

HDL - *High density lipoproteins* (Lipoproteini velike gustine)

VLDL - *Very low density lipoproteins* (Lipoproteini vrlo niske gustine)

LDL - *Low density lipoproteins* (Lipoproteini niske gustine)

TRL - *Tryglyceride rich lipoproteins* (Trigliceridima bogati lipoproteini)

CETP - *Cholesteryl ester transfer protein* (Holesterol estar transfer protein)

ApoA-I - *Apolipoprotein A-I* (Apolipoprotein A-I)

ABCA1 - *Adenosine triphosphate cassette transporter A 1* (Adenzin tri fosfat vezujući kasetni transporter A 1)

ABCG1 - *Adenosine triphosphate cassette transporter G 1* (Adenzin tri fosfat vezujući kasetni transporter G 1)

SR-BI - *Scavenger receptor class B number 1* (

LCAT - *Lecithin cholesterol acyltransferase* (Lecitin holesterol acil transferaza)

SAA - *Serum amyloid A* (Serum amiloid A)

ACTH - *Adrenocorticotropic hormone* (Arenokortikotropni hormon)

IL – *Interleukin* (Interleukin)

TNF – *Tumor necrosis factor* (Tumor nekrozis faktor)

INF – *Interferon* (Interferon)

MODS - *Multiple organe dysfunction syndrome* (Sindrom višestrukog otkazivanja organa)

FPR2 - *N-formyl peptide receptor 2* (N- formil peptidni receptor 2)

NLRP3 - *Nucleotide-binding domain, leucine rich -containing family, pyrin domain - conataining 3* (Leucinom bogata familija proteina sa nukletid vezujućim domenom i pirin sadržećim domenom 3)

TLR - *Toll like receptor* (Receptor sličan proteinu koji kodira Toll gen kod drosophilae melanogaster)

RAGE - *Receptor for advanced glycation endproducts* (Receptor za krajnje proizvode



glikacije)

IDL - *intermediate density lipoproteins* (Lipoproteini srednje gustine)

TICE - *transintestinal cholesterol excretion* (Eksrecija holesterola putem creva)

LXR - *liver X receptor* (X receptor jetre)

LPL - *Lipoprotein lipase* (Lipoprotein lipaza)

HL - *Hepatic lipase* (Hepatična lipaza)

EL - *Endothelial lipase* (Endotelna lipaza)

TAG - *Triacylglycerol* (Triacilglicerol)

PLTP - *Phospholipid transfer protein* (Fosfolipidni transfer protein)

HMG-CoA reduktaz a- *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase* (3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A reduktaza)

LPS - *Lipopolysaccharide* (Lipopolisaharid)

CRP - *C reactive protein* (C reaktivni protein)

PON 1 - *Paraoxonase 1* (Paraoksonaza 1)

PAF - *Platelet-activating factor* (Faktor aktivacije trombocita)

BPI - *Bactericidal/permeability increasing protein* (Baktericidni protein koji povećava propustljivost)

ORCID - *Obesity related cardiac dysfunction* (Disfunkcija srca uslovljena gojaznošću)

KC - *Keratinocyte-derived chemokine* (Keratinocitni hemokin)

CAD - *Coronary artery disease* (Bolest koronarnih arterija)

PCR - *Polymerase chain reaction* (Lančana reakcija polimeraze)

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Imunoenzimski test)

IFAT - *Immunofluorescence antibody test* (Imunoflorescentni test)

RIA - *Radioimmunoassay* (Radioimunoesej)

PBS - *Phosphate-buffered saline* (Fosfatni pufer)

AP - *Alkaline phosphatase* (Alkalna fosfataza)

ALT - *Alanin aminotransferase* (Alanin aminotransferaza)

AST - *Aspartate aminotransferase* (Aspartat aminotransferaza)

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Odgovor akutne faze .....	3
2.2. Proteini akutne faze .....	8
2.3. Uloga elektroforetskog razdvajanja proteinskih frakcija seruma.....	9
2.4. Disproteinemija tokom infekcije sa <i>Babesia spp.</i> .....	9
2.5. Serum amiloid A (SAA).....	10
2.6. Građa i podela lipoproteina .....	12
2.7. Apoproteini.....	13
2.8. Karakteristike lipoproteina kod pasa.....	16
2.9. Metabolizam lipoproteina.....	17
2.10. Receptori za lipoproteine.....	18
2.11. Metabolizam apolipoproteina A-I (ApoA-I) i HDL.....	21
2.12. Povezanost proteina akutne faze i lipoproteina plazme tokom odgovora akutne faze.....	23
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	28
4. MATERIJAL I METODE.....	29
4.1. Životinje.....	29
4.2. Uzorkovanje krvi.....	30
4.3. Citološke analize.....	30
4.4. Molekularna dijagnostika.....	31
4.5. Hematološke analize.....	31
4.6. Kriterijumi za dijagnostiku sepse.....	31
4.7. Spektrofotometrijske analize.....	32
4.8. Određivanje koncentracije SAA.....	32
4.9. Horizontalna elektroforeza.....	32
4.9.1. Elektroforeza lipoproteina.....	32
4.9.2. Elektroforeza proteina.....	33
4.10. Vertikalna elektroforeza.....	33
4.11. Određivanje relativne koncentracije apolipoproteina A-I (ApoA-I).....	34
4.11.1. Vezivanje antitela i seruma za površinu plastike.....	35
4.11.2. Obeležavanje antitela radioaktivnim izotopom $I^{125}$ .....	35
4.11.3. Optimizacija uslova testa.....	35
4.12. Statistika.....	36
5. REZULTATI.....	37
5.1. Rezultati ispitivanja parametara bele i crvene krvne slike.....	37
5.2. Rezultati elektroforetski razdvojenih proteina .....	41
5.3. Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara.....	43
5.4. Rezultati ispitivanja lipida seruma .....	46
5.5. Rezultati ispitivanja lipoproteinskih frakcija seruma i dominantnih dijametara HDL-a i LDL-a .....	48
5.6. Rezultati ispitivanja koncentracije proteina akutne faze .....	53
6. DISKUSIJA.....	55
6.1. Hematološke i biohemijske promene.....	55
6.2. Disproteinemija.....	57

6.3. Promene lipidnog statusa i dislipoproteinemija .....	58
6.4. Promene koncentracije ApoA-I i SAA.....	62
7. ZAKLJUČCI.....	65
8. LITERATURA.....	66
9. PRILOG.....	88

## 1. UVOD

Odgovor akutne faze je deo nespecifične odbrane organizma i zajednički je fenomen koji nastaje kao rani odgovor organizma na dejstvo različitih etioloških faktora koja prouzrokuju oštećenje tkiva. Fenomen odovora akutne faze obuhvata vrlo kompleksne promene u različitim organima. U kliničkoj praksi, praćenjem pojedinih biološki aktivnih molekula, odgovor akutne faze se može stratifikovati, a stanje pacijenta pratiti, odnosno kada je to moguće, pacijentu se može pružiti adekvatna terapija.

Infekcija pasa sa protozom *Babesia canis* je često vektorski prenosivo oboljenje koje indukuje tipičan odgovor akutne faze kod pasa. Forma bolesti može biti nekomplikovana kada je najčešći ishod kliničko ozdravljenje, ili komplikovana, kada je čest letalan ishod. Od kada je utvrđeno da smrtni ishod nastaje kao posledica sindroma sistemskog inflamatornog odgovora, odnosno sepse, ovo oboljenje je ponovo dospelo u centar pažnje ispitivanja koja se bave regulacijom imunskog odgovora (Matijatko i saradnici, 2010).

U medicini, rutinski, za detekciju i praćenje odgovora akutne faze, koristi se određivanje koncentracije različitih proteina akutne faze. Gotovo dve decenije je poznato da određeni lipofilni proteini akutne faze, a pre svega serum amiloid A (SAA) i C reaktivni protein (CRP), ulaze u sastav lipoproteina (SAA u sastav HDL-a, CRP u sastav LDL-a) i utiču na njihove uloge u organizmu (Sammalkorpi i saradnici, 1990). Stoga se u medicini, tokom odgovora akutne faze, proteini akutne faze ispituju paralelno sa lipidima i lipoproteinima seruma. Ovakav sveobuhvatni pristup ispitivanja odgovora akutne faze doveo je do otkrića da su promene u metabolizmu lipida ponekad povezane sa lošom prognozom i smrtnim ishodom kod pacijenata sa sepsom (Morin i saradnici, 2015). Takođe je utvrđeno da receptori putem kojih se lipoproteini formiraju, preuzimajući ili predajući svoj lipidni kargo ćelijama, služe kako za eliminaciju štetnih materija iz ćelija, tako i za preuzimanje toksina mikroorganizama i njihovu detoksikaciju. Kod pojedinih životinjskih vrsta je utvrđeno da lipoproteini mogu igrati ulogu u eliminaciji patogena (Guo i saradnici, 2014). Paralelnim ispitivanjem

lipoproteina i njihovih receptora došlo se do značajnih saznanja vezanih za patogenezu malarije kod ljudi, uzročnika koji pripada istoj klasi mikroorganizama kao i *B. canis* (klasa *Apicomplexa*). Naime, otkriveno je da *Plasmodium* spp. započinje fazu razvoja u hepatocitima koristeći isti receptor koji služi za preuzimanje holesterola tokom njegovog reverznog transporta (Rodrigues i saradnici, 2008). Osim toga, pojedini mikroorganizmi u koje spadaju i mikroorganizmi iz klase *Apicomplexa*, nemaju razvijene puteve sinteze holesterola te ga preuzimaju od domaćina (Coppens, 2013). Zbog toga je moguće pretpostaviti da su domaćini evolutivno razvili mehanizme kojima mogu da onemoguće mikroorganizme da lipide domaćina koriste za sopstvene potrebe. Iz svih navedenih primera, jasno je da je regulacija metabolizam lipida i lipoproteina tokom akutne inflamacije direktno uključena u patogenezu bolesti, odnosno odbranu organizma i održavanje njegove homeostaze.

Kod pasa i većine drugih vrsta životinja u plazmi dominiraju lipoproteini visoke gustine čiji je glavni apoprotein ApoA-I. Kod svih do sada poznatih inflamatornih stanja koncentracija ApoA-I se snižava i on se označava kao negativan protein akutne faze (Khovidhunkit i saradnici, 2004; Carpinetro, 2005; Cabana, 1989). Tokom inflamacije, umesto ApoA-I, za lipoproteine visoke gustine se vezuje pozitivni protein akutne faze – SAA, čija koncentracija nekada može da bude 100 do 1000 puta veća nego u uslovima fiziološke ravnoteže. Kako patogeneza nekomplikovanih i komplikovanih slučajeva infekcije pasa sa *B. canis* još uvek nije u potpunosti ispitana, od značaja je utvrditi promene u koncentraciji proteina i lipida u serumu, a potom i promene u frakcijama proteina i lipoproteina seruma kao i koncentraciju ApoA-I i SAA koji mogu imati ulogu u patogenezi ovog oboljenja.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Odgovor akutne faze

Odgovor akutne faze se definiše kao kompleksan, sistemski, rani odbrambeni mehanizam aktiviran traumom, infekcijom, stresom ili neoplazijom (Cray i saradnici, 2009). Životinje kod kojih je homeostaza narušena različitim uzrocima, reaguju aktivacijom nespecifičnog i specifičnog humoralnog i ćelijskog imunskog sistema. Odgovor akutne faze je deo nespecifične odbrane organizma koji uključuje promene funkcije različitih sistema organa u organizmu u cilju smanjenja oštećenja i brže regeneracije ili reparacije tkiva (Johnson, 1997). Izrazite promene vezane za imunski sistem su ubrzano stvaranje neutrofilnih granulocita i monocita i njihova pojačana aktivacija. Istovremeno, povećanje sinteze hormona nadbubrega, a smanjenje sinteze tireoidinih i polnih hormona utiče na ubrzanje katabolizma proteina u mišićima, ubrzanje anabolizma proteina, povećanje obima lipogeneze i glukoneogeneze u jetri (Ceciliani i saradnici, 2002; Ye i Sun, 2015) i stvaranje brojnih jedinjenja koja imaju za cilj zaštitu organizma kako od štetnih noksi tako i od preterane aktivacije sopstvenog odbrambenog sistema (Tabela 1).

Tabela 1. Promene u organizmu tokom odgovora akutne faze (modifikovano prema Ceciliani i ostali, 2002).

Neuroendokrine promene	Povišena telesna temperatura, smanjen apetit, pospanost, povećana sekrecija ACTH, kortizola i kateholamina.
Metaboličke promene	Povećan katabolizam proteina, sinteza proteina akutne faze u jetri, povećanje lipogeneze u jetri, povećanje lipolize u masnom tkivu, povećanje glukoneogeneze.
Promene u hematopoezi	Anemija, leukocitoza ili leukopenija i trombocitoza.
Promene u neproteinskim sastojcima plazme	Pad koncentracije cinka i gvožđa i porast koncentracije bakra, retinola i glutaciona u plazmi

Skraćenice: ACTH-arenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*).

Za pokretanje odgovora akutne faze odgovorni su citokini. Citokini su molekuli koji se stvaraju konstitutivno i/ili inducibilno u mnogim ćelijama organizma, ali najviše ih sintetiziraju ćelije monocitno-makrofagnog sistema. Oni imaju ulogu humoralnih regulatora različitih procesa u organizmu. Citokini svoju funkciju ostvaruju parakrinim, autokrinim i endokrinim putem i važni su u regulaciji inflamatornih procesa. Postoje tri glavne grupe citokina (van Miert, 1995):

1. Citokini koji deluju kao pozitivni ili negativni faktori rasta na različite tipove ćelija. U njih spadaju interleukin-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 i faktor koji stimuliše rast monocitno-makrofagnih kolonija.
2. Pro-inflamatorni citokini u koje spadaju faktor nekroze tumora  $\alpha/\beta$  (TNF $\alpha/\beta$ ), IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, interferon  $\alpha/\gamma$  (INF $\alpha/\gamma$ ), IL-8 i makrofagni inhibicioni protein-1.
3. Anti-inflamatorni citokini u koje spadaju IL-1 receptor antagonisti, solubilni IL-1 receptori, protein koji vezuje TNF- $\alpha$  i protein koji vezuje IL-1.

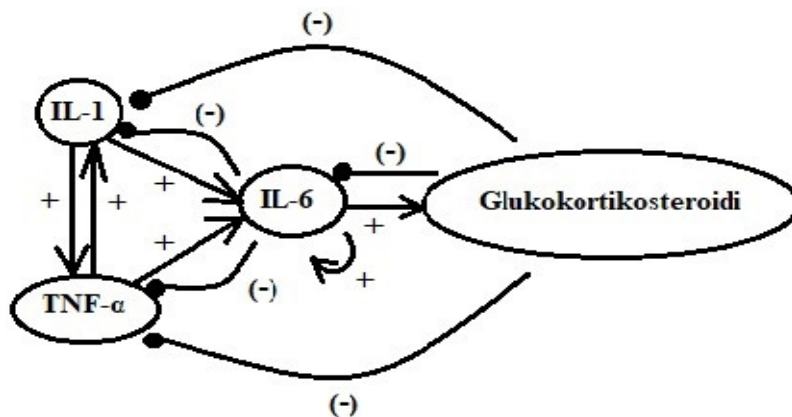
Tokom odgovora akutne faze, na jetru deluju tri ključna citokina: TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 (Heinrich i saradnici, 1998, 1990; Ingenbleek i Young, 1994; Le i Vilcek, 1989; Sehgal i saradnici, 1989). Sintezu proteina akutne faze najviše stimuliše IL-6 (Castell i saradnici, 1989; Heinrich i saradnici, 1989; Le i Vilcek, 1989; Sehgal i saradnici, 1989).

Nakon stimulacije različitim pro-inflamatornim citokinima, Kupferove ćelije sintetiziraju IL-6 koji deluje na hepatocite. Interleukin-6 takođe inhibira sintezu IL-1 i TNF- $\alpha$ , negativnom povratnom spregom u monocitima i makrofagima (Schindler i saradnici, 1990). Jetra reguliše odgovor akutne faze zahvaljujući brzom uklanjanju citokina koji se nalaze u cirkulaciji (Heinrich i saradnici, 1998). Kupferove ćelije učestvuju i u drugom mehanizmu regulacije, sintetizirajući IL-10 koji lokalno vrši supresiju sinteze IL-6 (Knolle i saradnici, 1995).

Kontrola sinteze IL-6 je prikazana na šemi 1 (Cecilian i saradnici, 2002). Prvo se sintetizira TNF, zatim IL-1b i na kraju IL-6. Svi ovi citokini pozitivnom povratnom spregom utiču na povećanje sopstvene sinteze. IL-1 i TNF- $\alpha$  međusobno stimulišu sintezu, a takođe oba ova citokina stimulišu sintezu IL-6. Interleukin-6 inhibira sekreciju TNF- $\alpha$  i IL-1, a stimuliše sopstvenu sintezu. Glukokortikosteroidi inhibiraju

sintezu sva tri citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 ). Iz navedene regulacije sinteze IL-6 se može videti da je kontrola odgovora akutne faze vrlo kompleksno regulisana mnogobrojnim pozitivnim i negativnim povratnim spregama.

Šema 1. Regulacija sinteze IL-6 (Ceciliani i saradnici, 2002). Linije sa crnom tačkom označavaju negativno dejstvo, linije sa strelicom označavaju pozitivno dejstvo



Skraćenice: IL-interleukin, TNF- faktor nekroze tumora.

Citokini utiču na funkciju hipotalamus-hipofizne osovine, što dovodi do glavnih endokrinih adaptacija u toku odgovora akutne faze: aktivacija hipotalamus-hipofiza-nadbubreg osovine kao i inhibicija hipotalamus-hipofiza-tireoideja osovine (Chrousos, 1995; Wartofsky i Burman, 1982). Interleukin-1, IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  stimulišu sintezu faktora oslobodanja kortikotropnog hormona (engl. *corticotropin-releasing factor* - CRF), adrenokortikotropnog hormona i glukokortikosteroida (Mandrup-Poulsen i saradnici, 1995; Jones i Kennedy, 1993). TNF- $\alpha$  u sadejstvu sa glukokortikosteroidima stimuliše katabolizam proteina u mišićima, što dovodi do povećanja količine aminokiselina koje preuzima jetra. IL-1 aktivira hipofizno-adrenalnu osovinu i takođe povećava mobilizaciju aminokiselina koje služe kao izvor supstrata za sintezu proteina akutne faze. Glukokortikosteroidi igraju značajnu ulogu kao negativni regulatori inflamatorne reakcije, uzimajući u obzir njihova anti-inflamatorna i imunosupresivna svojstva.

Pro-inflamatorni citokini takođe izazivaju nastanak groznice dejstvom na termoregulacioni centar, aktivaciju progenitorskih ćelija bele krvne loze u koštanoj srži i



povećanje broja fibroblasta i makrofaga u inflamiranim tkivima (Dinarello, 1989; Dinarello, 1983; Heinrich i saradnici, 1990; Sehgal i saradnici, 1989; Van Miert 1995).

*In vitro* TNF- $\alpha$  i IL-1 inhibiraju dejstvo tireostimulirajućeg faktora na ćelije tireoideje (Poth i saradnici, 1991; Sato i saradnici, 1990). Kod ljudi tokom odgovora akutne faze dolazi do smanjenja koncentracije trijodtironina (T3) i porasta koncentracije IL-6 (Quispe i saradnici, 2016). Hormoni tireoideje značajno utiču na sintezu, mobilizaciju i razgradnju lipida. Glavni efekti tireoidnih hormona na metabolizam lipida uključuju (Pucci i saradnici, 2010):

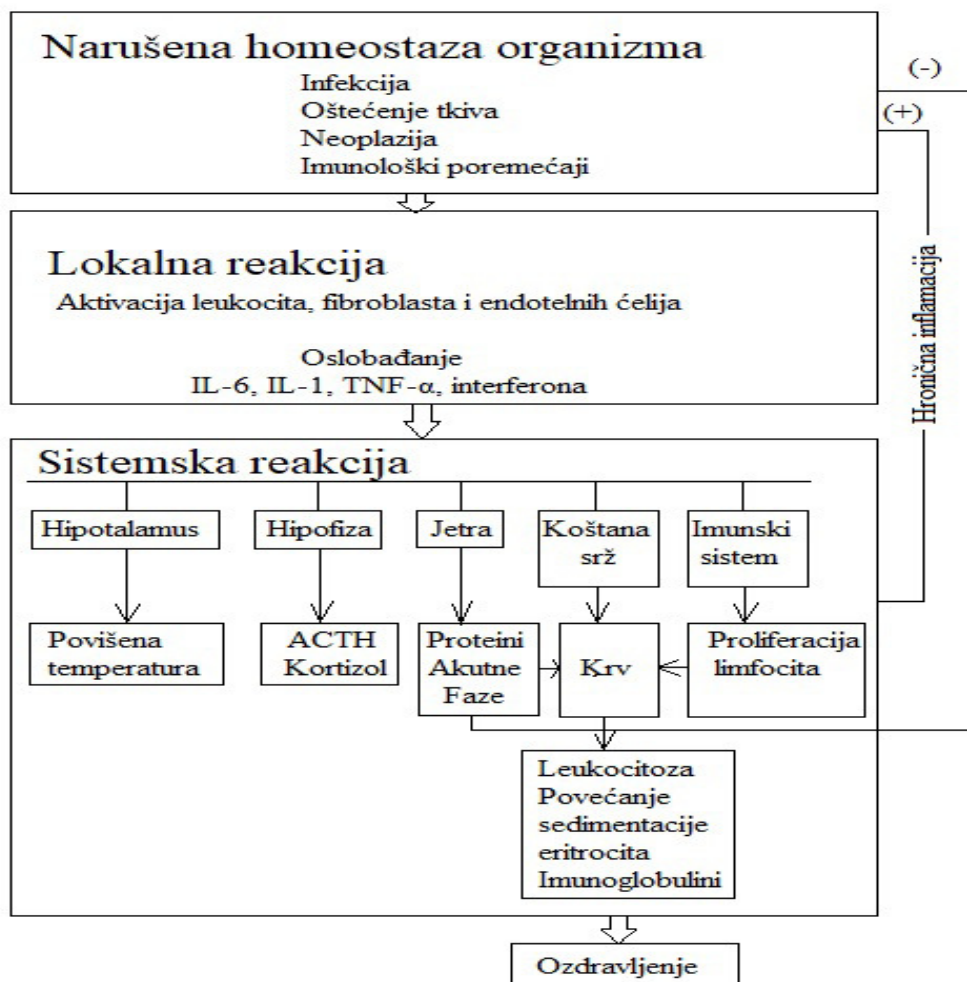
- povećano iskorišćavanje lipidnih supstrata
- povećanu sintezu i mobilizaciju triglicerida iz masnog tkiva
- povećanje koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina
- povećanu aktivnost lipoprotein lipaze

Tokom odgovora akutne faze kod različitih oboljenja, zbog dejstva citokina na hipotalamus-hipofiza-tireoidnu osovinu, dolazi do poremećaja u stvaranju tireoidnih hormona, a ovaj fenomen u literaturi je poznat kao sindrom eutireoidne bolesti (*euthyroid sick syndrome*). Kod pasa obolelih od babezije prepoznato je postojanje sindroma eutireoidne bolesti (Zygner i i saradnici, 2012). Pokazano je da kod pasa inficiranih sa *B. canis* dolazi do značajnog smanjenja koncentracije ukupnog tetra jod tironina (TT4), i slobodnog tetra jod tironina (FT4) (Zygner i saradnici, 2012) u odnosu na zdrave pse, ali i da kod azotemičnih pasa inficiranih sa *B. canis* u odnosu na neazotemične pse taj pad nije izraženiji. Takođe je kod pasa inficiranih sa *B. gibsoni* detektovan značajan pad u koncentraciji FT4 i tri jod tironina (FT3) (Chethan i saradnici, 2016). Ispitivanjem hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne i hipotalamus-hipofiza-tireoidne osovine i merenjem koncentracije hormona kod pasa inficiranih sa *B. rossi*, Schoeman i saradnici (2007) su pokazali da su koncentracije kortizola i ACTH značajno više, a koncentracije TT4 i FT4 značajno niže kod pasa sa letalnim ishodom u odnosu na pse koji su se oporavili. Međutim, ni u jednoj od navedenih studija se ne razmatra uticaj ovih hormonskih promena na lipide i lipoproteine seruma kod obolelih pasa.

Na osnovu svega navedenog, fenomen odovora akutne faze obuhvata vrlo kompleksne promene u različitim organima. Prikaz promena u organizmu tokom

odgovora akutne faze je dat na šemi 2.

Šema 2. Šematski prikaz odgovora akutne faze organizma (Heinrich i saradnici, 1990)



Skraćenice: IL-interleukin, TNF- faktor nekroze tumora, ACTH-arenokortikotropni hormon (engl. *adrenocorticotropic hormone*).

Citokini u cirkulaciji i/ili telesnim tečnostima imaju poluživot u proseku ispod 10 minuta (Bienvenu i saradnici, 2000). Jedan of efekata dejstva citokina je i sinteza proteina akutne faze. Mimo njihove fiziološke uloge u regulaciji zapaljenske reakcije, činjenica da pojedini proteini akutne faze imaju poluživot od 24 do 48 sati, čini ih zanimljivim za upotrebu u dijagnostičke svrhe (Blackburn, 1994; Gruys i saradnici, 2005).

Sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (engl. *systemic inflammatory*

*response syndrome* - SIRS) se definiše kao teška klinička manifestacija sistemskog odgovora na oštećenje tkiva, koja može da progredira u višestruko otkazivanje funkcije organa (engl. *multiple organe dysfunction syndrome* - MODS) i smrt životinje (Brady i Otto, 2001). Sepsa predstavlja SIRS izazvan mikroorganizmima i/ili njihovim toksinima. Sa druge strane, kod pacijenata koji su imali SIRS i čiji je ishod bolesti bio letalan, uočeno je da je odgovor akutne faze u ranim fazama razvoja SIRS-a bio slabiji u odnosu na pacijente koji su preživeli (Swathi Raju i saradnici, 2016). Na osnovu tih zapažanja, jasno je da je regulacija odgovora akutne faze izuzetno važan proces za njen ishod.

## 2.2. Proteini akutne faze

Smatra se da su proteini akutne faze kao komponente urođenog nespecifičnog imuniteta uključeni u ponovno uspostavljanje narušene homeostaze, kao i ograničavanje rasta mikroorganizama pre nego što se kod obolele životinje razvije specifični imunitet na uzročnika koji je izazvao infekciju (Murata i saradnici, 2004). Takođe, sami proteini akutne faze modulišu inflamatornu reakciju i ograničavaju preterano oštećenje tkiva pod dejstvom aktiviranih ćelija nespecifičnog imuniteta.

Proteini plazme čija se koncentracija poveća za 25% tokom akutne inflamacije se smatraju pozitivnim proteinima akutne faze dok se oni čija koncentracija opadne za 25% smatraju negativnim (Morley i Kushner, 1982; Gabay i Kushner, 1999). Neki od primera proteina koji se ubrajaju u negativne proteine akutne faze su albumin, apoA-I i transferin, dok su primeri pozitivnih proteina akutne faze haptoglobin, C-reaktivni protein, SAA, ceruloplazmin, fibrinogen i  $\alpha$ 1- kiseli glikoprotein. Pozitivni proteini akutne faze su glikoproteini koje uglavnom sintetišu hepatociti, ali i ćelije drugih tkiva, stimulisane pro-inflamatornim citokinima. Glavni medijatori sinteze proteina akutne faze u hepatocitima su interleukin-6, faktor nekroze tumora  $\alpha$  i interleukin-1  $\beta$  (Alsemgeest i saradnici, 1996; Yoshioka i saradnici, 2002).

### 2.3. Uloga elektroforetskog razdvajanja proteinskih frakcija seruma

Elektroforeza predstavlja metodu kojom se razdvajaju proteini u polju električne struje na osnovu njihovog naelektrisanja. Elektroforezom na agaroznom gelu proteini iz krvnog seruma se razdvajaju na šest frakcija: albuminsku,  $\alpha$ 1- globulinsku,  $\alpha$ 2- globulinsku,  $\beta$ 1- globulinsku,  $\beta$ 2- globulinsku i  $\gamma$ - globulinsku. Literaturno je poznato koji proteini krvnog seruma dominiraju u pojedinim frakcijama. U  $\alpha$ 1- globulinskoj frakciji dominira  $\alpha$ 1- kiseli glikoprotein i  $\alpha$ 1- antitripsinski faktor, u  $\alpha$ 2- globulinskoj frakciji dominiraju haptoglobin,  $\alpha$ 2- makroglobulin i apo-A, komponente komplemента (od kojih dominira C3 komponenta), dok u  $\gamma$ -globulinskoj frakciji dominiraju  $\gamma$ -globulini i C-reaktivni protein. Elektroforetsko razdvajanje proteina na agaroznom gelu je važno u dijagnostici akutne i hronične inflamacije, oboljenja jetre, nefrotskog sindroma i monoklonskih gamopatija (Vavricka i saradnici, 2009). Proteini akutne faze pripadaju  $\alpha$ - i  $\beta$ - globulinskoj frakciji i u literaturi je opisano da se tokom odgovora akutne faze ove frakcije povećavaju (Kaneko i saradnici, 2008). U subakutnom i hroničnom toku bolesti povećava se i  $\gamma$ - globulinska frakcija zbog povećanja koncentracije imunoglobulina.

### 2.4. Disproteinemija tokom infekcije sa *Babesia spp.*

Ispitivanja disproteinemije kod babezioze pasa su ograničena. Studija urađena retrospektivno posle prirodne infekcije pasa (n=58) sa *B. annae*, korišćenjem kapilarne elektroforeze, pokazala je da su neazotemični psi (n=39) imali hiperproteinemiju, značajno smanjenu koncentraciju albumina, a povećanje različitih frakcija globulina. Psi sa azotemijom (n=19) su imali značajno smanjenje koncentracije totalnih proteina, albumina,  $\beta$ - i  $\gamma$ - globulina, a značajno povećanje  $\alpha$ 2- globulina (Camacho i saradnici, 2005). Studija izvedena 2011. godine (Zygner i saradnici, 2011) je pokazala da kod oko polovine pasa inficiranih sa *B. canis* postoji pad  $\alpha$ 1- i  $\alpha$ 2- globulina, porast  $\beta$ - globulina, ali pod okriljem hipoglobulinemije. Ispitivanje disproteinemije kod pasa (n=29) inficiranih sa *B. rossi* (Južna Afrika) koja predstavlja najpatogeniju vrstu babezije, pokazalo je da su ukupni proteini, albumini,  $\alpha$ - i  $\beta$ - globulini niži kod blagih, umerenih i

teških slučajeva, dok su  $\gamma$ - globulini nešto viši samo kod umerenih i teških slučajeva babezije (Lobetti i saradnici, 2000). Na osnovu svega izloženog još uvek nije jasno koji oblik disproteinemije je tipičan za infekciju sa *B. canis* i da li očigledna razlika između navedenih studija postoji zbog toga što su životinje ispitivane u različitim fazama bolesti ili zato što se odgovor proteina akutne faze i  $\gamma$ - globulina razlikuje u zavisnosti od vrste babezije koja izaziva oboljenje.

Od proteina akutne faze do sada je pokazano da se posle infekcije sa *B. canis* kod pasa povećava koncentracija C-reaktivnog proteina (na granici između  $\beta$ - i  $\gamma$ - elektroforetske frakcije), ceruloplazmina ( $\alpha$ 2- globulin), dok je koncentracija haptoglobina snižena ( $\alpha$ 2- globulin) kod sedam pasa svrstanih u lakše i teže oblike oboljenja (Ulutas i saradnici, 2005). Takođe se smatra da infekcija *B. canis* stimuliše sintezu fibrinogena, a da infekcija sa *B. rossi* zbog razlike u pro-inflamatornim citokinima koje stimuliše ne izaziva proizvodnju ovog proteina (Schetters i saradnici, 2009a). Takođe, serum amiloid A, još jedan od vrlo senzitivnih proteina akutne faze ( $\alpha$ - globulin), značajno raste kod infekcije sa *B. canis* (Matijatko i saradnici, 2007; Milanović i saradnici, 2017).

## 2.5. Serum amiloid A (SAA)

Serum amiloid A je zajedničko ime za porodicu malih proteina u čiji sastav ulaze 104 amino kiseline (Uhlar i Whitehead, 1999).

Kod ljudi, ovi proteini su kodirani sa četiri odvojena, ali blisko povezana gena na hromozomu 11 (Sellar i Whitehead, 1993). SAA1 i SAA2 izoforme se nazivaju inducibilne, jer njihovu ekspresiju indukuju proinflamatorni citokini IL-1 $\beta$  i IL-6 kao i lipopolisaharidi (Ye i Sun, 2015). Kod ljudi se za SAA3 mislilo da je pseudogen, ali je njegova transkripcija detektovana lokalno u mlečnoj žlezdi i epitelnim ćelijama (Larson i saradnici, 2003), dok SAA4 gen kodira protein koji se konstitutivno proizvodi (Uhlar i saradnici, 1994). Indukovana ekspresija SAA1 i SAA2 od strane hepatocita značajno doprinosi porastu SAA u plazmi tokom odgovora akutne faze, a takođe obe ove izoforme se proizvode u inflamiranim tkivima od strane različitih tipova ćelija uključujući i makrofage (Ye i Sun, 2015). Kod miša SAA1 i SAA2 su glavne izoforme

koje proizvode hepatociti, međutim SAA3, za razliku od ljudi, kodira funkcionalni protein koji predstavlja glavnu formu SAA u inflamiranim tkivima; SAA4 kod miša je takođe konstitutivni protein (Lowell i saradnici, 1986; Meek i Benditt, 1986). Sellar i saradnici (1991) su detektovali dve izoforme kod jednog bigla sa "bolnim sindromom pasa". Kjelgaard-Hanssen i saradnici (2007) su prijavili četiri glavne izoforme u serumu pasa sa sistemskom inflamacijom i jednu ili više izoformi u sinovijalnoj tečnosti pasa. Više podataka o tome koje su izoforme SAA kod pasa inducibilne, a koje su konstitutivne, ne postoji. Ye i Sun (2015) su sumirali do sada poznate uloge izoformi SAA poreklom iz jetre i drugih tkiva. Oni ističu da, iako SAA poreklom iz inflamiranih tkiva može doprineti povišenju koncentracije SAA u plazmi, za to povišenje je pre svega odgovorna izoforma iz jetre. Moguće je da SAA sintetisan u jetri i u inflamiranim tkivima ima različite uloge.

- ***Uloge SAA sintetisanog u jetri su:***

1. opsonizacija Gram-negativnih bakterija - učešće u njihovom uklanjanju,
2. zamena apoA-I u okviru HDL-a, učestvovanje u metabolizmu lipoproteina,
3. vezivanje za SR-BI receptor koji olakšava efluks holesterola; preko SR-BI receptora na makrofagima SAA se uklanja i razgrađuje unutar makrofaga (Kluve-Beckerman i saradnici, 2002)

- ***Uloge SAA sintetisanog u inflamiranim tkivima su:***

1. vezivanje za SR-BI receptor koji olakšava efluks holesterola;
2. indukcija migracije fagocita i preko anti-apoptotskog efekta produžavanje životnog veka neutrofila (interakcijom sa FPR2),
3. aktivacija NLRP3 inflamazoma i stimulacija produkcije IL-1 beta (interakcijom sa P2X7),
4. indukovanje pojave M2 markera na makrofagima kao i sinteze IL-33, IL-10 i antagoniste receptora za IL-1 (*interleukin 1 receptor antagonist-IL-1rn*)
5. stimulacija eferocitoze makrofaga (preko interakcije sa *toll like receptor 2-TLR2*),
6. povećanje produkcije azot-oksida sintetaze (*nitric oxid synthase-NOS*) i azot oksida (*nitric oxide-NO*) (interakcijom sa *toll like receptor 4-TLR4*),
7. indukovanje sinteze pro-inflamatornih citokina preko interakcije sa receptorima

za krajnje proizvode uznapredovale glikacije (engl. *receptor for advanced glycation endproducts* –RAGE).

Na osnovu ovog taksativnog pregleda različitih uloga SAA molekula sintetisanih u i izvan jetre, može se zaključiti da SAA molekuli sintetisani u inflamiranim tkivima imaju signalnu ulogu u sintezi citokina i modulaciji funkcije ćelija imuniteta, pre svega neutrofila i makrofaga.

Činjenica da je oštećenje tkiva posle infekcije pasa sa *B. canis* zapravo imunski posredovano (Matijatko i saradnici, 2009), aktuelizuje ispitivanja koja bi pokazala koji proteini akutne faze značajno rastu, a koji opadaju tokom ove infekcije. Interesantno je da su dosadašnja ispitivanja pokazala da odgovor proteina akutne faze nije uniforman i da verovatno postoji razlika između različitih faza bolesti ili se odgovor razlikuje između pojedinih vrsta babezija (Koster i saradnici, 2015). Koncentracija SAA raste 10 do 100 puta tokom lokalizovanih inflamatornih procesa u organizmu i do 1000 puta kod teških bakterijskih infekcija i akutnih egzacerbacija hroničnih oboljenja (De Buck i saradnici, 2016). Ispitivanje koncentracije SAA, kao jednog od vrlo osetljivih proteina akutne faze čini ga interesantnim za stratifikaciju odgovora akutne faze tokom infekcije pasa sa *B. canis*.

Kako se SAA vezuje za HDL tokom inflamacije, ovaj molekul zapravo predstavlja jedan od apoproteina HDL-a. Može se pretpostaviti da je metabolizma lipida tokom inflamacije povezan sa koncentracijom SAA.

## 2.6. Građa i podela lipoproteina

Lipidi se u krvi nalaze kao slobodne **masne kiseline i lipoproteini**. Najveći deo slobodnih masnih kiselina se transportuje u plazmi vezan za albumine.

Lipoproteini su makromolekulski kompleksi različitih lipida i proteina u plazmi. Lipide u najvećoj meri čine neesterifikovani i esterifikovani holesterol, trigliceridi i fosfolipidi. Površinu lipoproteina čine proteini, fosfolipidi i holesterol, a centralni deo sačinjavaju estri holesterola i trigliceridi. Specifičnost tih kompleksnih makromolekula omogućava delimično „rastvaranje“ hidrofobnih lipida u plazmi i njihov transport do odgovarajućih tkiva i ćelija.

Podela lipoproteina se zasniva na razlikama u njihovoj građi i funkciji i slična je kod pasa i drugih vrsta životinja. Osnovna podela među vrstama životinja vezana za lipoproteine se odnosi na udeo koncentracije holesterola u HDL i LDL česticama pojedinih vrsta. Većina životinjskih vrsta spada u takozvane HDL sisare, odnosno sisare kod kojih se holesterol u najvećoj meri, u cirkulaciji, nalazi u okviru HDL-a (Guyard-Dangremont i saradnici, 1998). U HDL sisare spadaju pas, mačka, konj, preživari, glodari kao i većina drugih vrsta, dok svinje, kunići, zamorci, hrčci, kamile, nosorozi i većina majmuna spada u LDL sisare kod kojih većinu holesterola u cirkulaciji prenosi LDL (Guyard-Dangremont i saradnici, 1998).

Psi imaju četiri klase lipoproteina (Mahley i saradnici, 1977): hilomikrone (HM), lipoproteine vrlo niske gustine (engl. *Very Low Density Lipoproteins* - VLDL), lipoproteine niske gustine (engl. *Low Density Lipoproteins* - LDL) i lipoproteine visoke gustine (engl. *High Density Lipoproteins* - HDL) sa potklasama HDL-1 i HDL-2.

## 2.7. Apoproteini

Lipoproteini mogu sadržati jedan ili više glavnih apoproteina koji regulišu njihove metaboličke funkcije. Apoproteini su proteini koji su sastavni deo lipoproteina i imaju značajnu ulogu u njihovom transportu, omogućavaju stabilnost njihove strukture i aktiviraju određene enzime koji igraju ulogu u metabolizmu lipoproteina (Dominiczak i Caslake, 2011). U humanoj populaciji sadržaj i funkcije apoproteina u okviru lipoproteinskih frakcija su dosta dobro izučene (Tabela 2). Kod pasa i drugih vrsta domaćih životinja apoproteini su manje izučavani.



**Tabela 2.** Klasifikacija i svojstva glavnih humanih apoproteina (Preuzeto iz: Xenoulis i Steiner, 2010).

Apoproteini	Molekularna težina (Da)	Lipoproteini	Glavne metaboličke funkcije
ApoA-I	28 016	HDL, Hilomikroni	Strukturna, LCAT aktivator
ApoA-II	17 414	HDL, Hilomikroni	Nepoznata
ApoA-IV	46 465	HDL, Hilomikroni	Nepoznata
ApoB48	264 000	Hilomikroni	Sekrecija hilomikrona iz intestinalne mukoze u lakteale
ApoB100	540 000	VLDL, IDL, LDL	Sekrecija VLDL-a iz jetre, strukturna
ApoC-I	6 630	Hilomikroni, VLDL, IDL, HDL	Sporna
ApoC-II	8 900	Hilomikroni, VLDL, IDL, HDL	Aktivator lipoprotein lipaze
ApoC-III	8 800	Hilomikroni, VLDL, IDL, HDL	Inhibitor lipoprotein lipaze
ApoE	34 145	Hilomikroni, VLDL, IDL, HDL	Olakšava preuzimanje hilomikronskih ostataka
Apo (a)	250 000- 800 000		Sporna

Skraćenice: VLDL - lipoproteini vrlo niske gustine (engl. *Very Low Density Lipoproteins*), IDL - intermedijerni lipoproteini (engl. *Intermediate Density Lipoproteins*), LDL - lipoproteini niske gustine (engl. *Low Density Lipoproteins*) i HDL - lipoproteini visoke gustine (engl. *High Density Lipoproteins*), Apo-apoprotein, LCAT - lecitin holesterol acil transferaza (engl. *lecithin cholesterol acyltransferase*).

Podaci o fizičkim i hemijskim karakteristikama lipoproteina kod ljudi i domaćih životinja dobijeni su uz primenu elektroforeze, hromatografije, ultracentrifugovanja i različitih imunoloških metoda. Uopšteno gledano, kod mesojeda i svaštojeda, hilomikroni, koji se sintetšu u enterocitima, su prisutni u uzorcima plazme uzetim u postprandijalnom periodu – najčešće do 12 sati posle uzimanja obroka. Apolipoproteini prisutni u HM su apoB-48 kao strukturni proteini koji se ugrađuju u samim enterocitima i apoproteini C i E, koje dobijaju od HDL čestica tek pošto uđu u cirkulaciju (Bauer, 1995; Bauer, 1996; Bauer 2004; Ginsberg, 1998). Kod pasa i mačaka VLDL čestice su slične humanim VLDL česticama, sintetišu se u hepatocitima i gustine su ispod 1,006 g/L (Watson, 1996). VLDL predstavljaju glavne transportere triglicerida u plazmi jedinki koje su gladovale. Ovi lipoproteini imaju apoB-100 kao strukturni protein, a sadrže i apoE i C proteine (Bauer, 1995; Bauer, 1996; Bauer, 2004; Ginsberg, 1998). LDL čestice su po fizičkim i hemijskim karakteristikama slične humanim LDL česticama (Watson, 1996). Za razliku od humane populacije, intermedijarni lipoproteini (IDL) nisu ustanovljeni kod pasa i mačaka. U populaciji pasa postoji značajno preklapanje u distribuciji gustine između LDL i HDL, koja varira između 1,006 - 1,087 g/L i 1,025-1,21 g/L. Ovo preklapanje je uslovljeno prisustvom velikih, holesterolom bogatih HDL čestica, nazvanih HDL-1 koje imaju raspon gustine od 1,025-1,10 g/L i sadrže značajnu količinu apoE (Watson, 1996). Ovi lipoproteini su predominantni kod pasa koji su hranjeni obrocima bogatim holesterolom i/ili zasićenim mastima kada se jos naziva i HDL*cholesterol* (HDLc), odnosno lipoproteini indukovani viškom holesterola.

Zbog preklapanja gustine HDL-1 i LDL-a metode koje se rutinski koriste za razdvajanje i analiziranje lipoproteina u humanoj medicini u kojoj je ultracentrifugovanje zlatni standard, ne mogu se primeniti za analizu lipoproteina pasa (Watson, 1996). U veterinarskoj medicini je za rutinsku analizu lipoproteina pasa najefikasnija metoda elektroforetskog razdvajanja na agaroznom gelu. Tom metodom, lipoproteinske frakcije se razdvajaju zahvaljujući različitom naelektrisanju lipoproteinskih klasa, a ne na osnovu njihove gustine ili veličine (Behling-Kelly, 2016).

## 2.8. Karakteristike lipoproteina kod pasa

Kod pasa, VLDL čestice, u odnosu na druge lipoproteine, sadrže najviše triglicerida. VLDL i LDL dele isti veliki apoprotein koji se naziva B-apoprotein. LDL čestice kod pasa sadrže manje ukupnog holesterola i više triglicerida za razliku od LDL čestica kod ljudi. Karakteristike glavnih lipoproteina kod pasa i mačaka date su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Karakteristike glavnih lipoproteina u pasa i mačaka (Xenoulis i Steiner, 2010)

Lipoprotein	Životinjska vrsta	Dominantni lipidi	Glavni apoproteini	Veličina (nm)	Gustina g/L
Hilomikroni	Pas, mačka	Trigliceridi iz obroka	B, C	75-1200	<0,960
VLDL	Pas, mačka	Endogeno sintetisani trigliceridi	B, C, E	30-80	0,93-1,006
LDL	Pas, mačka	Fosfolipidi, holesterol estri	B	18-25	1,019-1,087
HDL-1	Pas	Fosfolipidi, holesterol estri	A, C, E	10-35	1,025-1,100
HDL-2	Pas, mačka	Fosfolipidi	A, C, E	9-12	1,063-1,100
HDL-3	Pas, mačka	Fosfolipidi	A, C	5-9	1,100-1,210

Skraćenice: VLDL-lipoproteini vrlo niske gustine (engl. *Very Low Density Lipoproteins*), LDL-lipoproteini niske gustine (engl. *Low Density Lipoproteins*) i HDL-lipoproteini visoke gustine (engl. *High Density Lipoproteins*).

## 2.9. Metabolizam lipoproteina

Hilomikroni su najveći od svih lipoproteina i služe za prenos hranom unetih triglicerida od tankog creva do masnog tkiva, skeletnih i srčanog mišića, kao i holesterola do jetre (Watson, 1996). Ovi lipoproteini se detektuju u krvi postprandijalno, nakon unosa u organizam obroka bogatog mastima, a gube se iz cirkulacije tokom 12 sati gladovanja.

Ostale tri klase lipoproteina – VLDL, LDL i HDL, su uvek prisutne u cirkulaciji i čine takozvani endogeni put lipoproteina. VLDL obavljaju transport endogeno sintetisanih triglicerida i holesterola u jetri do masnog i mišićnog tkiva. VLDL lipoproteini su prekursori LDL-a koji pre svega vrše prenos holesterola do perifernih tkiva, ali i nazad do jetre preko LDL ostataka. Treću klasu čine HDL lipoproteini, čija je osnovna uloga prenos viška holesterola koji prevazilazi potrebe perifernih tkiva, nazad do jetre (reverzni transport holesterola) gde se on izlučuje preko žuči ili redistribuiru. Ova teorija reverznog transporta holesterola je predložena sedamdesetih godina prošlog veka i smatra se da je to način na koji se organizam osloboda viška holesterola (Glomset i Norum, 1973).

Transfer lipida koji se transportuju krvotokom u okviru lipoproteina je omogućen njihovom interakcijom sa različitim enzimima plazme kao i površinskim receptorima ćelija različitih tkiva.

Enzim lipoprotein lipaza (LPL), čija je aktivnost najveća u masnom tkivu, skeletnim i srčanom mišiću, ali i u mlečnoj žlezdi u laktaciji, hidrolizuje trigliceride iz hilomikrona i VLDL-a. Enzim hepatična lipaza (HL) deluje na trigliceride iz LDL-a i HDL-a i odgovorna je za intravaskularno remodeliranje ovih lipoproteina. Endotelna lipaza pripada porodici proteina koji su produkti triacilglicerol (TAG) lipaza gena (Hirata i saradnici, 1999). Endotelna lipaza olakšava preuzimanje HDL-a (Rohrl I saradnici, 2013), kao i selektivno preuzimanje holesterolskih estara iz HDL-a (Riederer i saradnici, 2012). Ovaj enzim je negativni regulator koncentracije HDL-a. Naime, kada se miševima inhibira endotelna lipaza detektuje se porast, a kod povećane ekspresije pad koncentracije HDL-a (Ishida i saradnici, 2003).

Novija istraživanja ukazuju da pored reverznog transporta holesterola putem

HDL preko jetre, postoji put koji ne uključuje ekskreciju holesterola preko jetre i žuči (Temel i Brown, 2012; Temel i Brown, 2015). Ekskrecija holesterola putem creva (engl. *transintestinal cholesterol excretion* - TICE) je put ekskrecije holesterola nezavistan od HDL puta i uključuje sintezu ApoB lipoproteina u jetri (Temel i Brown, 2010). ApoB lipoproteini krvotokom stižu do enterocita proksimalnih delova tankih creva kojima predaju holesterol koji dalje prelazi u lumen creva i izbacuje se putem fecesa. Koji sve receptori na enterocitima prihvataju ApoB lipoproteine nije još uvek razjašnjeno. Svakako je isključeno učešće SR-BI receptora na crevima, a samim tim i učešće HDL-a u TICE putu (Temel i Brown, 2012). Pored LDL receptora, VLDL receptora i drugih srodnih receptora na crevima za koje se smatra da učestvuju u TICE putu, postavljena je hipoteza da postoji i novi, još uvek neotkriveni receptor na enterocitima (Temel i Brown, 2012), s obzirom da delovanjem agonista na X receptor jetre (engl. *Liver X receptor*- LXR) i povećanjem razgradnje svih navedenih receptora (Zelcer i saradnici, 2009) nije došlo do značajnog smanjenja ekskrecije holesterola TICE putem. TICE put čini oko 30% reverznog transporta holesterola u fiziološkim uslovima kod miševa i ljudi, sa velikim indukcionim potencijalom kada je bilijarni put ekskrecije holesterola kompromitovan (Temel i Brown, 2012). Da li postoje esencijalne razlike u ovom putu reverznog transporta holesterola između HDL i LDL sisara još uvek nije literaturno opisano, kao ni to da li je tokom odgovora akutne faze ovaj put kompromitovan.

## 2.10. Receptori za lipoproteine

Decenijama unazad je definisana teorija povratnog transporta holesterola po kojoj je jedna od glavnih uloga HDL-a da višak holesterola iz perifernih tkiva prenosi u jetru radi njegovog izlučivanja, redistribucije ili reutilizacije (Xenoulis i Steiner, 2010). Naime, ApoA-I se vezuje u tkivima za receptorsku familiju proteina transportera (engl. *ABC-ATP binding cassette receptors*), različitih klasa (A1 i G1), preko kojih višak neesterifikovanog holesterola prelazi iz ćelija u HDL. ABCA1 je prepoznat kao glavni molekul koji je uključen u efluks holesterola iz penastih makrofaga (Oram i saradnici, 2000). Njegova ekspresija je pokazana kod više tipova ćelija, u koje spadaju makrofagi i hepatociti. Njegova ekspresija je indukovana povećanim prisustvom lipida u ćelijama

preko aktivacije nuklearnih LXR receptora (Costet i saradnici, 2003; Schwartz i saradnici, 2000). Odsustvo funkcionalnog ABCA1 kod ljudi sa Tangijerovom bolešću, dovodi do teškog nedostatka HDL-a i akumulacije holesterol-estara u ćelijama retikuloendotelnog sistema (Hayden i saradnici, 1999; Rust i saradnici, 1999; Schmitz i saradnici, 1999). Smanjena koncentracija HDL-a i akumulacija penastih makrofaga je detektovana kod miševa sa nedostatkom ABCA1 u jetri (McNeish i saradnici, 2000). Uočeno smanjenje koncentracije HDL-a je posledica narušene lipidacije ApoA-I preko ABCA1. Efluks holesterola putem ABCA1 nije značajan samo za efluks iz makrofaga i hepatocita već i za genezu nascentnog HDL-a i održavanje nivoa HDL-a u plazmi (Brewer i Santamarina-Fojo, 2013).

ABCG1 i ABCG4 receptori za razliku od ABCA1 receptora koji vrši efluks holesterola i fosfolipida na ApoA-I (HDL siromašan u lipidima) vrše efluks holesterola na HDL3 i HDL2 čestice (HDL bogatiji u lipidima) (Wang i saradnici, 2004). Wang i saradnici su pokazali da ABCG1 receptor može da vrši efluks holesterola na različite akceptore kao što su HDL, LDL, fosfolipidne vezikule i ciklodekstrin (Wang i saradnici, 2004), a takođe efluks preko ovog receptora obuhvata širi spektar sterola, uključujući oksisterole kao što je 7-keto-holesterol (Terasaka i saradnici, 2007), dok ABCG1 i ABCG4 zajedno vrše efluks steroidnih međuproizvoda tokom procesa sinteze holesterola kao što je dezmosterol (Wang i saradnici, 2008). Interesantno je i to da povećana ekspresija ABCG1 receptora u određenoj meri povećava, pored sterola, i efluks fosfolipida iz ćelije (Kobayashi i saradnici, 2006; Sano i saradnici, 2007; Wang i saradnici, 2004).

**Receptori za preuzimanje holesterola: LDL receptor.** Početkom sedamdestih godina otkriveno je da se na membrani fibroblasta u kulturi *in vitro* nalazi LDL receptor (Goldsteins i Brown, 1974). Kada se LDL veže za njega, dolazi do endocitoze LDL čestica koje se unutar lizozoma razgrađuju, snabdevajući na taj način ćelije holesterolom. Prisustvo odgovarajuće količine holesterola u ćelijama, negativnom povratnom spregom, inhibira HMG-CoA reduktazu - limitirajući enzim u sintezi holesterola (Goldsteins i Brown 1974, Goldsteins i Brown 1976).

Kod pacijenata sa homozigotnom familijarnom hiperholesterolemijom koji imaju nasledni deficit LDL receptora, ovaj lipoprotein se nagomilava u plazmi dovodeći

do ateroskleroze. Zatim, sličan receptor je identifikovan na membranama hepatocita pacova (Mahley i saradnici, 1981). Ovaj receptor olakšava hepatocitima da preuzimu LDL i VLDL. Ekspresija gena za LDL receptor je detektovana u tkivima 27 različitih organa kod čoveka: adrenalnim žlezdama, slepom crevu, mozgu, debelom crevu, dvanaestopalačnom crevu, endometriju materice, jednjaku, masnom tkivu, žučnoj bešici, srcu, bubregu, jetri, plućima, limfnim čvorovima, jajnicima, pankreasu, placenti, prostati, pljuvačnoj žlezdi, koži, tankom crevu, slezini, želucu, testisima, tiroidnoj žlezdi i mokraćnoj bešici (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3949#gene-expression>). To ukazuje na važnost ovog transportnog sistema u snabdevanju ćelija holesterolom.

*SR-BI receptor* (engl. *scavenger receptor B class I*). Ovaj receptor se nalazi na ćelijskoj membrani i vezuje samo one HDL čestice koje sadrže ApoA-I. Ekspimiran je na hepatocitima, endotelnim ćelijama i ćelijama steroidogenih tkiva (Azhar i Raven, 2002). Preko ovog receptora selektivno se iz HDL-a preuzimaju samo holesterol estri, pri čemu se sama HDL čestica ne razgrađuje, već se remodelira i vraća nazad u cirkulaciju. Kod kuja sa piometrom je pokazana povećana ekspresija SR-BI u epitelnim ćelijama endometrija ukazujući da ovaj receptor ima određenu ulogu u njenoj patogenezi (Gabriel i saradnici, 2016). Takođe je pokazano da uzročnici malarije tokom hepatične faze infekcije koriste upravo SR-BI za infekciju hepatocita (Rodrigues i saradnici, 2008). Sa druge se ističe značaj ekspresije SR-BI koji uklanjajući LPS predstavlja kritični zaštitni faktor tokom sepse (Guo i saradnici, 2014).

**Receptori za preuzimanje holesterola kod pasa:** Receptori za lipoproteine kod pasa nisu direktno izučavani u velikom obimu. U jetri pasa su opisana dva različita receptora (Mahley i saradnici, 1981; Hui i saradnici, 1981):

-*Apo B, E receptor* - koji je sposoban da vezuje lipoproteine koji sadrže apo B apoproteine tj. LDL i lipoproteine koji sadrže apo E apoproteine tj. HDLc odnosno HDL-1.

-*Apo E receptor* – koji je sposoban da vezuje HDLc (HDL-1), ali ne i LDL lipoproteine. Receptor u jetri pasa sličan humanom LDL receptoru (ApoB, E receptor) takođe vezuje lipoproteine koji sadrže apoE apoproteine, kao što su VLDL i HDL-1, ali sa 10 puta većim afinitetom nego za ApoB LDL (Kovanen i saradnici, 1981).

Interesntno je da odrasli psi u jetri imaju samo ApoE receptor, dok štenci i odrasli psi tretirani holestiraminom (koristi se za snižavanje holesterola u krvi) pored ApoE receptora imaju i Apo B, E receptor, stoga kod pasa jetra nije glavno mesto katabolizma LDL lipoproteina (Hui i saradnici, 1981). Navedeni radovi ukazuju da je metabolizam lipida i lipoproteina kod pasa još uvek nedovoljno proučen.

### *2.11. Metabolizam apolipoproteina A-I (ApoA-I) i HDL*

Apolipoprotein A-I se sintetiše i luči iz jetre i tankog creva (Zannis i saradnici, 1982). On je glavni konstitutivni i najzastupljeniji apoprotein u okviru različitih klasa HDL-a. U cirkulaciji, ApoA-I se nalazi u nekoliko formi: kao ApoA-I bez lipida, ApoA-I sa malom količinom lipida tzv. diskoidni HDL koji se još naziva i HDL siromašan u lipidima i ApoA-I u okviru sfernih čestica HDL-a.

Apolipoprotein A-I je ključni protein za funkcionisanje povratnog transporta holesterola. Naime ApoA-I se vezuje u tkivima za ABCA1 i ABCG1 preko kojih višak neesterifikovanog holesterola prelazi iz ćelija na HDL. ApoA-I je i kofaktor i katalitički aktivator enzima lecitin holesterol acil transferaze (LCAT) (Sorci-Thomas i saradnici, 2009). LCAT sintetiše jetra i otpušta u cirkulaciju. LCAT na površini HDL-a vrši konverziju holesterola i fosfatidil holina (lecitina) u estre holesterola i lizofosfatidilholine. Esterifikovani holesterol je hidrofoban molekul i smešta se u jezgro sfernih HDL lipoproteina.

U metabolizmu lipoproteina, značajnu ulogu zauzima holesterol estar transfer protein (CETP), koji deli čitavu klasu sisara po pitanju metabolizma lipoproteina na CETP-deficijentne sisare (HDL sisari) u koje spada i pas i sisare sa visokom aktivnošću CETP-a (LDL sisari) u koje spada i čovek. CETP je hidrofobni glikoprotein koji se stvara u hepatocitima i koji je vezan za HDL. CETP vrši razmenu triglicerida sa LDL-a i VLDL-a na HDL i holesterolskih estara u suprotnom smeru. Kada CETP ima visoku aktivnost, glavni nosilac holesterola su LDL čestice, a kada CETP nedostaje, glavni nosilac holesterola su HDL čestice. Ove činjenice kao i otkriće CETP deficijencije u okviru Japanske populacije (Inazu i saradnici, 1996) su iskorišćene za razvoj nove vrste lekova tzv. CETP inhibitora, koji su u humanoj medicini u kliničkoj fazi ispitivanja u terapiji poremećaja lipoproteina (Fillipatos i saradnici, 2017).



Protein koji vrši transfer fosfolipida (eng. *phospholipid transfer protein* - PLTP) je plazma protein koji sintetišu različita tkiva, ali najviše pankreas. Ovaj protein vrši transfer fosfolipida sa VLDL-a na HDL (Tall i saradnici, 1985). Pored toga PLTP vrši razmenu fosfolipida između različitih klasa HDL lipoproteina, modelirajući na taj način sastav i veličinu HDL-a (Rye i Barter, 1986; Jauhiainen i saradnici, 1993; Tu i saradnici, 1993). Ovaj proces obuhvata transfer površinskih lipida i stvaranje povećanog HDL-a zbog fuzije čestica kao i formiranje malih, lipidima siromašnih apoA-I/fosfolipidnih kompleksa koji imaju preß- pokretljivost na agaroznoj elektroforezi (Lusa i saradnici, 1996). Pokazano je da je aktivnost PLTP-a kod pasa značajno viša u odnosu na druge vrste životinja i čoveka (Guyard-Dangremont i saradnici, 1998). U humanoj populaciji, povećana aktivnost PLTP-a je detektovana kod pacijenata sa teškom sepsom, periodontitisom i drugim hroničnim i akutnim inflamatornim stanjima. Aktivnost PLTP-a nije ispitivana kod pasa sa inflamatornim stanjima.

**Katabolizam ApoA-I i remodeliranje HDL-a:** Bubrezi su važni u remodeliranju HDL čestica, a naročito njihovih apolipoproteina i enzima (Yang i saradnici, 2016). Komponente koje ulaze u sastav HDL čestica mogu da prođu glomerulsku membranu i da se eliminišu urinom. Osim toga, iz primarne mokraćne, epitelne ćelije proksimalnih tubula bubrega ih mogu reapsorbovati i razgraditi ili vratiti u cirkulaciju (Hammad i saradnici, 2000; Yang i saradnici, 2016).

Ispitivanja na hrčku su pokazala da se 30-70% ApoA-I ukloni putem bubrega (Woollett i Spady, 1997). Različita oboljenja bubrega kao i stanja koja utiču na disocijaciju proteina od HDL čestica povećavaju gubitak ApoA-I urinom. Osim ApoA-I gube se i drugi proteini i enzimi koji ulaze u sastav HDL, a time nastaju kvalitativne i kvantitativne promene HDL čestica sa posledničnim promenama u njegovim funkcijama (Yang i saradnici, 2016). Jedna od posledica neadekvatnog remodelovanja HDL u oštećenim glomerulima dovodi do nefrotskog sindroma koji se karakteriše hiperholesterolemijom i lipidurijom (Attman i Alaupović, 1990).

## 2.12. Povezanost proteina akutne faze i lipoproteina plazme tokom odgovora akutne faze

Gotovo dve decenije je poznato da određeni lipofilni proteini akutne faze, a pre svega SAA i CRP, ulaze u sastav lipoproteina (SAA u sastav HDL-a, CRP u sastav LDL-a) i utiču na njihove uloge u organizmu (Sammalkorpi i saradnici, 1990). Apoproteini imaju ulogu ko-faktora neophodnih za aktivnost enzima koji ulaze u sastav lipoproteina. Tako je ApoA-I ko-faktor za LCAT. Pretpostavlja se da izmene apoproteina koje nastaju tokom inflamacije neminovno utiču na funkciju enzima. Takođe, HDL čestice uklanjaju holesterol iz membrana ćelija imunskog sistema utičući na građu lipidnih pukotina (engl. *lipid rafts*) koje su važne za aktivaciju, migraciju, adheziju i stvaranje pseudopodija kod neutrofila (Kaji, 2013). Iz ovog primera se vidi da koncentracija, struktura i funkcija lipoproteina direktno utiče na imunski odgovor organizma. Takođe je poznato da je efluks holesterola smanjen kada se SAA veže za HDL (Banka i saradnici, 1995; Han i saradnici, 2016; Vaisar i saradnici, 2015), ali se o mehanizmima ove pojave još uvek raspravlja. Stoga je od velike važnosti da se pored proteina tokom odgovora akutne faze paralelno ispituju i lipidi i lipoproteini seruma. Kod infekcije pasa sa *B. canis* tokom odgovora akutne faze proteini akutne faze, lipoproteini, apoproteini i lipidi seruma nisu do sada ispitivani paralelno.

Pored promena u koncentraciji različitih proteina, tokom odgovora akutne faze takođe dolazi i do značajnih promena u koncentraciji, sastavu i metabolizmu lipoproteina. Do sada su pokazane promene tokom različitih akutnih stanja kao što su hirurške intervencije, infarkt miokarda i teška sepsa (Gabay i Kushner, 1999; Rosenson, 1993). Ove promene su uslovljene sinhronizovanim dejstvom različitih hormona i citokina (Fraunberger i saradnici, 1999; Hardardóttir i saradnici, 1994).

Glavne promene u proteinskom sastavu HDL-a tokom odgovara akutne faze kod eksperimentalnih životinja i ljudi su navedene u tabeli 4 (prema preglednom radu Feingold i Grunfeld, 2010).

Tabela 4. Promene u kocentracijama proteina u okviru HDL-a tokom odgovora akutne faze

Porast	Pad
SAA	ApoA-I, ApoA-II
Klasterin	ApoC-I, II i III
Sekretorna fosfolipaza A2	ApoM
ceruloplazmina	LCAT
ApoA-IV	CETP
ApoA-V.	PON1
PAF/acetilhidrolaza	PLTP (pacov)
PLTP (čovjek)	Transferin
Lipopolisaharid vezujući protein	Hepatična lipaza
BPI protein	

Skraćenice: SAA-serum amiloid A, Apo-apoprotein, PAF-faktor aktivacije trombocita (engl. *Platelet - activating factor*), PLTP - fosfolipidni transfer protein (engl. *Phospholipid transfer protein*), BPI-*bactericidal/permeability increasing protein*, LCAT - lecitin holesterol acil transferaza (engl. *lecithin cholesterol acyltransferase*), CETP - holesterol estar transfer protein (engl. *Cholesterol ester transfer protein*), PON1 - paraoksonaza 1.

Tokom odgovora akutne faze dolazi do pada koncentracije HDL-a i ApoA-I i promene u sastavu i strukturi HDL čestica. Te promene su indukovane lipopolisaharidima i drugim etiološkim faktorima koji izazivaju poremećaje u reverznom transportu holesterola (Feingold i Grunfeld, 2010). Lipopolisaharidi uzrokuju smanjenu ekspresiju ABCA1, ABCG2 i SR-BI transportera i receptora koji su od značaja za eflux holesterola iz makrofaga (Annema i saradnici, 2010; Baranova i saradnici, 2002; McGillicuddy i saradnici, 2009). Aktivnost LCAT-a je takođe smanjena, a to može da dovede do smanjene esterifikacije holesterola u okviru HDL-a, što dalje uzrokuje poremećaj u maturaciji HDL čestica kao i njihovoj sposobnosti da dalje primaju holesterol iz perifernih tkiva (Auerbach i Parks, 1989; Ly i saradnici, 1995). Na hrčku i transgenim miševima je pokazano da LPS smanjuje i aktivnost CETP-a (Ly i saradnici, 1995; Masucci-Magoulas i saradnici, 1995). Tretman

lipopolisaharidima kod hrčka takođe redukuje ekspresiju SR-BI receptora u jetri, a to može uticati da hepatociti smanje preuzimanje holesterol estara sa HDL čestica (Khovidhunkit i saradnici, 2001). Na posletku, tretman LPS-om uzrokuje smanjenje koncentracije i aktivnosti enzima holesterol-7 $\alpha$ -hidroksilaze i holesterol-27 hidroksilaze, ključnih enzima koji katalizuju konverziju holesterola u žučne kiseline, glavnog puta eliminacije holesterola iz organizma (Feingold i saradnici, 1996; Memon i saradnici, 2001).

Promene u lipidima i lipoproteinima tokom odgovora akutne faze kod pasa nisu dovoljno proučene. Febrilni, anoreksični psi akutno inficirani sa *B. canis*, prilikom prve posete veterinaru imaju niže koncentracije ukupnog holesterola, triglicerida i HDL-a u odnosu na treći dan nakon terapije imidokarb-dipropionatom (Kuleš i saradnici, 2014). Ovaj nalaz ukazuje na moguć pad ovih parametara tokom odgovora akutne faze. Nasuprot akutnoj infekciji sa *B. canis*, hronična infekcija pasa sa lajšmanijom se karakteriše porastom koncentracije ukupnog holesterola, triglicerida i LDL-a kao i padom HDL holesterola, a naročito HDL-2 frakcije (Nieto i saradnici, 1992). Takođe kod kuja sa piometrom koja predstavlja oboljenje sa tipičnim znacima odgovara akutne faze, je detektovana povišena koncentracija ukupnog holesterola, a pretpostavljeno je da je to posledica holestaze (Børresen, 1980).

Poznato je da gojaznost uzrokuje stanje hronične supkliničke inflamacije. Psi sa poremećajem u radu srca koji je u vezi sa gojaznošću (engl. *obesity related cardiac dysfunction*- ORCID) imaju insulinsku rezistenciju, dislipidemiju i povećanje koncentracije markera inflamacije kao što su IL-8 i citokin sličan hemokinu izolovanom iz keratinocita (*keratinocyte-derived chemokine* – *KC*). Dislipidemija se ogleda povišenjem koncentracije holesterola, HDL-a i triglicerida, dok koncentracija LDL-a nije promenjena (Tropf i saradnici, 2017).

Promene u lipoproteinima koje postoje kod oboljenja koronarnih krvnih sudova (*coronary artery disease* – CAD), koje za posledicu može imati infarkt miokarda, su odavno definisane i koriste se u dijagnostici, a takođe i za praćenje efekata terapije. Povećanje LDL vrednosti kod ljudi za jedan procenat povezano sa porastom rizika od CAD za dva posto tokom šest godina, a smanjenje HDL vrednosti od jedan procenat taj rizik uvećava za tri do četiri procenta (Wilson, 1990). Međutim, kod oko pet procenata

pacijenata sa CAD, detektuje se povišen HDL-holesterol i to pre svega kod onih koji su u proseku stariji od onih kod kojih je nađena normalna ili smanjena vrednost HDL-holesterola (Sbrana i saradnici, 2013). Takođe, iako HDL može da spreči oksidaciju LDL-a u uslovima fiziološke ravnoteže, inflamacija, oksidativni stres i dijabetes uzrokuju strukturne promene HDL-a, a pre svega kvantitativno smanjenje i deformaciju ApoA-I. Na taj način se povećava koncentracija disfunkcionalnog HDL-a koji gubi anti-aterosklerotične i anti-inflamatorne funkcije (Ahn i Kim, 2016).

Kod eksperimentalno izazvanog akutnog pankreatitisa kod pasa, u okviru  $\beta$ -lipoproteinske frakcije holesterol i fosfolipidi su rasli, a u okviru  $\alpha$ -lipoproteinske frakcije su padali (Chikamune i saradnici, 1998). Totalna koncentracija triglicerida je bila povećana dok su ukupni holesterol i fosfolipidi bili nepromenjeni (Chikamune i saradnici, 1998). Takođe se u ovoj studiji navodi porast LDL i VLDL-a i pad HDL-a, kao i pad ApoA-I i inkorporacija SAA u HDL čestice (Chikamune i saradnici, 1998). Osim toga je pokazano da ljudi sa akutnim pankreatitisom i perzistentnim sindromom otkazivanja organa imaju niže vrednosti ApoA-I i HDL-a u odnosu na pacijente sa prolaznim sindromom otkazivanja organa, kao i to da su pacijenti sa smrtnim ishodom imali niže vrednosti ApoA-I i HDL-a u odnosu na preživeli pacijente (Peng i saradnici, 2015). U ovoj studiji se navodi i da koncentracije HDL-a i ApoA-I imaju bolju diskriminativnu moć u predviđanju razvoja MODS od CRP-a (Peng i saradnici, 2015). Osim toga, smanjena koncentracija HDL-holesterola je nezavistan prognostički faktor za razvoj komplikacija kao što su višestruko otkazivanje organa, nekroza pankreasa i smrt kod pacijenata sa akutnim pankreatitisom (Zhang i saradnici, 2017).

Zajednička karakteristika tokom odgovora akutne faze kod tri ispitivane vrste babuna, kunića i miša je porast koncentracije SAA kao i pojava velikog, gustog i sa SAA obogaćenog HDL-a (Cabana i saradnici, 1996). Ostale promene vezane za lipidni status tokom odgovora akutne faze kod ove tri vrste su hipertrigliceridemija, obogaćivanje trigliceridima a redukcija holesterola u okviru HDL-a kao i porast holesterolom siromašnog ApoA-I kod babuna i kunića, dok je kod miševa bio prisutan samo umeren pad koncentracije ApoA-I (Cabana i saradnici, 1996). Promene u parametrima lipidnog statusa kod ljudi sa različitim oboljenjima (infekcija, onkološki pacijenti i autoimuna oboljenja) kod kojih je bio prisutan odgovor akutne faze, pokazan

je pad ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola, pad ApoA-I i porast SAA, kao i to da do pada ne dolazi usled smanjene sinteze niti resorpcije holesterola već usled smanjenog efluksa holesterola iz perifernih tkiva (Zimetti i saradnici, 2017).

Na osnovu literaturnih podataka, može se zaključiti da je kod različitih oboljenja tokom odgovora akutne faze i kod ljudi i kod životinja prisutan pad nivoa HDL čestica, sa padom koncentracije apoA-I i porastom SAA.

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Prvi cilj ove doktorske disertacije je bio da se u krvi i serumu pasa sa klinički jasnim odgovorom akutne faze nastalim usled prirodne infekcije sa *B. canis* (potvrđene komercijalnim *real time* PCR testom i serološkim testovima), uz pomoć rutinskih hematoloških i biohemijskih parametara utvrdi da li postoji poremećaj funkcije pojedinih organa i organskih sistema. Drugi cilj je bio da se ispituju promene u koncentraciji pojedinih frakcija proteina i lipoproteina uz pomoć elektroforeze na agaroznom gelu kao i da se utvrdi da li tokom ovog oboljenja dolazi do promena koncentracije glavnih apoproteina HDL čestica – ApoA-I i SAA. Da bi se ispunili navedeni ciljevi postavljeni su sledeći istraživački zadaci:

1. Prikupljanje viška uzoraka pune krvi i seruma od pasa za koje se sumnja da se nalaze u akutnoj fazi zbog infekcije sa *B. canis* i kontrolnih zdravih pasa.
2. Dijagnostika infekcije pregledom krvnog razmaza, primenom navednog komercijalnog *real time* PCR testa, kao i određivanje titra antitela na *B. canis* uz pomoć komercijalnog serološkog imunofluorescentnog testa.
3. Određivanje i analiza hematoloških i biohemijskih parametara u uzorcima krvi pasa kod kojih je potvrđena infekcija sa *B. canis*.
4. Određivanje koncentracije proteinskih frakcija dobijenih posle elektroforeze na agaroznom gelu.
5. Određivanje odnosa lipoproteinskih frakcija dobijenih posle elektroforeze na agaroznom gelu.
6. Određivanje dominantnih dijametara lipoproteinskih čestica upotrebom gradijent gel elektroforetske tehnike na poliakrilamidnom gelu.
7. Određivanje koncentracije ApoA-I primenom radioimunoesej tehnike i koncentracije SAA upotrebom ELISA testa.

#### 4. MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi i seruma pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* su sakupljeni kao višak materijala posle rutinske dijagnostike bolesti. Sezona pojave babezioze kod pasa dostiže vrhunac tokom aprila i maja meseca, tako da su uzorci sakupljeni tokom navedenih meseci u endemičnom području.

##### 4.1. Životinje

Višak uzoraka pune krvi i seruma je prikupljen od 30 pasa (15 mužjaka i 15 ženki), različitih rasa, sa kliničkim znacima babezioze. Psi su bili starosti od 1 do 13 godina (medijana 3 godine). Svi psi koji su praćeni tokom ovog ogleda su se nakon standardne terapije sa imidokarb-dipropionatom uspešno oporavili. Određeni su kriterijumi za postavljanje dijagnoze i uključivanje pasa u studiju i oni su se sastojali u sledećem:

1. prisustvo kliničkih znakova (inapetencija, letargija, bledilo vidljivih sluznica) kod pasa koji ukazuju na akutnu infekciju babezijom.
2. Krvni razmaz obojen BioDiff® (BioGnost, Croatia) pozitivan na prisustvo intraeritrocitnih razvojnih oblika velikih babezija.
3. *B. canis* pozitivan test *Tick/Vector Comprehensive RealPCR Panel Canine, IDEXX Laboratories*.

Takođe je u svim uzorcima seruma određen titar antitela na vrste *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* (Mega Screen FLUOBABESIA canis, Diagnostic Megacor, Horbranz, Austria), imunoflorescentnim serološkim testom (eng. *Immunofluorescence antibody tests-IFAT*). Od 30 ispitanih seruma obolelih pasa 16 je bilo IFAT negativno, 10 je imalo detektabilan titar na *B. canis* (1:64), i 4 seruma je imalo visoke titre antitela na *B. canis* i *B. vogeli* (1:2048). Između seroreaktivnih i seronegativnih pasa nije bilo značajne razlike za ispitivane parametre, te psi nisu dalje deljeni u podgrupe već su analizirani objedinjeno. Kontrolnu grupu zdravih pasa je činilo 15 pasa (5 mužjaka i 10 ženki) starosti od jedne do šest godina, (medijana 3 godine), koji su dovedeni u veterinarsku ambulantu radi sterilizacije. Kontrolna grupa pasa nije pokazivala simptome bolesti



tokom kliničkog pregleda i svi psi su bili negativni na krvnom razmazu, PCR-u i IFAT testu. Vlasnici svih pasa koji su ušli u ovu studiju potpisali su da su saglasni da se rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvi i seruma njihovih životinja koristiti u naučne svrhe i budu javno publikovani. Etički komitet Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu je odobrio ogled. Dozvola za ogled je dobijena od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (broj dozvole 323-07-03455/2015-05/3)

#### 4.2. Uzorkovanje krvi

Uzorkovanje krvi tokom dijagnostike babezioze je izvedeno aseptičnom venepunkcijom *V. cephalicae*. Krv je sakupljana u dve vrste epruveta: epruvete sa etilen-diamin-tetra-sirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom (BD<sup>®</sup> Vacutainer USA) radi dobijanja pune krvi za hematološke i PCR analize i u epruvete sa gel separatorom (BD<sup>®</sup> Vacutainer USA). Epruvete sa gel separatorom su centrifugirane na 2500 obrtaja tokom 10 minuta, nakon čega je odvojen serum. Uzorci su uskladišteni na -20°C do izvođenja analiza.

#### 4.3. Citološke analize

Krvni razmazi napravljeni iz pune krvi i obojeni komercijalnom BioDiff<sup>®</sup> bojom su korišćeni kao prvi korak u dijagnostici babezioze. Kriterijum za prepoznavanje velike babezije je bio nalaz merozoita/trofozoita babezije većih od poluprečnika eritrocita prilikom pregleda razmaza svetlosnom mikroskopijom. Broj mladih neutrofila sa obojenog krvnog razmaza je određen brojanjem 100 leukocita. Broj retikulocita je određen supravitalnim bojenjem sa brilijant krezil plavim (Sigma Aldrich). Bojenje je izvedeno prema uputstvu proizvođača, a broj retikulocita na 100 eritrocita je izbrojan na 10 vidnih polja, a zatim je dobijena relativna vrednost retikulocita prebačena u apsolutan broj izračunavanjem prema formuli: broj eritrocita ( $10^{12}$ ) x broj retikulocita / 100.

#### 4.4. Molekularna dijagnostika

U cilju potvrde dijagnoze i određivanja vrste *Babesia* kao i eventualnih koinfekcija sa *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp., primenjena je *real time PCR* tehnika koja je deo komercijalnog panela pod nazivom - *Tick/Vector Comprehensive RealPCR Panel Canine*, IDEXX Laboratories. Testovi su izvedeni u laboratoriji za istraživanje i razvoj firme IDEXX - IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA. Serološko ispitivanje na prisustvo i kvantifikacija antitela na uzročnike *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* je urađeno IFA testom, a brzom kvalitativnom ELISA metodom je ispitano prisustvo antitela na *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp, i *Borrelia* spp. (SNAP Multi-Analyte - IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA.)

#### 4.5. Hematološke analize

Parametri krvne slike (broj eritrocita, leukocita, granulocita, monocita, eozinofila i trombocita, hematokritska vrednost i koncentracija hemoglobina) su određeni na automatskom analizatoru *Abacus Junior Vet* (Diatron, Austrija).

#### 4.6. Kriterijumi za dijagnostiku sepse

Kod svih pasa koji su ušli u studiju je procenjeno da li ispunjavaju kriterijume za dijagnostiku sepse. Kriterijumi za dijagnostiku sepse kod pasa sa akutnom infekcijom prouzrokovanom sa *B.canis* su bili prisustvo minimalno dva od četiri navedena kriterijuma (Matijatko i saradnici, 2009; Okano i saradnici, 2002):

1. Telesna temperatura jednaka ili viša od 39.7°C ili jednaka ili niža od 37.8°C
2. Frekvencija rada srca jednaka 160/min. ili viša
3. Broj respiracija viši od 40/min.
4. Broj leukocita  $4 \times 10^9/L$  ili niži, ili  $12 \times 10^9/L$  ili viši, a od tog broja najmanje 10% da čine mladi, štapićasti neutrofil.

#### 4.7. Spektrofotometrijske analize

Biohemijski parametri ispitivanih seruma su određeni na automatskom biohemijskom analizatoru Technicon RA-XT (Bayer), po uputstvu proizvođača kitova za svaki ispitivani parametar (Elitech, France). Određena je koncentracija ukupnih proteina, albumina, uree, kreatinina, alkalne fosfataze, aspartat amino transferaze, alanin amino transferaze, holesterola, triglicerida i glukoze. Koncentracija ukupnih fosfolipida je određena po protokolu Zilversmita i Davidsa (1950), precipitacijom sa trihlorsirćetnom kiselinom poluautomatskom metodom.

#### 4.8. Određivanje koncentracije SAA

Koncentracija SAA je određena upotrebom komercijalnog ELISA testa (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Tridelta Development Ltd, Ireland) prema uputstvu proizvođača. Absorbanca uzoraka u mikrotitarskoj ploči je očitana na ELISA čitaču (Elx800, Biotek) na 450 nm.

#### 4.9. Horizontalna elektroforeza

Za određivanje proteinskih i lipoproteinskih frakcija seruma korišćeno je elektroforetsko razdvajanje na agaroznom gelu.

##### 4.9.1. Elektroforeza lipoproteina

Elektroforetsko razdvajanje lipoproteina seruma je izvedeno upotrebom komercijalnih agaroznih gelova (SAS lipoprotein, Helena Laboratories) po uputstvu proizvođača u SAS-MX horizontalnoj kadi za elektroforezu (Helena Laboratories, Beaumont, Texas). Gelovi su skenirani u Epson perfection v800 skeneru na 1200 dpi, a denzitometrijska analiza je urađena u TotalLab TL120 programu.

#### 4.9.2. Elektroforeza proteina

Agarozni gelovi su pripremani izlivanjem 1% agaroze na folije veličine 9x11 cm. Elektroforeza je izvođena u SAS-MX horizontalnoj kadi za elektroforezu (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) u barbiturnom puferu tokom 45 minuta i 80 V. Nakon završene elektroforeze, gelovi su sušeni na 60°C tokom 20 minuta, a nakon toga bojani u 0.1% *Comassie brilliant blue* boji. Nakon bojenja, gelovi su odbojavani u rastvoru za odbojavanje (10% vodeni rastvor sirćetne kiseline i 20% vodeni rastvor metanola). Gelovi su skenirani upotrebom Epson V800 skenera na 1200 dpi. TotalLab TL120 program je korišćen za denzitometrijsku analizu skeniranih gelova. Koncentracija proteina u pojedinim elektroforetskim frakcijama (g/L) je dobijena množenjem procenta (%) elektroforetske frakcije sa vrednošću ukupnih proteina (g/L) i deljenjem te vrednosti sa 100.

$$A = B \times C : 100$$

A- koncentracija proteina u pojedinim elektroforetskim frakcijama (g/l)

B-relativna zastupljenost pojedinih elektroforetskih frakcija (%)

C- koncentracija ukupnih proteina (g/l)

#### 4.10. Vertikalna elektroforeza

Dominantni dijometri lipoproteina su određeni upotrebom vertikalne gradijentne SDS elektroforetske tehnike. Korišćeni su gradijentni (3-31%) poliakridamidni gelovi. Potporni medijum se sastojao od segmenata poliakrilamida različitih koncentracija, pri čemu se veličina pora progresivno smanjivala sa porastom koncentracije poliakrilamida. Pod dejstvom jednosmerne struje, pri konstantnom naponu, lipoproteinske čestice su se kretale niz gel i razdvajale na osnovu razlika u veličini. Primenom kompozitnog gradijent (3-31%) gela postignuto je istovremeno razdvajanje LDL i HDL čestica. Za pripremanje gelova korišćen je *Hoefler SE 675* sistem (*Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria*). Elektroforeza je izvođena u vertikalnom sistemu *Hoefler SE 600 Ruby* (*Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria*). Gradijentni gelovi su izlivani uz pomoć dve pumpe *Masterflex L/S* (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills,

IL, USA), dok je rad pumpi programski kontrolisan upotrebom programa *Masterflex Linkable Instrument ControlSoftware (WinLIN)*. Elektroforeza je izvođena pri sledećim uslovima: 13 minuta pri konstantnoj voltaži od 60 V, 20 minuta na 170 V i 20 sati na 200 V. Po završetku elektroforeze, gelovi su skinuti sa vertikalnog nosača u kadi, a zatim se traka sa proteinskim standardima odsecala sa gela. Gelovi su se fiksirali sat vremena u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline, a zatim sat vremena ispirali u 45% rastvoru etanola. Sledilo je bojenje u rastvoru Sudan black B (Merck, Darmstadt, Germany), preko noći. Rastvor boje sadržao je 5 g/L Sudan black B u 45% etanolu, a pripreman je mešanjem uz zagrevanje na 50°C u toku jednog sata. Nakon bojenja, gelovi su se preko noći odbojavali u 45% etanolu. Traka sa proteinskim standardima se fiksirala sat vremena u 10% trihlorsirćetnoj kiselini, a zatim ispirala destilovanom vodom i boji 5 sati sa 0,75% rastvorom boje *Coomassie brilliant blue G-250* (Sigma, St. Louis, MO, USA) u smeši etanola, sirćetne kiseline i vode (zapreminski odnos 3:1:8). Uklanjanje viška boje vršilo se pomoću smeše etanola, sirćetne kiseline i vode (zapreminski odnos 3:1:8), na horizontalnoj mešalici nekoliko sati. Nakon odbojavanja, gelovi i proteinski standardi su se ostavljali preko noći u TRIS puferu, pH 8,35 da bi uspostavili prvobitni oblik i veličinu, a zatim skenirali. Po završetku skeniranja, gelovi su se čuvali na 4°C u hermetički zatvorenim plastičnim kesicama u TRIS puferu, pH 8,35 uz dodatak Na-azida (20 mg/L). Za izradu kalibracione krive prilikom određivanja HDL i LDL dijametara, korišćeni su proteini velike molekulske mase (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) i poznatih dijametara: tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12,2 nm), laktat-dehidrogenaza (8,4 nm) i albumin (7.1 nm).

Gelovi su skenirani upotrebom *Image ScannerIII* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) skenera i programa *Magic Scansoftware* (version 4,6;1999; UMAX Data Systems, Inc). Analiza dobijenih skenova je urađena u programu *Image Quant software* (version 5.2;1999; Molecular Dynamics).

#### 4.11. Određivanje relativne koncentracije apolipoproteina A-I (ApoA-I)

Koncentracija Apolipoproteina A-I u serumima ispitivanih pasa je određena upotrebom radioimunoesej tehnike (engl. *radioimmunoassay*- RIA).

#### *4.11.1. Vezivanje antitela i seruma za površinu plastike*

Anti-ApoA-I antitela (Santa Cruz Biotechnology, USA) su adsorbovana na epruvete posle delimične denaturacije. Adsorpcija antitela (0.5 µg/epruveti) je izvođena inkubiranjem u 0,05 M fosfatnom puferu pH 7,2-7,4 sa 0,15 M NaCl preko noći na 4°C. Posle ispiranja fosfatnim puferom, nezasićena mesta na površini epruveta su blokirana inkubiranjem 1% rastvora goveđeg albumina u fosfatnom puferu, tokom dva sata na 37°C. Nakon inkubacije, epruvete su isprane fosfatnim puferom i korišćene za rad.

Serumi psa su adsorbovani na polistirenskim epruvetama u razblaženjima 1/3000, 1/6000, 1/12000 i 1/24000, u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,6. Posle inkubacije preko noći na 4°C i blokiranja nezasićenih mesta na plastici 1% rastvorom goveđeg albumina, epruvete su isprane, osušene i korišćene za rad.

#### *4.11.2 Obeležavanje antitela radioaktivnim izotopom I<sup>125</sup>*

Obeležavanje antitela je rađeno po metodi Huntera i Greenwooda (1962). Radioaktivnim izotopom joda (1 mCi) obeležavano je 0,025 mg anti-ApoA-I antitela.

#### *4.11.3. Optimizacija uslova testa*

**Odvojena inkubacija:** Po 100 µL seruma pasa obolelih od babezije i zdravih kontrolnih pasa (razblaženje 1/10, 1/1000 i 1/10000) je inkubirano preko noći na sobnoj temperaturi uz mućkanje u epruvetama sa vezanim antitelima. Razblaženja seruma su pravljena u diluentu za CA 19-9 (serum konja). Nakon ispiranja, u epruvete je dodavano po 100 µL jodovanih/jodiranih anti-ApoA antitela (aktivnost 500000 cpm). Nakon inkubacije od 3 sata, epruvete su isprane i zadržana radiaktivnost je merena u gama-brojaču.

**Zajednička inkubacija:** Serumi pasa u količini od po 100 µL (nerazblaženi i 1/10 razblaženje) i 100 µL jodiranih anti-ApoA-I antitela (aktivnost 500000 cpm) je inkubirano 3 sata na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Nakon inkubacije epruvete su isprane, a zadržana radioaktivnost je merena u gama-brojaču.

Razblaženja seruma pasa su napravljena u PBS-u koji sadrži 0,5% kazein. Nakon inkubacije, epruvete su isprane, a zadržana radioaktivnost je merena u gama-brojaču.

#### *4.12. Statistika*

Za statističku obradu podataka korišćen je program MedCalc. Dobijeni podaci su testirani na normalnost distribucije, koja je odbačena, pa su primenjivani neparametrijski statistički testovi. Za ispitivanje značajnosti razlika između bolesnih i zdravih pasa korišćen je Mann-Whitney test. Kada je prilikom poređenja grupa vrednost  $p$  bila ispod 0.05, razlika se smatrala statistički značajnom. Za parametere inflamacije i lipide seruma određen je Pearson-ov koeficijent korelacije sa vrednošću dominantnog dijametra HDL-a. Radi ispitivanja povezanosti parametara inflamacije i lipidnog statusa sa koncentracijom HDL-2 i HDL-1 frakcija, urađena je multipla regresiona analiza.

## 5. REZULTATI

Analiza kliničke slike, hematoloških i biohemijskih parametara krvi i seruma je dala uvid u opšte stanje životinje kao i uvid u funkcionalno stanje pojedinih organa i organskih sistema.

Većina pasa iz grupe akutno inficiranih sa *B. canis* je ispunjavala kriterijume prema kojima se može postaviti dijagnoza sepse (tabela 5.). Kod oko trećine obolelih pasa vlasnici su prijavili prisustvo anoreksije, dok žuto prebojavanje vidljivih sluznica nije bio dominantan nalaz (tabela 5.).

**Tabela 5.** Broj preživelih, prisustvo sepse i žutice kod ispitivanih pasa

Grupe (n)	Preživeli	Sepsa	Anoreksija	Žutica
B	30/30	22/30	6/30	3/30
K	15/15	0/15	0/15	0/15

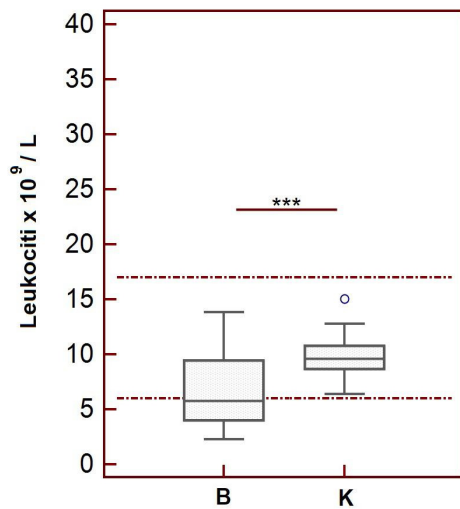
B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa.

### 5.1. Rezultati ispitivanja parametara bele i crvene krvne slike

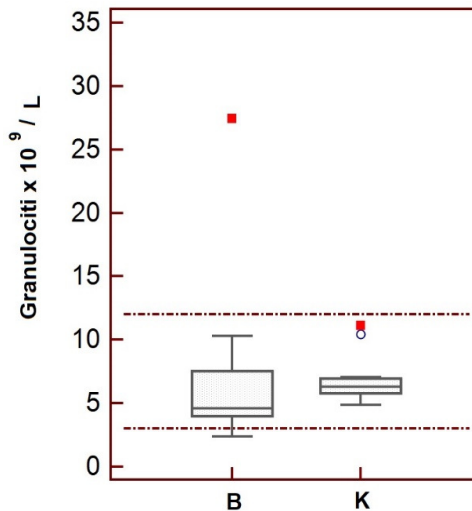
Analiza parametara bele krvne slike je pokazala da je grupa obolelih pasa u odnosu na kontrolnu grupu imala manji broj leukocita (Grafikon 1. A), dok broj granulocita nije bio značajno različit između ispitivanih grupa (Grafikon 1. B). Značajno manji broj limfocita i trombocita u odnosu na kontrolnu grupu takođe je detektovan kod pasa sa akutnom babezozom (Grafikon 1. C, D).



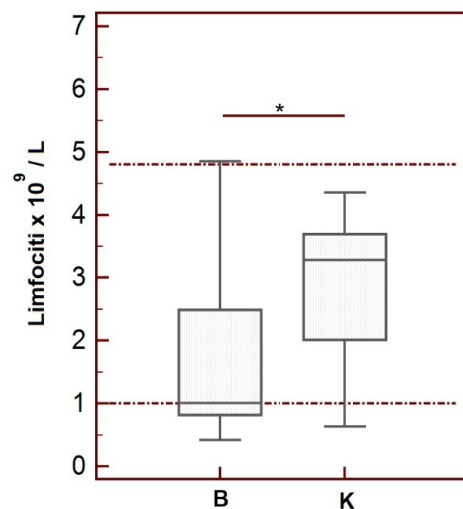
A



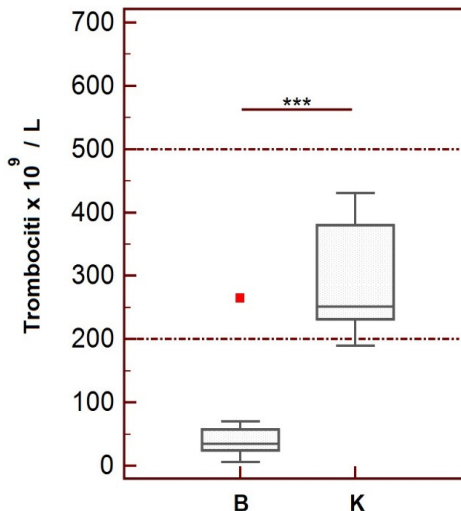
B



C



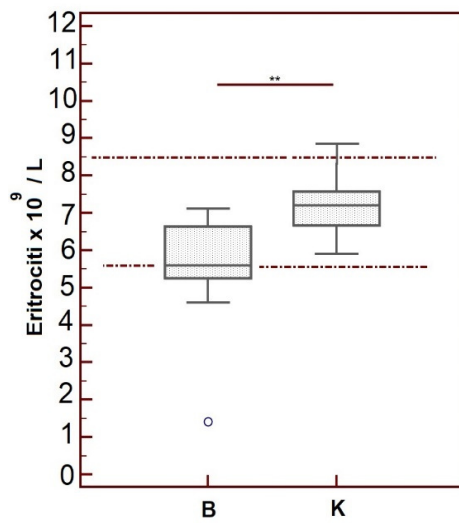
D



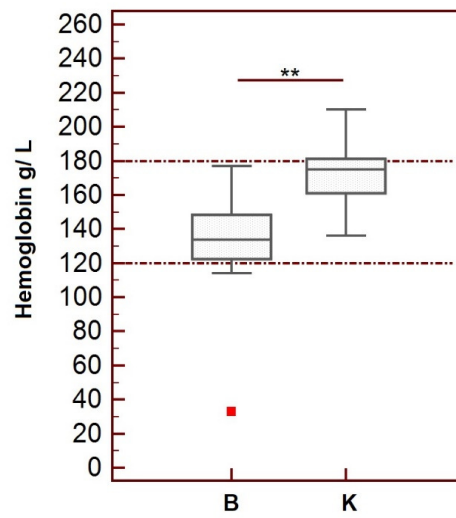
**Grafikon 1.** Parametri bele krvne slike kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) Broj leukocita x 10<sup>9</sup>/ L, B) Broj neutrofila x 10<sup>9</sup>/ L, C) Broj limfocita x 10<sup>9</sup>/ L, D) Broj trombocita x 10<sup>9</sup>/ L . B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Analiza parametara crvene krvne slike je pokazala da psi oboleli od babezioze imaju manji broj eritrocita, nižu koncentraciju hemoglobina kao i nižu hematokritsku vrednost u odnosu na kontrolne zdrave pse (Grafikon 2. A, B, C.). Broj retikulocita kod obolelih pasa je bio u proseku  $40 \times 10^9 / L$ .

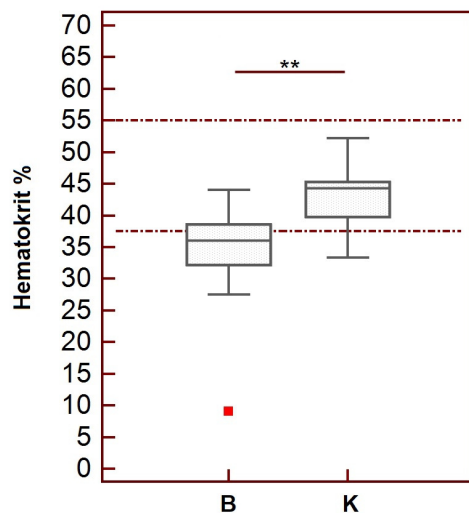
A



B



C



**Grafikon 2.** Parametri crvene krvne slike kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) Broj eritrocita x 10<sup>12</sup>/L, B) Koncentracija hemoglobina g/L C) hematokritska vrednost %. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-

Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Dominantne detektovane hematološke promene kod obolelih pasa su leukopenija, limfopenija, anemija i trombocitopenija (tabela 6.). Leukocitoza i neutrofilija su detektovane kod jednog, dok trombocitoza nije detektovana ni kod jednog psa (tabela 6.).

Tabela 6. Broj pasa koji pokazuju hematološke promene

Parametri	B n=30	K n=15	Referentni interval
Leukopenija	16/30	ISQ	6-17×10 <sup>9</sup> /L
Leukocitoza	1/30	ISQ	
Neutrofilija	1/30	ISQ	3-12×10 <sup>9</sup> /L
Neutropenija	3/30	ISQ	
Limfopenija	11/30	ISQ	1-4.8×10 <sup>9</sup> /L
Limfocitoza	2/30	ISQ	
Anemija	20/30	ISQ	37-55%
Trombocitopenija	28/30	ISQ	200-500×10 <sup>9</sup> /L
Trombocitoza	0/13	ISQ	

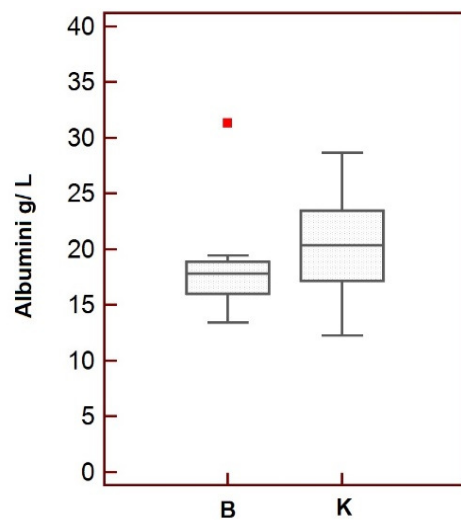
B-grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K-kontrolna grupa zdravih pasa, ISQ- in status Quo.

## 5.2. Rezultati elektroforetski razdvojenih proteina

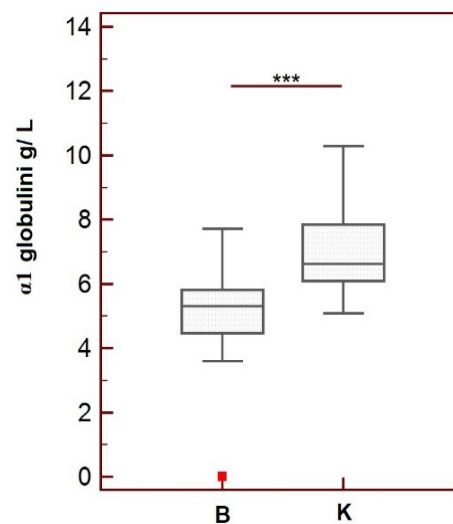
Rezultati analize frakcija globulina seruma razdvojenih na agaroznoj elektroforezi su pokazali da je kod pasa inficiranih sa *B. canis* koncentracija  $\alpha$ 1-globulina niža u odnosu na zdrave pse (Grafikon 3. B). Koncentracija albumina i

proteina u  $\beta$ - i  $\gamma$ - globulinskim frakcijama seruma se nije razlikovala između ispitivanih grupa (Grafikon 3. A, C, D, E, F).

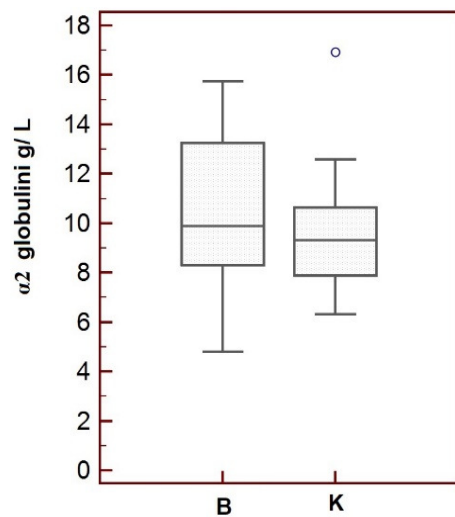
A



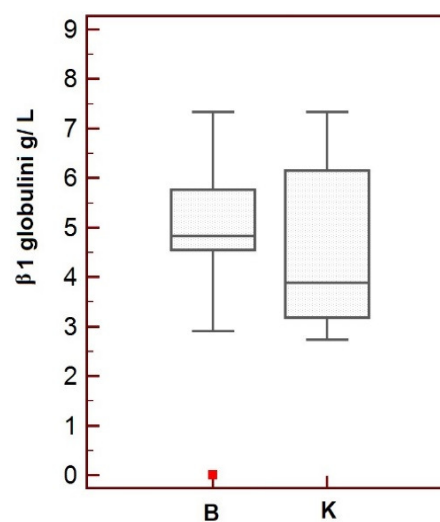
B



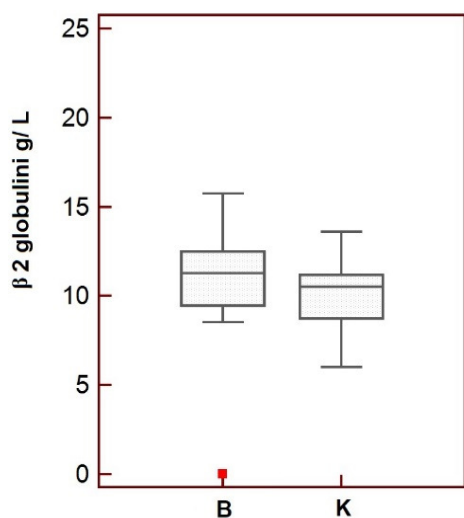
C



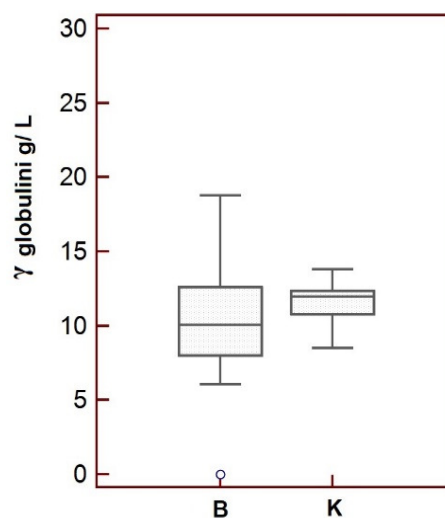
D



E



F

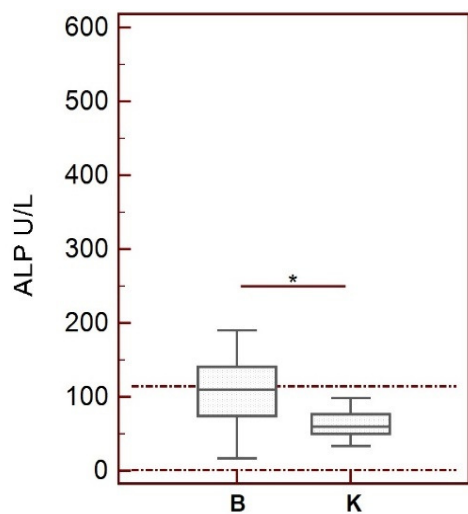


Grafikon 3. Globulinske frakcije seruma kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) Albumini g/L, B)  $\alpha$ 1 globulini g/L, C)  $\alpha$ 2 globulini g/L, D)  $\beta$ 1 globulini g/L, E)  $\beta$ 2 globulini g/L, F)  $\gamma$  globulini g/L B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

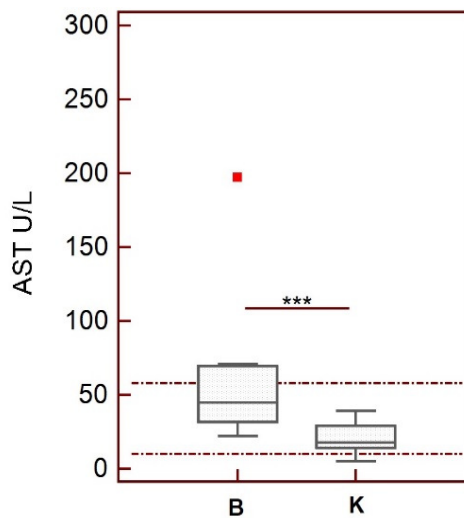
### 5.3. Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara

Aktivnosti alkalne fosfataze i aspartat aminotransferaze su bile više kod obolelih pasa u odnosu na zdrave pse (Grafikon 4. A, B), dok se aktivnost alanin-aminotransferaze nije razlikovala između ispitivanih grupa (Grafikon 4. C). Koncentracija ukupnih proteina nije se značajno razlikovala između grupe obolelih i zdravih pasa (Grafikon 4. D).

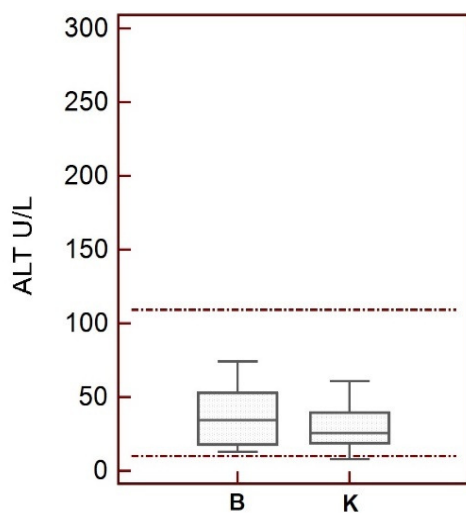
A



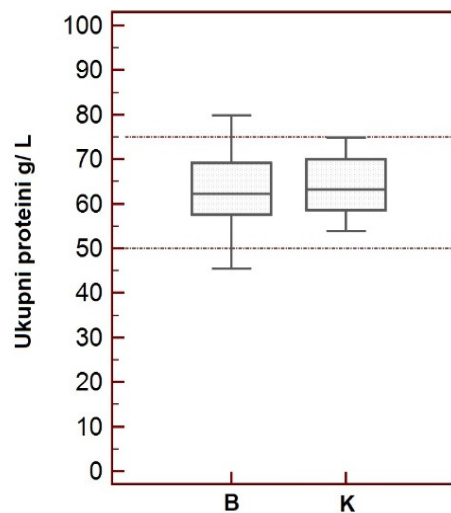
B



C



D

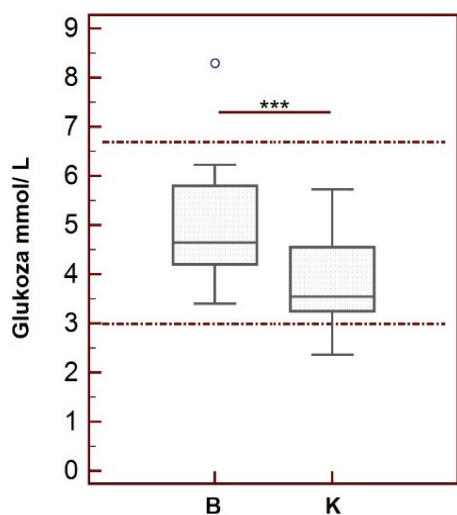


Grafikon 4. Biohemijski parametri, pokazatelji funkcije jetre kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) aktivnost alkalne fosfataze U/L, B) aktivnost aspartataminotransferaze U/L, C) aktivnost alanin aminotransferaze U/L, D) koncentracija ukupnih proteina g/L. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-

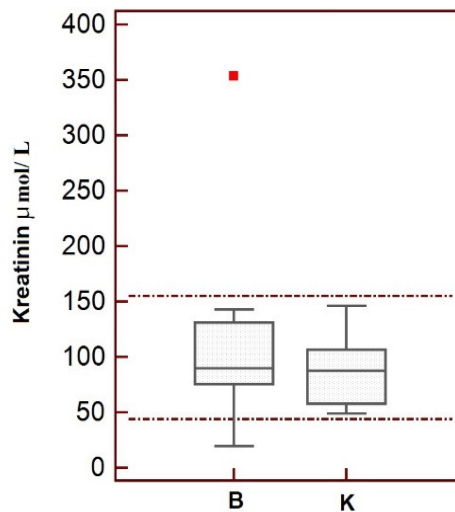
Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Koncentracija glukoze je bila viša kod pasa inficiranih sa *B. Canis* (Grafikon 5. A). Koncentracije kreatinina i uree nisu se razlikovale između ispitivanih grupa (Grafikon 5. B, C).

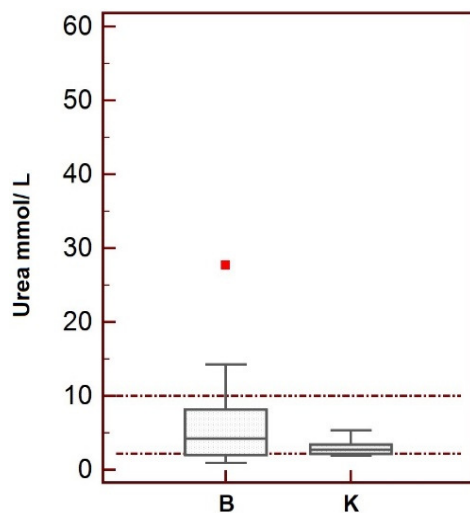
A



B



C



Grafikon 5. Biohemijski parametri, pokazatelji funkcije bubrega i koncentracija glukoze kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* ( $n=30$ ) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa ( $n=15$ ). A) koncentracija glukoze mmol/L, B) koncentracija kreatinina  $\mu\text{mol/L}$ , C)



koncentracija uree mmol/L. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Dominantne biohemijske promene koje su detektovane kod ispitivanih pasa su povišene aktivnosti alkalne fosfataze i aspartat-aminotransferaze (tabela 7.). U manjoj meri je detektovana hiperglikemija kao i porast koncentracije uree (tabela 7.). Porast aktivnosti alanin-amino transferaze nije detektovan ni kod jednog psa (tabela 7.).

Tabela 7. Broj pasa kod kojih su detektovane biohemijske promene

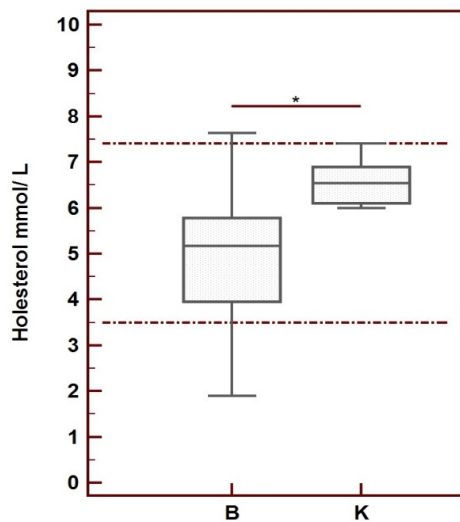
Parametri	B n=30	K n=15	Referentni interval
Hiperglikemija	6/30	ISQ	3.0-6.7 mmol/L
↑ALP	14/30	ISQ	1-114 U/L
↑ALT	0/13	ISQ	10-109 U/L
↑AST	8/30	ISQ	10-58 U/L
↑UREA	6/30	ISQ	2.9-10 mmol/L
↑KREATININ	1/30	ISQ	44-150 $\mu$ mol/L

B-grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K-kontrolna grupa zdravih pasa, ISQ- in status Quo.

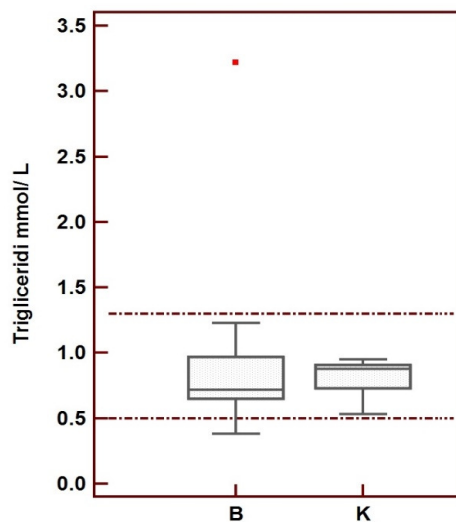
#### 5.4. Rezultati ispitivanja lipida seruma

Koncentracija holesterola je bila niža kod pasa akutno obolelih zbog infekcije sa *B. canis* u odnosu na zdrave pse, iako je kod većine pasa vrednost holesterola bila u okviru referentnih vrednosti (Grafikon 6. A). Koncentracija triglicerida se nije razlikovala, dok je koncentracija fosfolipida bila niža kod obolelih životinja (Grafikon 6. B, C).

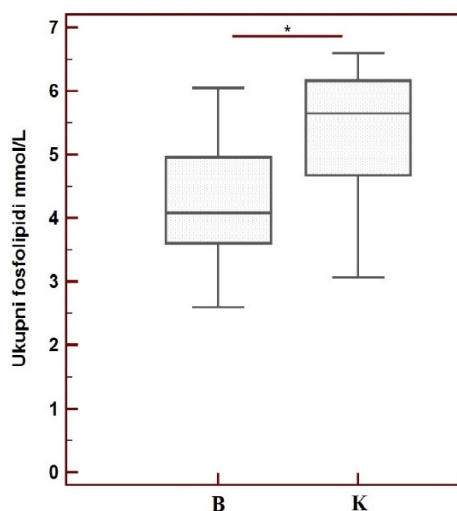
A



B



C

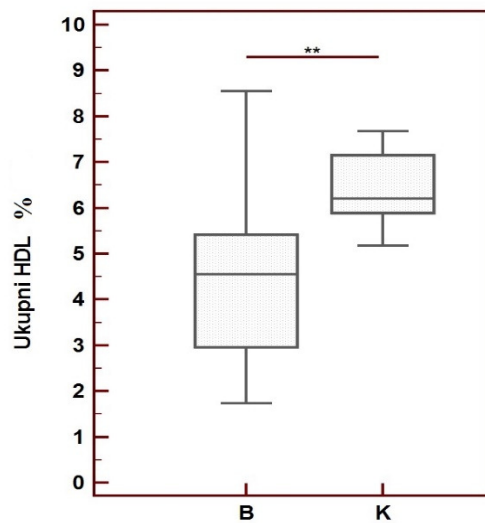


Grafikon 6. Biohemijski parametri-lipidi serumakod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) koncentracija holesterola mmol/L, B) koncentracija triglicerida mmol/L, C) koncentracija ukupnih fosfolipida mmol/L. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

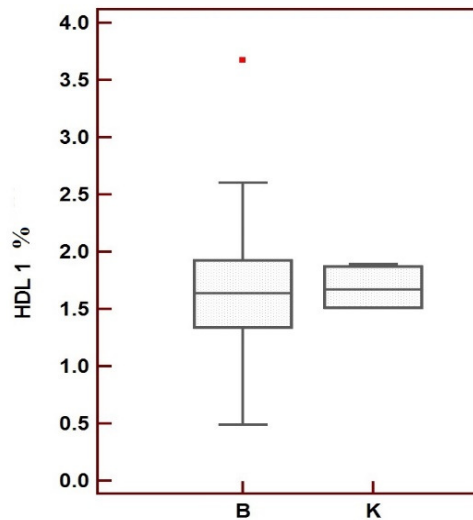
### 5.5. Rezultati ispitivanja lipoproteinskih frakcija seruma i dominantnih dijametara HDL-a i LDL-a

Posle elektroforetskog razdvajanja lipoproteina na agaroznom gelu, dobijene su dve glavne frakcije lipoproteina,  $\alpha$ - i  $\beta$ - frakcija. Značajno veći udeo u ukupnim lipoproteinima je činila  $\alpha$ -frakcija sa vrlo jasno izdvojenom podfrakcijom  $\alpha_1$  koja je kod zdravih pasa imala 50-80% udela u ukupnim lipoproteinima. Udeo ukupne  $\alpha$ -frakcije je bio nešto niži kod obolelih u odnosu na zdrave pse (Grafikon 7. A). Gledano po frakcijama HDL-a, HDL - 1 se nije razlikovao između ispitivanih grupa (Grafikon 7. B), dok je HDL - 2 bio značajno niži kod obolelih u odnosu na zdrave pse (Grafikon 7. C). Frakcija bogata trigliceridima (engl. *triglyceride rich lipoproteins* - TRL) nije se značajno razlikovala između ispitivanih grupa (Grafikon 7. D).

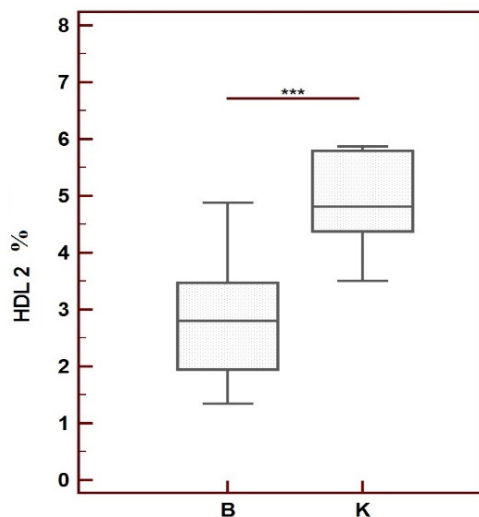
A



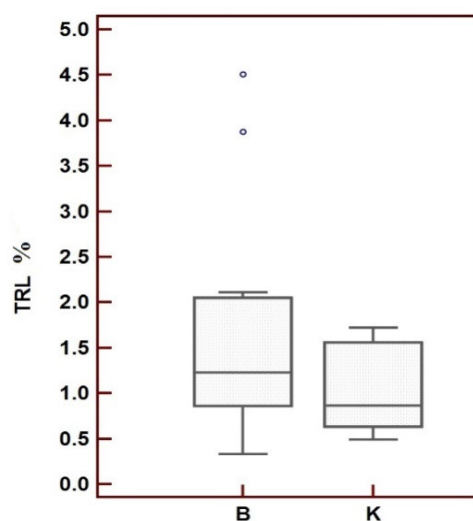
B



C

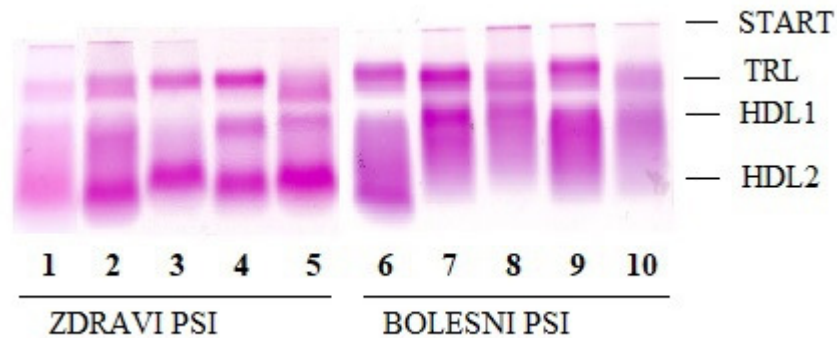


D

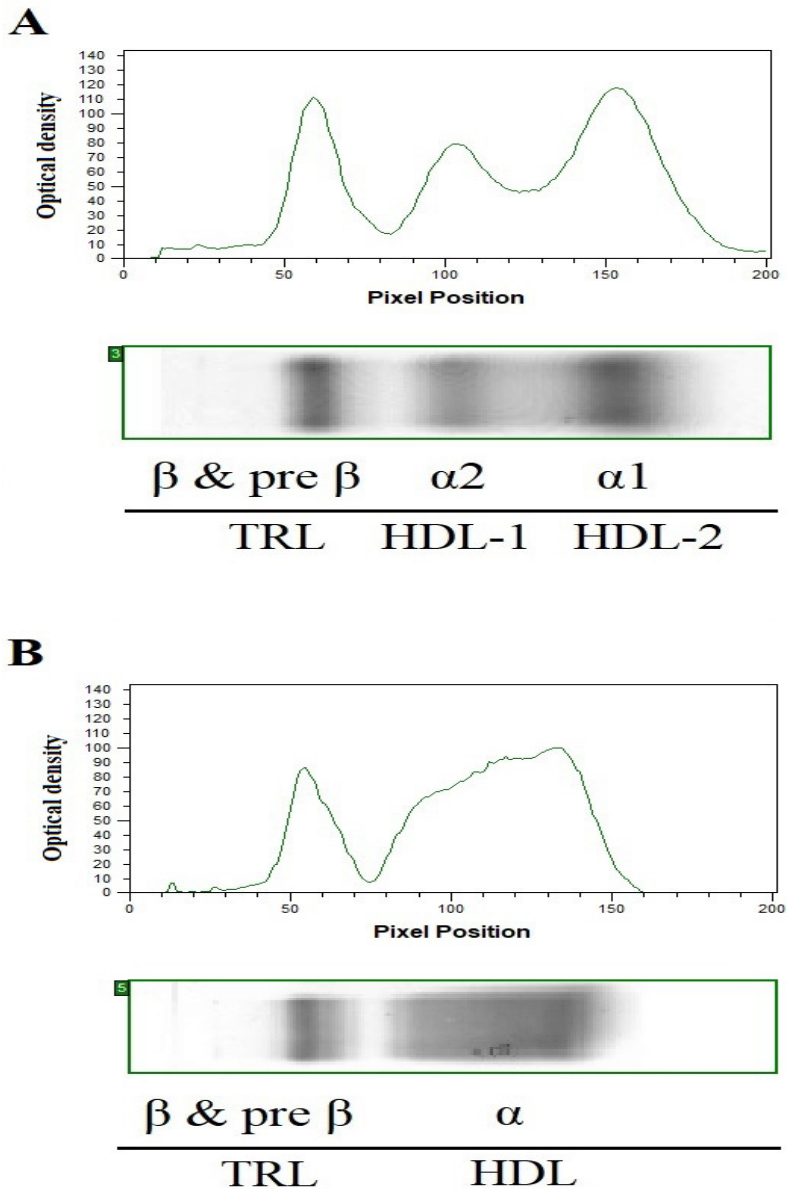


Grafikon 7. Lipoproteinske frakcije seruma kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) Ukupni HDL %, B) HDL - 1 frakcija %, C) HDL - 2 frakcija %, D) TRL frakcija %. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Lipoproteini razdvojeni elektroforetski na agaroznom gelu reprezentativnih uzoraka zdravih (1-5) i pasa akutno inficiranih sa *B. canis* (6-10) prikazani su na slici 1. Na slici se jasno vidi gubljenje HDL-2 kao i kraća migratorna distanca alfa lipoproteina kod obolelih pasa (slika 1 i 2).



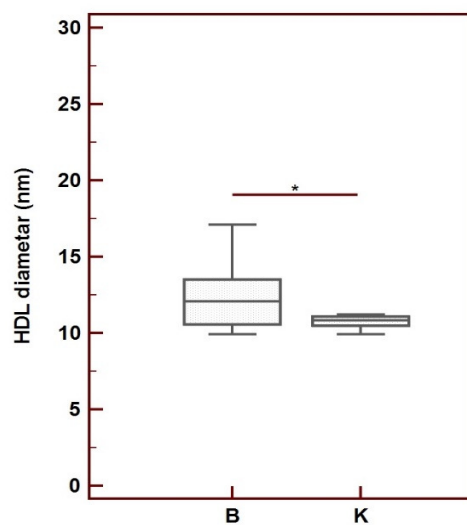
Slika 1. Prikaz skeniranog gela razdvojenih lipoproteinskih frakcija kod zdravih i pasa akutno inficiranih sa *B. canis* razdvojenih na agaroznom gelu; Zdravi kontrolni psi (1-5); Psi akutno inficirani sa *B. canis* (6-10), TRL-trigliceridima bogati lipoproteini (engl. *tryglyceride rich lipoproteins*), HDL-lipoproteini vrlo visoke gustine (engl. *high density lipoproteins*).



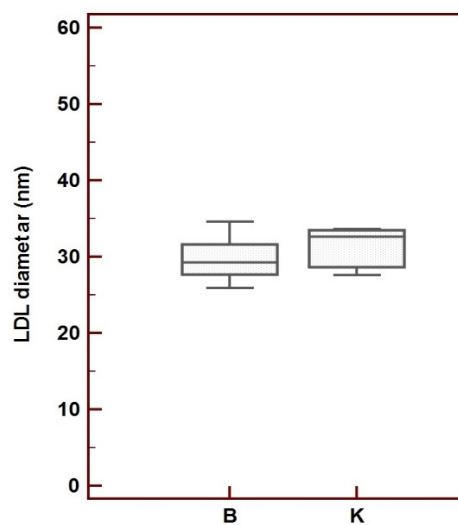
Slika 2. Reprezentativni elektroforezogrami (A) zdravog i (B) psa inficiranog sa *B. canis*; TRL-trigliceridima bogati lipoproteini (engl. *tryglyceride rich lipoproteins*), HDL-lipoproteini vrlo visoke gustine (engl. *high density lipoproteins*).

Dominantni dijametar HDL čestica je bio veći kod obolelih pasa u odnosu na zdrave pse (Grafikon 8. A), dok dominantan dijametar LDL čestica nije bio različit između ispitivanih grupa (Grafikon 8. B).

A



B

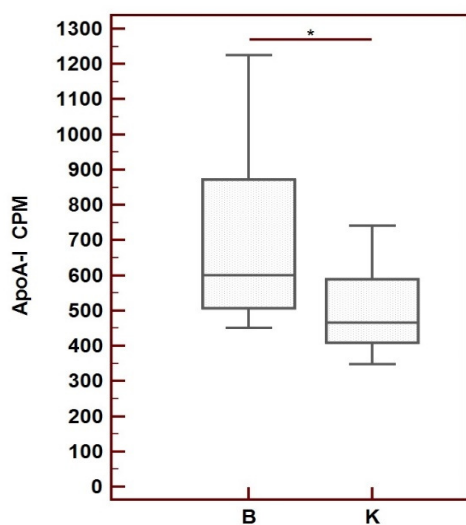


Grafikon 8. Dominantni dijometri HDL-a i LDL-a kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) dominantni dijametar HDL čestica nm, B) dominantni dijametar LDL čestica nm. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

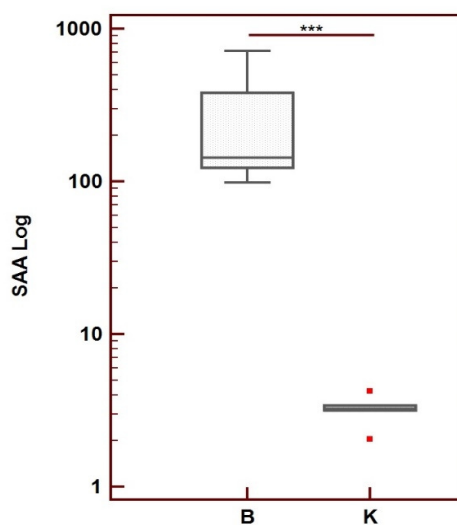
## 5.6. Rezultati ispitivanja koncentracije proteina akutne faze

Koncentracije ApoA-I i SAA su bile više kod obolelih pasa u odnosu na zdrave (Grafikon 9. A, B). Uočava se da nema preklapanja vrednosti SAA kod zdravih i bolesnih pasa (Grafikon 9. B), dok za koncentraciju ApoA-I to nije slučaj (Grafikon 9. A).

A



B



Grafikon 9. Koncentracija serum amiloida A i apolipoproteina A-I kod pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* (n=30) tokom odgovora akutne faze i kontrolnih, zdravih pasa (n=15). A) koncentracija ApoA-I, B) koncentracija SAA. B - grupa pasa inficirana sa *B. canis*, K - kontrolna grupa zdravih pasa. Kvadrati predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu (25-75 percentila). Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalne linije povezuju minimalnu i maksimalnu vrednost. Isprekidane linije označavaju fiziološke vrednosti. Mann-Whitney test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



Radi ispitivanja koji od parametara (SAA, ApoA-I, ukupni holesterol, trigliceridi i fosfolipidi) je povezan sa vrednošću dominantnog HDL dijametra, određen je Pirsonov koeficijent korelacije (r). Značajna pozitivna korelacija je detektovana za vrednosti koncentracije SAA i dominantnog dijametra HDL-a (Tabela 8.).

Tabela 8. Koeficijent korelacije dominantnog dijametra HDL-a i parametara inflamacije i lipida seruma

Parametri	r	p
SAA	0.5807	0.0115
Ukupni holesterol	0.2237	0.3298
Trigliceridi	0.1296	0.5755
Ukupni fosfolipidi	-0.1026	0.6760
ApoA-I	0.2391	0.2965

SAA-serum amiloid A, ApoA-I-apoprotein A-I, r-Pirsonov koeficijent korelacije

Radi ispitivanja koji je od ispitanih parametara inflamacije i lipidnog statusa povezan sa koncentracijom HDL2 i HDL1 frakcija kao zavisnih varijabli urađena je multipla regresiona analiza. Za koncentraciju HDL2, nezavisne varijable uključene u model su SAA, WBC, GRA,  $\gamma$  globulini, ukupni holesterol i trigliceridi. Značajna povezanost je ustanovljena za SAA i ukupni holesterol (Tabela 9.). Za koncentraciju HDL1 iste nezavisne varijable su bile uključene u model. Značajna veza je detektovana samo za koncentraciju  $\gamma$  globulina (Tabela 9).

Tabela 9. Povezanost frakcija HDL-a parametara inflamacije i lipidnog statusa

HDL2/variabla	r-partial	p
Hol	0.73	0.026
SAA	-0.55	0.0412
HDL1/variabla	r-partial	p
$\gamma$ -globulini	0.54	0.0241

Hol-ukupni holesterol, SAA-serum amiloid A; Multipla regresiona analiza.

## 6. DISKUSIJA

Najvažniji rezultati ove studije pokazuju da psi, kod kojih je utvrđeno da imaju odgovor akutne faze usled nekomplikovane forme infekcije sa protozom *B. canis*, imaju specifičan oblik disproteinemije i dislipoproteinemije koji se karakteriše padom  $\alpha$ 1-globulinske frakcije i  $\alpha$ 1-lipoproteinske frakcije na elektroforezi izvedenoj na agaroznom gelu. Te promene su bile praćene padom koncentracije holesterola i fosfolipida i porastom koncentracije ApoA-I i SAA. Oba navedena proteina su apoproteini HDL čestica. Jedinstvena promena uočena u ovoj studiji je porast koncentracije ApoA-I, apoproteina koji pripada negativnim proteinima akutne faze.

### 6.1. Hematološke i biohemijske promene

Kombinacijom kliničkog pregleda i laboratorijskih analiza, utvrđeno je da približno 80% pasa sa odgovorom akutne faze izazvanim infekcijom sa *B. canis* ispunjava kriterijume koji ukazuju da pacijenti imaju sepsu. Kriterijumi koji su bili prisutni, a koji su mogli da se konstatuju analizom krvne slike su bili leukopenija zbog limfopenije ali sa povećanjem broja mladih neutrofilnih granulocita. Odusustvo neutrofilije uz povećanje broja mladih neutrofilnih granulocita može da znači da je većina zrelih neutrofilnih granulocita prešla u marginalnu populaciju leukocita zbog ekspresije adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama, a usled dejstva pro-inflamatornih citokina. Takođe se može pretpostaviti da obim granulopoeze nije adekvatan potrebama organizma. Razlog toj pojavi može biti imunosupresija koja može da nastane u nekim slučajevima usled infekcije sa *Babesia* spp. (Adachi i saradnici, 1993). Najčešća hematološka promena tokom akutne, nekomplikovane forme infekcije pasa sa *B. canis* u grupi obolelih pasa je bila trombocitopenija (broj trombocita ispod  $100 \times 10^9/L$ ) ali bez klinički vidljive hemoragične dijateze. Ovi nalazi su u saglasnosti sa podacima drugih autora (Furlanello i saradnici, 2005; Matijatko i saradnici, 2007; Schetters i saradnici, 2009). Ispitivanjem trombocitopenije kod 1150 slučajeva babezioze i 10000 drugih bolesti kod pasa, zaključeno je da kada trombocitopenija nije prisutna, dijagnoza babezioze se može isključiti sa velikom pouzdanošću (Kettner i

saradnici, 2003). Trombocitopenija kod babezioze pasa je najverovatnije imunski posredovana i praćena sekvestracijom trombocita u slezini (Zygner i saradnici, 2007). Drugi mogući mehanizmi trombocitopenije kod pasa inficiranih sa *B. canis* su njihova povećana aktivacija i potrošnja usled SIRS-a, kao i smanjena proizvodnja u koštanoj srži (Eichenberger i saradnici, 2016). Interesantno je navesti da koncentracija holesterola u prekursorima megakariocita utiče na njihovu proliferaciju. Naime, utvrđeno je da prisustvo ApoA-I omogućava da se iz navedenih ćelija, preko ABCG4 vrši efluks holesterola na HDL (Westersap i saradnici, 2014). Pad koncentracije holesterola u prekursorima megakariocita inhibiše njihovu proliferaciju i posledično utiče na smanjenu proizvodnju trombocita (Westersap i saradnici, 2014). Kako je kod pacijenata ispitivanih u ovoj studiji postojao porast ApoA-I, može se pretpostaviti da je jedan od mehanizama nastanka trombocitopenije upravo porast koncentracije ovog apoproteina.

Polovina ispitivanih pasa je imala blagu neregenerativnu anemiju. Uzrok anemije usled infekcije sa *B. canis* je jednim delom direktno razaranje eritrocita parazitima, ali najvećim delom je imunski posredovano (Shaw i Day, 2005). Kod pacijenata kod kojih anemija nije bila prisutna je najverovatnije postojala dehidracija, koja je maskirala postojeću anemiju (Shaw i Day, 2005). S obzirom na smanjen broj limfocita, nedetektibilan ili jako nizak titar antitela na *B. canis* i nepromenjenu koncentraciju  $\gamma$ -globulina detektovanu kod pasa sa odgovorom akutne faze zbog infekcije uzrokovane *B. canis*, postavlja se pitanje da li je trombocitopenija i eritropenija uzrokovana predominantno imunskim mehanizmima? Buduća istraživanja bi trebalo usmeriti na mehanizme nastanka trombocitopenije i eritropenije tokom odgovora akutne faze kod infekcije sa *B. canis*.

Ipak, važno je istaći da su pacijenti, čiji su uzorci obrađeni u ovom istraživanju, imali nekomplikovanu formu infekcije sa *B. canis*, bez evidentnog otkazivanja organa. Komplikovana forma uključuje poremećaje funkcije centralnog nervnog sistema, bubrega, pluća i jetre i može imati letalni ishod (Matijatko i saradnici, 2009). U našem istraživanju, porast aktivnosti AP iznad fizioloških vrednosti je utvrđen kod oko polovine pasa, AST-a kod jedne trećine pasa, dok aktivnost ALT-a nije bila povišena. Istraživanja drugih autora su takođe pokazala porast aktivnosti AP tokom odgovora

akutne faze kod infekcije pasa sa *B. canis*, ali njeno poreklo nije ispitivano (Eichenberger i saradnici, 2016, Furlanello i saradnici, 2005). Može se pretpostaviti da porast aktivnosti AP, bez porasta aktivnosti ALT, i bez porasta koncentracije holesterola, ukazuje da kod ispitivanih pasa nije postojala holestaza, već da je zapravo povećana aktivnost izoforme AP indukovane kortikosteroidima. Ova izoforma AP je specifična za pse i može se uočiti kod stresa, hiperadrenokroticizma ili aplikacije kortikosteroida (Eckersall i saradnici, 1986). Urea i kreatinin nisu bili značajno povišeni u odnosu na zdrave kontrolne pse, što govori da funkcija bubrega kod inficiranih pasa nije bila narušena.

Interesantno je istaći da slabiji odgovor akutne faze u ranoj fazi infekcije kod pacijenata sa utvrđenom sepsom može biti uzrok smrtnog ishoda (Swathi Raju i saradnici, 2016). Stoga se može zaključiti da, bez obzira na prisutne kliničke znake i laboratorijske parametre koji ukazuju na prisustvo sepse kod pasa inficiranih sa *B. canis*, ukoliko je odgovor akutne faze jak i pravovremen, uz blagovremenu terapiju, može se očekivati da će ishod infekcije biti ozdravljenje.

## 6.2. Disproteinemija

Ukupna koncentracija proteina i koncentracija albumina se nije razlikovala između ispitivanih grupa. Analiza proteinskih frakcija je pokazala da akutna infekcija sa *B. canis* uzrokuje značajan pad u  $\alpha$ 1- globulinskoj frakciji. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa literaturnim podacima drugih autora koji su ispitivali odgovor akutne faze tokom infekcija sa *B. canis* i *B. rossi* (Lobetti i saradnici, 2000; Zygner i saradnici, 2011). Eksperimentalno izazvan odgovor akutne faze kod miševa - aplikacijom lipopolisaharida (LPS) ili kompletnog Freund-ovog adjuvansa - je takođe praćen padom u  $\alpha$ 1- globulinskoj frakciji, ali autori nisu mogli da detektuju koji je specifični protein odgovoran za pad ove frakcije (Cray i saradnici, 2010). Nasuprot navedenim promenama koje opisuju pad  $\alpha$ 1- globulinske frakcije, literaturni podaci dobijeni elektroforetskim razdvajanjem proteina na agaroznom gelu, a tokom odgovora akutne faze kod pasa, kao tipičan nalaz saopštavaju porast  $\alpha$ - globulina ( $\alpha$ 1- i  $\alpha$ 2-), koji može biti praćen porastom  $\beta$ - ili  $\gamma$ - globulina (Kaneko i saradnici, 2008). Ipak, hepatitis i

holangiohepatitis kod pasa se ponekad karakteriše padom, a ponekada porastom  $\alpha$ 1-globulinske frakcije (Tappin i saradnici, 2011). Novija studija koja se bavi proteomikom je pokazala da su dominantni proteini koji se nalaze kod pasa u  $\alpha$ 1-globulinskoj frakciji: albumin, ApoA-I, izoforma 2 kininogena-1, serpin peptidaza inhibitor A1 i vitamin D vezujući protein (Atherton i saradnici, 2013). Međutim, još uvek nije jasno koji od ovih proteina dovodi do značajnog pada u  $\alpha$ 1-globulinskoj frakciji tokom odgovora akutne faze kojim se karakterišu i pacijenti u ovoj studiji. Do sada je pokazano da kod pasa sa akutnom inflamacijom usled infekcije sa *B. canis* raste koncentracija više proteina koji spadaju u  $\alpha$ 1-globulinski frakciju:  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein (Lobetti i saradnici, 2000), SAA (Matijatko i saradnici, 2007; Milanović i saradnici, 2017) i prema rezultatima ove studije i ApoA-I. Zbog činjenice da je ukupna koncentracija proteina u  $\alpha$ 1-globulinskoj frakciji smanjena, moguće je pretpostaviti da ostali proteini koji pripadaju ovoj frakciji, a koji su navedeni u studiji Athertona i saradnika (2013) zapravo imaju značajno smanjenu koncentraciju. Takođe, može se pretpostaviti da je elektroforetska pokretljivost proteina, čiji je porast zabeležen u prethodnim i ovoj studiji ( $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein, SAA i ApoA-I), usled inflamacije promenjena, te da se tokom elektroforeze ti proteini neće pozicionirati u  $\alpha$ 1-globulinskoj frakciji, dovodeći do rezultata koji je ovde i opisan.

### 6.3. Promene lipidnog statusa i dislipoproteinemija

Tokom odgovora akutne faze izazvane infekcijom sa *B. canis* kod pasa se mogu detektovati sledeće promena vezane za lipide i lipoproteine: pad koncentracije holesterola i fosfolipida, smanjen udeo  $\alpha$ -lipoproteina, posebno  $\alpha$ 1-lipoproteinske frakcije koja odgovara HDL-2 frakciji lipoproteina i porast dominantnog dijametra HDL čestica. Koncentracija triglicerida i udeo TRL ( $\beta$ -lipoproteini) na elektroforezi izvedenoj na agaroznom gelu nije se razlikovao između ispitivanih grupa.

Kod pasa sa odgovorom akutne faze izazvanim infekcijom sa *B. canis*, koncentracija serumskih triglicerida i TRL-a nije bila promenjena. Kod ljudi i glodara, hipertrigliceridemija je posledica povećane koncentracije VLDL čestica zbog njihove povećane proizvodnje u jetri (niska doza LPS-a) ili smanjenog uklanjanja iz cirkulacije

(visoke doze LPS-a) (Feingold i saradnici, 1993). Psi koji su učestvovali u ovoj studiji su bili anoreksični najmanje 24-48 sati pre dolaska kod veterinara (inapetencija je bio najčešći klinički znak). Kako kratak period gladovanja (36h) kod zdravih pasa uzrokuje pad u TRL (Dedać-Delkić i saradnici, 2018), a oboleli psi u ovoj studiji nisu imali promene u TRL-u, postoji mogućnost da je proizvodnja VLDL-a povećana ili je smanjeno uklanjanje iz cirkulacije, kao što je opisano kod primata i glodara.

Literaturni podaci o promenama koncentracije lipida i lipoproteina seruma tokom infekcije sa babezijom su uglavnom dostupni za goveda i ljude. Tokom infekcije goveda sa babezijom pokazan je pad holesterola, HDL-a i LDL-a (Gooder i saradnici, 1981). Takođe pad u lipoproteinskim frakcijama kod infekcije goveda sa *B. bovis* je detektovan upotrebom elektroforeze na agaroznom gelu (Goodger i saradnici, 1981). Kod ljudi inficiranih sa babezijom je detektovan značajan pad HDL-a (Cunha i Crean, 2000). Kod infekcije ljudi malarijom konzistentan nalaz je pad ukupnog holesterola, HDL-a i LDL-a (Visser i saradnici, 2013).

*De novo* sinteza holesterola je energetski "skup" proces za organizam, a tokom inflamacije ATP se koristi prevashodno u reakcijama neophodnim za adaptaciju organizma na novonastalu situaciju i sintezu pro-inflamatornih i anti-inflamatornih molekula. Zbog toga je tokom odgovora akutne faze obim sinteze holesterola u tkivima smanjen, smanjena je i njegova eliminacija putem žuči, a organizam je primoran da ponovo iskoristi holesterol koji mu stoji na raspolaganju (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Od svih klasa lipoproteina, HDL je glavni nosilac neesterifikovanog i esterifikovanog holesterola kod zdravih pasa (Maldonado i saradnici, 2001). Prema Watson-u (1996), parcijalni maseni udeo holesterola je 35% u okviru HDL-1 i 20% u HDL-2. Gledano sa evolutivnog stanovišta, organizam koji ne unosi hranljive materije, a koji je suočen sa činjenicom da može preživeti jedino ukoliko koristi sopstvene resurse, upravo će putem ekspresije ili inhibicije dejstva brojnih lipaza i receptora na ćelijama kako jetre tako i ekstrahepatičkih tkiva dovesti do potpunog iskorišćavanja "depoa" holesterola koji se nalazi u plazmi u obliku HDL čestica.

Još jedno objašnjenje za pad u koncentraciji holesterola može biti činjenica da mnogi mikroorganizmi, a među njima i oni iz klase *Apicomplexa* u koje spada i *Babesia* spp. nemaju sopstvene enzime za sintezu holesterola, iako im je ovaj molekul

neopohodan za rast i razmnožavanje (Coppens, 2013). Takođe je pokazano da se u eritrocitima inficiranim sa *B. divergens* transfer lipida iz plazme domaćina na parazita dešava upravo preko HDL-a (Valentin i saradnici, 1991). Dalje, razvojni oblici plazmodijuma u eritrocitima, holesterol takođe preuzimaju preko HDL-a, a razvojni oblici *Toxoplasma gondii* i *Cryptosporidium spp.* koji se nalaze u jetri holesterol preuzimaju preko LDL-a (Coppens, 2013). Značajan pad holesterola kod akutno obolelih pasa u odnosu na zdrave, pored promena u metabolizmu lipida mogao bi delimično da se objasni i njegovim preuzimanjem od strane infestiranih ćelija preko HDL-a, a naročito preko HDL-2 frakcije čiji je pad detektovan kod pasa ispitivanih u ovoj studiji.

Hepatična i ekstrahepatična tkiva regulišu metabolizam lipida i lipoproteina u zavisnosti od potreba organizma (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Nakon formiranja nascentnog HDL-a u jetri i crevima, ABCA1, ABCG1 i SR-BI doprinose formiranju HDL-1 (Khovidhunkit i saradnici, 2004; Mineo i Shaul, 2013) koji se kod pasa transportuje iz limfnih sudova u krvotok (Sloop i saradnici, 1983). U fiziološkim uslovima HDL-1 čestice se u jetri remodeliraju aktivnošću hepatične lipaze i uz pomoć SR-BI-a koji selektivno preuzima holesterol estere. Pokazano je da kod pasa 60% holesterol estera iz HDL-a uklanja preko selektivnog preuzimanja od strane jetre (Ouguerram i saradnici, 2004). Prema rezultatima naše studije, psi tokom odgovora akutne faze izazvanim infekcijom sa *B. canis* imaju smanjenje udela HDL-2 čestica i morfološki/kvalitativno izmenjene HDL-1 čestice. Kod ljudi i miševa, hepatična lipaza i SR-BI su inhibirani tokom inflamacije (Feingold i saradnici, 1999; Khovidhunkit i saradnici, 2001). Bazirajući se na pretpostavci da se hepatična lipaza i SR-BI tokom odgovora akutne faze kod pasa ponašaju na isti način kao i kod ljudi i miševa, može se pretpostaviti da se HDL-1 čestice neadekvatno remodeliraju u jetri. To može dovesti do njihovog uvećanja, što je i pokazano u ovoj studiji. Endotelna lipaza (EL) je eksprimirana u brojnim tkivima, a ona predominantno vrši hidrolizu fosfolipida (McCoy i saradnici, 2002). Aktivnost ovog enzima tokom odgovora akutne faze kod ljudi je povećana dovodeći do pada u količini HDL holesterola (Badellino i saradnici, 2006). Posledično, može se pretpostaviti da je katabolizam HDL-2 čestica tokom odgovora akutne faze, izazvane infekcijom sa *B. canis* povećan zbog povećane aktivnosti EL.

Slično ovome, kod ljudi, istraživanja izvedena upotrebom nuklearne magnetne rezonance su pokazala da odgovor akutne faze dovodi do smanjenja broja srednjih i malih HDL čestica, dok se količina velikih HDL čestica nije menjala (De la Llera Moya i saradnici, 2012). Istraživanja metabolizma lipoproteina kod goveda su dovela do pretpostavke da su HDL čestice glavni izvor esencijalnih masnih kiselina za ćelije i tkiva (Della Donna i saradnici, 2012). U skladu sa ovim, hipotetički je moguće da su HDL-2 čestice nosioci holesterol estara i fosfolipida koji predstavlja rezervu ovih materija za slučajeve kada su potrebe tkiva za njima povećane; odgovor akutne faze može biti jedna od tih situacija. Kako su svi pacijenti koji su učestvovali u ovoj studiji preživeli i oporavili se, vezu između težine bolesti i količine lipida i lipoproteina nije bilo moguće ispitati.

Povećan dijametar HDL-a je dokazan *in vitro* i *in vivo* u više studija kod ljudi i miševa, a ovaj nalaz je uvek bio povezan sa porastom koncentracije SAA (Abe-Dohmae i saradnici, 2006; Clifton i saradnici, 1985; Coetzee i saradnici, 1986). I rezultati ove disertacije su pokazali pozitivnu, statistički značajnu vezu između koncentracije SAA i dijametra HDL-a. U skladu sa tim, preliminarni rezultati ispitivanja HDL proteoma kod goveda su pokazali da je tokom odgovora akutne faze više proteina vezano za HDL čestice nego kod klinički zdravih goveda (Kovačević Filipović i saradnici, 2014). Takođe je interesantno istaći da hemoliza utiče na remodeliranje HDL, zbog vezivanja hemoglobina i haptoglobina (Watanabe i saradnici, 2009). Kako infekcija sa *B. canis* uzrokuje hemolitičku anemiju, moguće je da se i u ovom slučaju pojedini molekuli ili delovi molekula hemoglobina i haptoglobina vezani za HDL i da dodvode do povećanja njegovog dijametra. Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da se mnogi lipofilni proteini oslobođeni iz oštećenih tkiva vezuju za HDL tokom odgovora akutne faze i utiču na povećanje njegovog dijametra.

Jedan od rezultata ove studije pokazuje da koncentracija HDL-1 nije bila povezana sa koncentracijom ukupnog holesterola niti sa koncentracijom SAA, već jedino sa koncentracijom  $\gamma$ -globulina. Sa druge strane ukupni holesterol kao i koncentracija SAA značajno su bili povezani sa udelom HDL-2 čestica u ukupnim lipoproteinima. Ovi rezultati mogu da ukažu na različite uloge HDL-1 i HDL-2 čestica tokom patogeneze babezioze kod pasa.



#### 6.4. Promene koncentracije ApoA-I i SAA

Rezultati ove studije pokazuju da se koncentracija ApoA-I povećava za oko 50% tokom odgovora akutne faze kod pasa inficiranih sa *B. canis*. ApoA-I je negativan protein akutne faze kod svinja (Carpintero i saradnici, 2005), miša (Khovidhunkit i saradnici, 2004), kunića (Cabana i saradnici, 1989) i ljudi, dok je kod teladi opisan porast tokom virusne infekcije pluća (Aich i saradnici, 2009). Povećana ekspresija ApoA-I tokom odgovora akutne faze kod pasa već je opisana upravo kao posledica infekcije sa *B. canis*, ali u studiji u kojoj je sastav proteina plazme analiziran masenom spektrometrijom (Kuleš i saradnici, 2014). Još jedna studija izvedena na kliničkim slučajevima pasa prirodno inficiranih sa *Leishmania* spp. je pokazala da tokom hronične inflamacije koja je prisutna kod ovog oboljenja, koncentracija apoA-I značajno pada, a nakon terapije značajno raste (Escribano i saradnici, 2016). Zbog toga je predloženo da apoA-I može da bude dobar marker koji bi pokazao uspeh terapije pasa obolelih od lajšmanioze (Escribano i saradnici, 2016). Kako su rezultati naše studije u kojoj je koncentracija ApoA-I određivana RIA metodom u skladu sa studijom u kojoj je koncentracija ApoA-I određivana masenom spektrometrijom (Kuleš i saradnici, 2014), smatramo da je ovaj fenomen potvrđen i da zaista predstavlja jedinstvenu promenu tokom odgovora akutne faze kod odraslih sisara.

Studija koja je izvedena na uzorcima krvi dece do 5 godina starosti koja su imala odgovor akutne faze usled infekcije sa *Plasmodium falciparum* je pokazala značajan pad ApoA-I, čak je uočeni pad koncentracije ApoA-I bio veći u grupi pacijenata sa komplikovanom nego kod pacijenata sa nekomplikovanom malarijom (Orimadegun i Orimadegun, 2015). Na osnovu poslednje navedene studije, može se zaključiti da povećanje koncentracije ApoA-I nije uslovljeno specifičnim efektom parazita iz klase *Apicomplexa* (kojima pripadaju *Plasmodium* spp i *Babesia* spp). Smatramo da bi u budućim istraživanjima bilo interesantno ispitati koji od pro-inflamatornih citokina utiču pozitivno, a koji negativno na sintezu ApoA-I.

Postoje tri moguća objašnjenja za porast koncentracije ApoA-I tokom akutne inflamacije: povećana sinteza, smanjenje katabolizma ili paralelno postojanje oba

fenomena. Kako je infekcija sa *B. canis* prvo oboljenje kod odraslih životinja kod kojeg je uočen porast koncentracije ApoA-I, bilo bi od velikog značaja iskoristiti ovaj model-sistem za ispitivanje mehanizama koji bi mogli da izazovu povećanje koncentracije ApoA-I.

Do sada je pokazano da se pojačana sinteza ApoA-I kod pasa može izazvati statinima, odnosno padom koncentracije holesterola u ćelijama (Briand i saradnici, 2006). Ovaj mehanizam povećanja koncentracije ApoA-I je moguć, jer kod obolelih životinja postoji pad u koncentraciji holesterola. Ipak, neobično je da kod drugih inflamatornih stanja kod sisara, nije uočen ovakav porast, već naprotiv, kao što je već opisano, uočen je pad ovog apoproteina (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Ukoliko se razmatra mogućnost smanjenog obima katabolizma ApoA-I, treba naznačiti da je kod ljudi pokazano da se manje HDL čestice brže uklanjaju iz cirkulacije nego veće HDL čestice bogate sa ApoA-I (veće čestice HDL-a vezuju veći broj molekula ApoA-I) u uslovima fiziološke ravnoteže, ali i tokom inflamacije (Brinton i saradnici, 1994; Pirillo i saradnici, 2015). Takođe, poznato je da se katabolizam ApoA-I odigrava u bubrezima i jetri, kao i da velike HDL čestice ne mogu da prođu glomerulsku membranu i pređu u primarnu mokraću odakle bi pinocitozom trebale da ih uklanjaju i razgrađuju epitelne ćelije proksimalnih tubula (Yang i saradnici, 2016; Woollett i Spady, 1997). Primenjeno na rezultate naše studije, moglo bi se pretpostaviti da se HDL čestice većeg dijametra koje postoje kod ispitivanih pasa, sporije uklanjaju iz cirkulacije zbog nemogućnosti filtracije u glomerulima bubrega i posledično smanjenog katabolizma ApoA-I.

Rezultati ove studije su pokazali da tokom odgovora akutne faze uzrokovane infekcijom sa *B. canis* dolazi do značajnog povišenja koncentracije SAA, koji je 82 puta veći u odnosu na koncentraciju kod kontrolnih pasa. Takođe, nije bilo preklapanja u vrednostima SAA kod bolesnih i zdravih pasa zbog čega smatramo da je koncentracija SAA izuzetno osetljiv pokazatelj odgovora akutne faze tokom infekcije sa *B. canis*.

Povišenje koncentracije SAA kao i povećanje sadržaja SAA u okviru HDL lipoproteina predstavlja markantnu promenu kod svih sisara tokom odgovora akutne faze (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Značaj kompleksa SAA/HDL nije u potpunosti razjašnjen. Dvojne, pro- i anti-inflamatorne uloge SAA, upućuju da je SAA neophodan za regulaciju inflamatorne reakcije (Ye i Sun, 2015). Hipotetički, pozitivna uloga

SAA/HDL kompleksa može biti povećanje efluksa holesterola iz makrofaga i stimulacija njihovih funkcija radi odbrane organizma tokom odgovora akutne faze (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Osim toga, pozitivan efekat prebacivanja holesterola iz makrofaga na HDL čini taj holesterol dostupnim za rast i proliferaciju ćelija koje učestvuju u odbrani organizma od infekcije (Khovidhunkit i saradnici, 2004), iako se taj efekat ne može videti kada se koncentracija holesterola u plazmi analizira metodama koje su korišćene u ovoj studiji. Autori koji ističu da jednom formiran kompleks SAA/HDL ima negativan, odnosno pro-inflamatorni efekat, smatraju da ovaj kompleks zapravo stimuše transport holesterola u makrofage (Feingold i Grunfeld, 2010). Na taj način je funkcija makrofaga kao fagocita značajno inhibirana i može uticati na njihovu odbrambenu funkciju u organizmu. Interesantno je naglasiti da većina studija direktno povezuje porast SAA sa padom ApoA-I, odnosno smatra se da SAA „istiskuje“ ApoA-I iz HDL molekula (Khovidhunkit i saradnici, 2004). Međutim, naša studija upravo pokazuje da to nije slučaj i da je mehanizam smanjenja koncentracije ApoA-I tokom odgovora akutne faze mehanicistički potpuno nezavistan od porasta koncentracije SAA.

Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da tokom odgovora akutne faze prouzrokovanog infekcijom *B. canis* dolazi do specifičnog oblika disproteinemije i dislipoproteinemije koje se karakterišu gubitkom proteina i lipoproteina koji se nalaze u  $\alpha$ 1-globulinskoj, odnosno  $\alpha$ 1-lipoproteinskoj frakciji. Porast koncentracije ApoA-I je neuobičajen nalaz tokom odgovora akutne faze s obzirom na činjenicu da je dosadašnjim istraživanjima ApoA-I svrstavan samo u negativne proteine akutne faze. Porast koncentracije SAA je uobičajen nalaz koji odgovara klasifikaciji ovog proteina kao pozitivnog proteina akutne faze. Navedene činjenice ukazuju da infekcija pasa sa *B. canis* trenutno predstavlja jedinstveni model za ispitivanje promena u metabolizmu lipida i lipoproteina u uslovima kada postoji paralelno povećanje ApoA-I i SAA.

## 7. ZAKLJUČCI

Kod ispitivanih pasa je kliničkim pregledom utvrđeno da postoji poremećaj opšteg zdravstvenog stanja koji ukazuje na akutnu inflamaciju. Pregledom krvnog razmaza, molekularnim metodama i serološkim testovima je utvrđeno da je akutna inflamacija kod pasa bila prisutna zbog prirodne infekcije protozom *B. canis*. Na osnovu rezultata ispitivanja njihove krvi i seruma zaključeno je da su postojale sledeće promene:

2. Oboleli psi su imali anemiju, leukopeniju i trombocitopeniju. Limfopenija sa povećanjem aktivnosti alkalne fosfataze i blagim porastom koncentracije glukoze je najverovatnije bila odraz stresne reakcije.
3. Koncentracija holesterola i fosfolipida je bila snižena dok je koncentracija triglicerida kod obolelih pasa ostala nepromenjena u odnosu na zdrave pse.
4. Koncentracija ukupnih proteina seruma, albumina i  $\beta$ - i  $\gamma$ - globulina se nije razlikovala između ispitivanih grupa pasa. Disproteinemija se ogledala u padu koncentracije  $\alpha$ 1- globulina kod obolelih u odnosu na zdrave pse.
5. Dislipidemija se kod obolelih pasa ogledala u smanjenju udela  $\alpha$ -lipoproteina koji odgovaraju HDL česticima bogatim holesterolom, dok je udeo  $\beta$ -lipoproteina koji odgovaraju VLDL i LDL česticama bogatim trigliceridima bio nepromenjen. Posebno je bilo izraženo smanjenje udela  $\alpha$ 1-lipoproteinske frakcije koja odgovara HDL-2 česticama - najvažnijim nosiocima holesterola kod zdravih pasa.
6. Dominantan dijametar HDL čestica je bio veći, dok je dominantni dijametar LDL čestica bio nepromenjen kod obolelih u odnosu na zdrave pse.
7. Kod obolelih pasa je utvrđen porast koncentracije ApoA-I i SAA.
8. Opisani tip disproteinemije i dislipoproteinemije kao i porast koncentracije ApoA-I nisu do sada opisani tokom odgovora akutne faze što ukazuje da infekcija pasa sa *B. canis* trenutno predstavlja jedinstveni model za ispitivanje promena u metabolizmu lipida i lipoproteina u uslovima kada postoji paralelno povećanje ApoA-I i SAA.

## 8. LITERATURA

1. Abe-Dohmae S, Kato KH, Kumon Y, Hu W, Ishigami H, Iwamoto N, Okazaki M, Wu CA, Tsujita M, Ueda K, Yokoyama S, 2006, Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner, *J. Lipid Res.*, 47, 1542–1550.
2. Adachi K, Chika U, Makimura S, 1993, Immunosuppression in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*, *J Vet. Med. Sci*, 55, 503-505.
3. Ahn N, Kim K, 2016, High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease: effect of exercise training, *Integr. Med. Res.*, 5, 212–215.
4. Aich P, Babiuk LA, Potter AA, Griebel P, 2009, Biomarkers for Prediction of Bovine Respiratory Disease Outcome, *Omi. A J. Integr. Biol.*, 13, 199–209.
5. Alsemgeest SP, Van't Klooster GA, Van Miert AS, Hulskamp-Koch CK, Gruys E, Primary bovine hepatocytes in the study of cytokine induced acute-phase protein secretion in vitro, *Vet. Immunol. Immunopathol*, 53, 179–84.
6. Annema W, Nijstad N, Tolle M, de Boer JF, Buijs RVC, Heeringa P, van der Giet M, Tietge UJF, 2010, Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2), *J. Lipid Res.*, 51, 743–54.
7. Atherton MJ, Braceland M, Harvie J, Burchmore RJ, Eadie S, Eckersall PD, Morris JS, 2013, Characterisation of the normal canine serum proteome using a novel electrophoretic technique combined with mass spectrometry, *Vet. J.*, 196, 315–319.
8. Attman P, Alaupović P, 1990, Pathogenesis of Hyperlipidemia in the Nephrotic Syndrome, *American Journal of Nephrology*, 10, 69-75.
9. Auerbach BJ, Parks JS, 1989, Lipoprotein abnormalities associated with lipopolysaccharide-induced lecithin: cholesterol acyltransferase and lipase deficiency, *J. Biol. Chem.*, 264, 10264–70.
10. Azhar S, Raven E, 2002, Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl

- ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 195, 1–26.
11. Badellino KO, Wolfe M, Reilly MP, Rader DJ, 2006, Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis, *PLoS Med.*, 3, e22.
  12. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC, 1995, Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux, *Journal of lipid research*, 36, 1058-65.
  13. Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, Chen Z, Remaley AT, Stonik J, Eggerman TL, Patterson AP, 2002, Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells, *Infect. Immun.*, 70, 2995–3003.
  14. Bauer JE, 1995, Evaluation and dietary considerations in idiopathic hyperlipidemia in dogs, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206, 1684-8.
  15. Bauer JE, 1996, Comparative lipid and lipoprotein metabolism, *Veterinary clinical pathology*, 25, 49-56.
  16. Bauer JE, 2004, Lipoprotein-mediated transport of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 668-75.
  17. Behling-Kelly E, 2016, Comparison of 2 electrophoretic methods and a wet-chemistry method in the analysis of canine lipoproteins, *Vet. Clin. Pathol.*, 45, 124–134.
  18. Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, Revillard JP, 2000, The Clinical Usefulness of the Measurement of Cytokines, *Clin Chem Lab Med*, 38, 267-85.
  19. Blackburn W, 1994, Validity of acute phase proteins as markers of disease activity, *The Journal of rheumatology*, 42, 9-13.
  20. Børresen B, 1980, Pyometra in the dog—a pathophysiological investigation. IV.

- Functional derangement of extra-genital organs, Nord. Vet. Med. 32, 255–68.
21. Brady CA, Otto CM, 2001, Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and multiple organ dysfunction. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 31, 1147–62
  22. Briand F, Magot T, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K, 2006, Effect of atorvastatin on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism in dogs, European journal of clinical investigation, 36, 224-230.
  23. Brewer HB, Santamarina-Fojo S, 2003, New insights into the role of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport, Am. J. Cardiol., 91, 3–11.
  24. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL, 1994, Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution, Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol. 14, 707–20.
  25. Cabana VG, Lukens JR, Rice KS, Hawkins TJ, Getz GS, 1996, HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease, J. Lipid Res., 37, 2662–2674.
  26. Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM, 1989, Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins, J. Lipid Res., 30, 39–49.
  27. Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda S, Goethert H, Telford S, Spielman A, 2005, Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection, Vet. Res., 36, 713–722.
  28. Castell J, Gomez-Lechon M, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich P, 1989, Interleikin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes, Febs lett, 242, 237-239.
  29. Carpintero R, Pineiro M, Andreas M, Iturralde M, Alava MA, Heegaard

- PMH, Jobert JL, Madec F, Lampreave F, 2005, The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs, *Infect. Immun.*, 73, 3184–7.
30. Cecilliani F, Giordano A, Spagnolo V, 2002, The systemic reaction during inflammation: The acute phase proteins, *Protein and peptide letters*, 9, 3, 211-23.
31. Chethan GE, Garkhal J, De UK, 2016, Disturbance of thyroid function in canine ehrlichiosis and babesiosis associated with oxidative stress, *Comparative Clinical Pathology*, 25, 987- 92.
32. Chikamune T, Katamoto H, Nomura K, Ohashi F, 1998, Lipoprotein Profile in Canine Pancreatitis Induced with Oleic Acid, *J. Vet. Med. Sci.*, 60, 413–421.
33. Chrousos G, 1995, The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation, *New England Journal of Medicine*, 332, 1351-1363.
34. Clifton PM, Mackinnon AM, Barter PJ, 1985, Effects of serum amyloid A protein (SAA) on composition, size, and density of high density lipoproteins in subjects with myocardial infarction, *J. Lipid Res*, 26, 1389–1398.
35. Coetzee GA, Strachan AF, Van Der Westhuyzen DR, Hoppes HC, Jeenahs MS, De Beerg FC, 1986, Serum Amyloid A-containing Human High Density Lipoprotein 3. Density, Size and Apolipoprotein Composition, *The journal of biological chemistry*, 261, 9644–9651.
36. Coppens I, 2013, Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies, *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 823–835.
37. Costet P, Lalanne F, Gerbod-Giannone MC, Molina JR, Fu X, Lund EG, Gudas LJ, Tall AR, 2003, Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 7756–66.



38. Cray C, Besselsen DG, Hart JL, Yoon D, Rodriguez M, Zaias J, Altman NH, 2010, Quantitation of acute phase proteins and protein electrophoresis in monitoring the acute inflammatory process in experimentally and naturally infected mice, *Comp. Med.*, 60, 263–71.
39. Cray C, Zaias J, Altman NH, 2009, Acute phase response in animals: a review. *Comp. Med.*, 59, 517-26.
40. Cunha BA, Crean J, 2000, Lipid abnormalities in babesiosis, *The american journal of medicine*, 108, 758-759.
41. De Buck M, Gouwy M, Wang JM, Van Snick J, Opdenakker G, Struyf S, Van Damme J, 2016, Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults, *Current medicinal chemistry*, 17, 1725-55.
42. De la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, Byrne M, Joshi MR, Nguyen V, Tabita-Martinez J, Wolfe ML, Badellino K, Pruscino L, Mehta NN, Asztalos BF, Reilly MP, 2012, Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo, *Atherosclerosis*, 222, 390–4.
43. Dedać-Delkić A, Milovanović Z, Božović-Ilić A, Radovanović A, Kovačević-Filipović, M, 2018, Effects of short-term fasting on lipid and lipoprotein concentrations in healthy lean dogs, *Vet. Glas.*, 1–1. doi:10.2298/VETGL170917001D
44. Della Donna L, Bassilian S, Souda P, Nebbia C, Whitelegge JP, Puppione DL, 2012, Mass spectrometric measurements of the apolipoproteins of bovine (*Bos taurus*) HDL, *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, 7, 9–13.
45. Dinarello C, 1983, Pathogenesis of fever during hemodialysis, *Contributions to nephrology*, 36, 90-9.
46. Dinarello C, 1989, Interleukin-1 and its biologically related cytokines, *Advances in immunology*, 44, 153-205.

47. Dominiczak M, Caslake M, 2011, Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications, *Annals of Clinical Biochemistry*, 48, 498-515.
48. Eckersall PD, Nash AS, Marshall GM, Douglas TA, 1986, The measurement of canine steroid -induced alkaline phosphatase by L-phenylalanine inhibition, *Journal of small animal practice*, 27, 411-418.
49. Eichenberger RM, Riond B, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P, 2016, Prognostic Markers in Acute *Babesia canis* Infections, *J. Vet. Intern. Med.*, 30, 174–182.
50. Escribano D, Tvarijonaviciute A, Kocaturk M, Cerón JJ, Pardo-Marín L, Torrecillas A, Yilmaz Z, Martínez-Subiela S, 2016, Serum apolipoprotein-A1 as a possible biomarker for monitoring treatment of canine leishmaniosis, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 49, 82–87.
51. Feingold KR, Grunfeld C, 2010, The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport, *J. Lipid Res.*, 51, 682–4.
52. Feingold KR, Hardardottir I, Memon R, Krul EJT, Maser AH, Taylor JM, Grunfeld C, 1993, Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters, *J. Lipid Res.*, 34, 2147–2158.
53. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, 1999, Endotoxin and interleukin-1 decrease hepatic lipase mRNA levels, *Atherosclerosis*, 142, 379–387.
54. Feingold KR, Spady DK, Pollock AS, Moser AH, Grunfeld C, 1996, Endotoxin, TNF, and IL-1 decrease cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA levels and activity, *J. Lipid Res.*, 37, 223–8.
55. Filippatos TD, Kei A, Elisaf MS, 2017, Anacetrapib, a New CETP Inhibitor: The New Tool for the Management of Dyslipidemias?, *Diseases*, 5, 21.
56. Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D, 1999, Reduction of Circulating Cholesterol and Apolipoprotein Levels during Sepsis,

Clin Chem Lab Med, 37, 357–362.

57. Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L, 2005, Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy, *Vet. Parasitol.*, 134, 77–85.
58. Gabay C, Kushner I, 1999, Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation, *N. Engl. J. Med.*, 340, 448–454.
59. Gabriel C, Becher-Deichsel A, Hlavaty J, Mair G, Walter I, 2016, The physiological expression of scavenger receptor SR-B1 in canine endometrial and placental epithelial cells and its potential involvement in pathogenesis of pyometra, *Theriogenology*, 85, 1599–1609.
60. Gilnberg H, 1998, Lipoprotein physiology, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 27, 503-19.
61. Glomset JA, Norum KR, 1973, The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology, *Adv. Lipid Res.*, 11, 1–65.
62. Goldsteins JL, Brown MS, 1976, The LDL Pathway in Human Fibroblasts: A Receptor-Mediated Mechanism for the Regulation of Cholesterol Metabolism, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 11, 147–181.
63. Goldsteins JL, Brown MS, 1974, Binding and Degradation of Low Density Lipoproteins by Cultured Human Fibroblasts comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia, *J biol chem*, 249, 5152-5162.
64. Goodger BV, Wright IG, Mahoney DF, 1981, Babesia bovis (Argentina): Studies of plasma lipids and lipoproteins during acute infections in cattle, *Zeitschrift for Parasitenkd. Parasitol. Res.* 65, 271–276.
65. Gossett KA, MacWilliams PS, Cleghorn B, 1985, Sequential morphological and quantitative changes in blood and bone marrow neutrophils in dogs with acute inflammation. *Can. J. Comp. Med. Rev.*, 49, 291-7.

66. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ, 2005, Acute phase reaction and acute phase proteins, *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11, 1045-56.
67. Guo L, Zheng Z, Ai J, Huang B, Li XA, 2014. Hepatic scavenger receptor BI protects against polymicrobial-induced sepsis through promoting LPS clearance in mice. *J. Biol. Chem.* 289, 14666–73.
68. Guyard-Dangermont V, Desrumaux C, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L, 1998, Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility, *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 120, 517–25.
69. Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS, 2000, Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.*, 275, 12003–8.
70. Han CY, Tang C, Guevara ME, Wei H, Wietecha T, Shao B, Subramanian S, Omer M, Wang S, O'Brien KD, Marcovina SM, Wight TN, Vaisar T, de Beer MC, de Beer FC, Osborne WR, Elkon KB, Chait A, 2016, Serum amyloid A impairs the antiinflammatory properties of HDL, *The Journal of Clinical Investigation*, 126, 266-281.
71. Hardardóttir I, Grunfeld C, Feingold KR, 1994, Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism: *Current Opinion in Lipidology*, *Curr. Opin. Lipidol.*, 5, 207–215.
72. Hayden MR, Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, Van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HOF, Loubser O, Ouellette BFF, Fitcher K, Ashbourne-Excoffon KJD, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJP, Genest J, 1999, Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Nat. Genet.*, 22, 336–345.
73. Heinrich P, Behrmann I, Muller- Newen G, Schaper F, Graeve L, 1998,

Interleukin-6-type cytokine signalling through the Gp130/Jak/Stat pathway, *The Biochem J*, 334, 297-314.

74. Heinrich P, Castell J, Andus T, 1990, Interleukin-6 and acute phase response, *The biochem J*, 265, 621-36.

75. Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T, 1999, Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family, *J. Biol. Chem.*, 274, 14170-5.

76. Hui DY, Innerarity TL, Mahley RW, 1981, Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct Apo-E and Apo-B,E receptors, *The journal of biological chemistry*, 256, 5646-55.

77. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H, 1996, Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and increased HDL cholesterol levels (hyperalphalipoproteinemia), *Rinsho Byori.*, 44, 322-6.

78. Ingenbleek Y, Young V, 1994, Transthyretin (Prealbumin) in health and disease: nutritional implications, *Ann Rev of Nutrition*, 14, 495-533.

79. Irwin PJ, 2005, Babesiosis and Cytauxzoonosis: Arthropod-borne infectious diseases of dog and cat, Shaw SE, Day MJ, Manson publishing ltd, 63-77.

80. Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata KI, Rubin EM, Cooper AD, Quertermous T, 2003, Endothelial lipase is a major determinant of HDL level, *J. Clin. Invest.*, 111, 347-55.

81. Jauhianen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, Van Tols A, Ehnholm C, 1993, Human Plasma Phospholipid Transfer Protein Causes High Density Lipoprotein Conversion, *The journal of biological chemistry*, 268, 4032-4036.

82. Johnson RW, 1997, Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *J. Anim. Sci.*, 75, 1244-55.

83. Jones T, Kennedy R, 1995, Cytokines and hypothalamic-pituitary function, *Cytokine*, 5, 531-8.

84. Kaji H, 2013, High-density lipoproteins and the immune system, *J. Lipids*, 2013, 8.
85. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, Valberg SJ, 2008, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Elsevier/Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-370491-7.00015-5
86. Kettner F, Reyers F, Miller D, 2003, Thrombocytopaenia in canine babesiosis and its clinical usefulness. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 74, 63–8.
87. Khovidhunkit W, Duchateau PN, Medzihradsky KF, Moser AH, Naya-Vigne J, Shigenaga JK, Kane JP, Grunfeld C, Feingold KR, 2004, Apolipoproteins A-IV and A-V are acute-phase proteins in mouse HDL. *Atherosclerosis* 176, 37–44.
88. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C, 2004, Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host, *J. Lipid Res.*, 45, 1169-96.
89. Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR, 2001, Regulation of scavenger receptor class B type I in hamster liver and hep3B cells by endotoxin and cytokines, *Journal of lipid research*, 42, 1636–1644.
90. Kjelgaard-Hansen M, Christensen MB, Lee MH, Jensen AL, Jacobsen S, 2007, Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid from spontaneously diseased dogs with joint diseases or other conditions, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 117, 296–301.
91. Kluge-Beckerman B, Manaloor JJ, Liepnieks JJ, 2002, A pulse-chase study tracking the conversion of macrophage-endocytosed serum amyloid A into extracellular amyloid, *Arthritis & Rheumatism*, 46, 1905-13.
92. Knolle P, Lohr H, Treichel U, Dienes HP, Lohse A, Schlaack J, Gerken G, 1995, Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the

- local immune response, *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 33, 613-20.
93. Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Arai H, Ueda K, Matsuo M, 2006, Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1, *Journal of lipid research*, 47, 1791-1802.
94. Koster L, Lobetti R, Kelly P, 2015, Canine babesiosis: perspective on clinical complications, biomarkers and treatment, *Veterinary medicine: research and reports*, 6, 119-28.
95. Kovačević Filipović M, 2014, Farm animal proteomics 2014, u: de Almeida A, Cecilian F, Eckersall D, Miller I, Renaut J, Roncada P, Turk R (Ur.), . Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. Doi:10.3920/978-90-8686-810-0
96. Kovanen PT, Bilheimer DW, Goldstein JL, Jaramillo JJ, Brown MS, 1981, Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 1194–8.
97. Kuleš J, Mrljak V, Barić Rafaj R, Selanec J, Burchmore R, Eckersall PD, 2014, Identification of serum biomarkers in dogs naturally infected with *Babesia canis canis* using a proteomic approach, *BMC Vet. Res.*, 10, 111.
98. Larson MA, Wei SH, Weber A, Weber AT, McDonald TL, 2003, Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide, *Biochemical and biophysical research communications*, 301, 1030-7.
99. Le J, Vilcek J, 1989, Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and acute phase protein response, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 61, 588-602.
100. Lobeti RG, Möhr AJ, Dippenaar T, Muyburgh E, 2000, A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis, *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 71, 38–42.
101. Lowell CA, Potters DA, Stearmanv RS, Morow JF, 1986, Structure of the

- murine serum amyloid A gene superfamily, *The journal of biological chemistry*, 261, 8442-8452.
102. Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C, 1996, The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion, *Biochem. J.*, 313, 275-82.
  103. Ly H, Francone OL, Fielding CJ, Shienaga JK, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR, 1995, Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters, *J. Lipid Res.*, 36, 1254-63.
  104. Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH, Fry DL, 1977, Canine hyperlipoproteinemia and atherosclerosis, Accumulation of lipid by aortic medial cells in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.*, 87, 205-26.
  105. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity T, 1974, Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia, *Circ. Res.*, 35, 722-33.
  106. Mahley RW, Hui DY, Innerarity TL, Weisgraber KH, 1981, Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine, and man. Apo-B,E and apo-E receptors, *The Journal of clinical investigation*, 68, 1197-206.
  107. Maldonado EN, Romero JR, Ochoa B, Aveldaño MI, 2001, Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 128, 719-29.
  108. Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Reimers JJ, Pociot F, Andersen HU, Karlsen A, Bjerre U, Bergholdt R, 1995, Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network, *European journal of endocrinology*, 133, 660-71.
  109. Massucci-Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, Richardson H, Walsh A,



- Breslow JL, Tall A, 1995, Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice, *J. Clin. Invest.*, 95, 1587–94.
110. Matijatko V, Kiš I, Torti M, Brkljačić M, Kučer N, Rafaj RB, Grden D, Živičnjak T, Mrljak V, 2009, Septic shock in canine babesiosis, *Vet. Parasitol.*, 162, 263–270.
111. Matijatko V, Mrljak V, Kiš I, Kučer N, Foršek J, Živičnjak T, Romić Ž, Šimec Z, Ceron JJ, 2007, Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*, *Vet. Parasitol.*, 144, 242–250.
112. Matijatko V, Kiš I, Torti M, Brkljačić M, Barić Rafaj M, Žvorc Z, Mrljak V, 2010, Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis, *Vet. Arhiv*, 80, 611–626.
113. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais, C, Glick JM, Rader DJ, 2002, Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase, *J. Lipid Res.*, 43, 921–9.
114. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP, 2009, Inflammation Impairs Reverse Cholesterol Transport In Vivo, *Circulation*, 119, 1135–1145.
115. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL, 2000, High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 4245–50.
116. Meek RL, Benditt EP, 1986, Amyloid A gene family expression in different mouse tissues. *J. Exp. Med.*, 164, 2006–17.
117. Memon RA, Moser AH, Shienaga JK, Grunfeld C, Feigold KR, 2001, *In Vivo* and *in Vitro* Regulation of Sterol 27-Hydroxylase in the Liver during the

- Acute Phase Response, *J. Biol. Chem.*, 276, 30118–30126.
118. Milanović Z, Ilić A, Francuski Andrić J, Radonjić V, Beletić A, Kovačević Filipović M, 2017, Acute-phase response in *Babesia canis* and *Dirofilaria immitis* co-infections in dogs, *Ticks Tick. Borne. Dis.*, 8, 907–914.
  119. Mineo C, Shaul PW, 2013, Regulation of signal transduction by HDL, *J. Lipid Res.*, 54, 2315–24.
  120. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, Li XA, 2015, HDL in sepsis-risk factor and therapeutic approach, *Front. Pharmacol.*, 6, 244.
  121. Morley JJ, Kushner I, 1982, Serum C-reactive protein levels in disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389, 406–18.
  122. Muntoni S, Atzori L, Mereu R, Satta G, Macis MD, Congia M, Tedde A, Desogus A, Muntoni S, 2009, Serum lipoproteins and cancer. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 19, 218-225.
  123. Murata H, Shimada N, Yoshioka M, Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview, *Vet. J.*, 168, 28–40.
  124. Nieto CG, Barrera R, Habela MA, Navarrete I, Molina C, Jimenez A, Serrera JL, 1992, Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Vet. Parasitol.*, 44, 175–182.
  125. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP, 2000, ABCA1 Is the cAMP-inducible Apolipoprotein Receptor That Mediates Cholesterol Secretion from Macrophages, *J. Biol. Chem.*, 275, 34508–34511.
  126. Orimadegun AE, Orimadegun BE, 2015, Serum Apolipoprotein-A1 and Cholesterol Levels in Nigerian Children with *Plasmodium falciparum* Infection, *Med. Princ. Pract.*, 24, 318–24.
  127. Ouguerram K, Nguyen P, Krempf M, Pouteau E, Briand F, Bailhache E, Magot T, 2004, Selective uptake of high density lipoproteins cholesteryl ester in the dog, a species lacking in cholesteryl ester transfer protein activity, *Comp.*

- Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol., 138, 339–345.
128. Peng YS, Chen YC, Tian YC, Yang CW, Lien JM, Fang JT, Wu CS, Hung CF, Hwang TL, Tsai YH, Lee MS, Tsai MH, 2015, Serum levels of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein can predict organ failure in acute pancreatitis, *Crit. Care*, 19, 88.
  129. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD, 2015, HDL in Infectious Diseases and Sepsis, *Handbook of experimental pharmacology*, 224, 483-508.
  130. Poth M, Tseng YCL, Wartofsky L, 1991, Inhibition of TSH Activation of Human Cultured Thyroid Cells by Tumor Necrosis Factor: An Explanation for Decreased Thyroid Function in Systemic Illness?, *Thyroid*, 1, 235-40.
  131. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A, 2000, Thyroid and lipid metabolism, *International Journal of Obesity*, 24, s109-s112.
  132. Quispe EA, Li XM, Yi H, 2016, Comparison and relationship of thyroid hormones, IL-6, IL-10 and albumin as mortality predictors in case-mix critically ill patients, *Cytokine*, 81, 94-100.
  133. Riederer M, Köfeler H, Lechleitner M, Tritscher M, Frank S, 2012, Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 1003–1011.
  134. Rodrigues CD, Hannus M, Prudencio M, Martin C, Goncalves LA, Portugal S, Epiphany S, Akinc A, Hadwiger P, Jahn-Hofman K, Rohl I, van Germet GJ, Franetich JF, Luty AJF, Sauerwein R, Mazier D, Koteliansky V, Vornlocher HP, Echeverri CJ, Mota MM, 2008, Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection, *Cell Host Microbe*, 4, 271–282.
  135. Rohrl C, Stangl H, 2013, HDL endocytosis and resecretion, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, 1626-1633.
  136. Rosenson RS, 1993, Myocardial injury: the acute phase response and

- lipoprotein metabolism, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 22, 933–40.
137. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G, 1999, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1, *Nat. Genet.*, 22, 352–355.
  138. Rye KA, Barter PJ, 1986, Changes in the size and density of human high-density lipoproteins promoted by a plasma-conversion factor, *Biochim. Biophys. Acta*, 875, 429–38.
  139. Sammalkorpi KT, Valtonen VV, Maury CP, 1990, Lipoproteins and acute phase response during acute infection. Interrelationships between C-reactive protein and serum amyloid-A protein and lipoproteins, *Ann. Med.*, 22,397-401.
  140. Sano O, Kobayashi A, Nagao K, Kumagai K, Kioka N, Hanada K, Ueda K, Matsuo M, 2007, Sphingomyelin-dependence of cholesterol efflux mediated by ABCG1, *Journal of lipid research*, 48, 2377-2384.
  141. Sato K, Satoh T, Shizume K, Ozawa M, Han DC, Imamura H, Tsushima T, Demura H, Kanaji Y, Ito Y, Obara T, Fujimoto Y, 1990, Inhibition of 125 I Organification and Thyroid Hormone Release by Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  , and Interferon-  $\gamma$  in Human Thyrocytes in Suspension Culture, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70, 1735-1743.
  142. Sbrana F, Puntoni M, Bigazzi F, Landi P, Sampietro T, Rossi G, Rovai D, 2013, High Density Lipoprotein Cholesterol in Coronary Artery Disease: When Higher Means Later, *J. Atheroscler. Thromb.*, 20, 23–31.
  143. Schetters TPM, Kleuskens JAGM, Van De Crommert J, De Leeuw PWJ, Finizio AL, Gorenflot A, 2009, Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study, *Vet. Parasitol.*, 162, 7–15.
  144. Schetters TPM, Moubri K, Cooke BM, 2009a, Comparison of *Babesia rossi* and *Babesia canis* isolates with emphasis on effects of vaccination with

- soluble parasite antigens: a review. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 80, 75–8.
145. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA, 1990, Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood*, 75, 40-7.
  146. Schmitz G, Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, 1999, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat. Genet.*, 22, 347–351.
  147. Schoeman JP, Rees P, Herrtage ME, 2007, Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by *Babesia canis rossi*, *Veterinary Parasitology*, 148, 75-82.
  148. Swartz K, Lawn RM, Wade DP, 2000, ABC1 Gene Expression and ApoA-I-Mediated Cholesterol Efflux Are Regulated by LXR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274, 794–802.
  149. Sellar GC, DeBeer MC, Lelias JM, Snyder PW, Glickman LT, Felsburg PJ, Whitehead AS, 1991, Dog serum amyloid A protein. Identification of multiple isoforms defined by cDNA and protein analyses, *J. Biol. Chem.*, 266, 3505–10.
  150. Sellar GC, Whitehead AS, 1993, Localization of Four Human Serum Amyloid A (SAA) Protein Superfamily Genes to Chromosome 11p: Characterization of a Fifth SAA-Related Gene Sequence, *Genomics*, 16, 774–776.
  151. Sehgal P, Grienering G, Tosato G, 1989, Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557, 583.
  152. Sloop CH, Dory L, Krause BR, Castle C, Roheim PS, 1983, Lipoproteins

- and apolipoproteins in peripheral lymph of normal and cholesterol-fed dogs, *Atherosclerosis*, 49, 9–21.
153. Sorci-Thomas M, Bhat S, Thomas M, 2009, Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices, *Clin. Lipidol.*, 4, 113–124.
154. Swathi Raju M, Jahnavi V, Ratnakar SK, Ventakaraman S, Karthik R, Sumtahi N, Anil DK, Sandepta B, 2016, Continuous evaluation of changes in the serum proteom from early to late stages of sepsis caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Molecular medicine report*, 4835-4844.
155. Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ, 1985, Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis, *J. Lipid Res.*, 26, 842–51.
156. Tappin SW, Taylor SS, Tasker S, Dodkin SJ, Papasouliotis K, Murphy KF, 2011, Serum protein electrophoresis in 147 dogs, *Vet. Rec.*, 168, 456–456.
157. Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Ceron JJ, Paltrinieri S, 2005, Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J. Vet. Intern. Med.*, 19, 865-70.
158. Temel RE, Brown JM, 2010, A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport, *World J. Gastroenterol.*, 16, 5946–52.
159. Temel RE, Brown JM, 2015, A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion, *Trends Pharmacol., Sci.* 36, 440–51.
160. Temel RE, Brown JM, 2012, Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport, *Curr. Opin. Lipidol.*, 23, 85–90.
161. Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR, 2007, High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced

- apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1, Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 15093-15098.
162. Tropf M, Nelson OL, Lee PM, Weng HY, 2017, Cardiac and Metabolic Variables in Obese Dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, 31, 1000–1007.
  163. Tu AY, Nishida HI, Nishida T, 1993, High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein, *J. Biol. Chem.*, 268, 23098–105.
  164. Uhlar CM, Burgess CJ, Sharp PM, Whitehead AS, 1994, Evolution of the Serum Amyloid A (SAA) Protein Superfamily. *Genomics* 19, 228–235.
  165. Uhlar CM, Whitehead AS, 1999, Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur. J. Biochem.*, 265, 501–523.
  166. Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T, 2005, Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study, *Vet. Clin. Pathol.*, 34, 144–7.
  167. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, Heinecke JW, 2015 Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity, *Journal of Lipid Research*, 56, 1519-1530.
  168. Valentin A, Rigomier D, Précigout É, Carcy B, Gorenflot A, Schrével J, 1991, Lipid trafficking between high density lipoproteins and *Babesia divergens*-infected human erythrocytes, *Biol. Cell*, 73, 63–70.
  169. Van Miert A, 1995, Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: Pathophysiological, pharmacological and therapeutic aspects, *Vet Quart*, 17, 41-50.
  170. Vavricka SR, Burri E, Beglinger C, Degen L, Manz M, 2009, Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test, *Digestion*, 79, 203–10.
  171. Visser BJ, Wieten RW, Nagel IM, Grobusch MP, 2013, Serum lipids and lipoproteins in malaria - a systematic review and meta-analysis. *Malar. J.*, 12,

172. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR, 2004, ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 9774-9779.
173. Wang N, Yvan-Charvet L, Lutjohann D, Mulder M, Vanmierlo T, Kim TW, Tall AR, 2008, ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain, *The FASEB Journal*, 22, 1073-1082.
174. Wartofsky L, Burman K, 1982, Alterations in Thyroid Function in Patients with Systemic Illness: The “Euthyroid Sick Syndrome”, *Endocrine Reviews*, 3, 164-217.
175. Watanabe J, Grijalva V, Hama S, Barbour K, Berger FG, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST, 2009, Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with apoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.*, 284, 18292–301.
176. Watson TDG, 1996, Lipoprotein Metabolism in Dogs and Cats, *Comp. Haematol. Int.*, 6, 17–23.
177. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR, 2014, ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation, *Circ. Res.*, 114, 157–70.
178. Wilson PW, 1990, High-density lipoprotein, low density lipoprotein and coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, 66, A7-A10.
179. Wollett LA, Spady DK, 1997, Kinetic parameters for high density lipoprotein apoprotein AI and cholesteryl ester transport in the hamster, *J. Clin. Invest.*, 99, 1704–1713.
180. Xenoulis PG, Steiner JM, 2010, Lipid metabolism and hyperlipidemia in

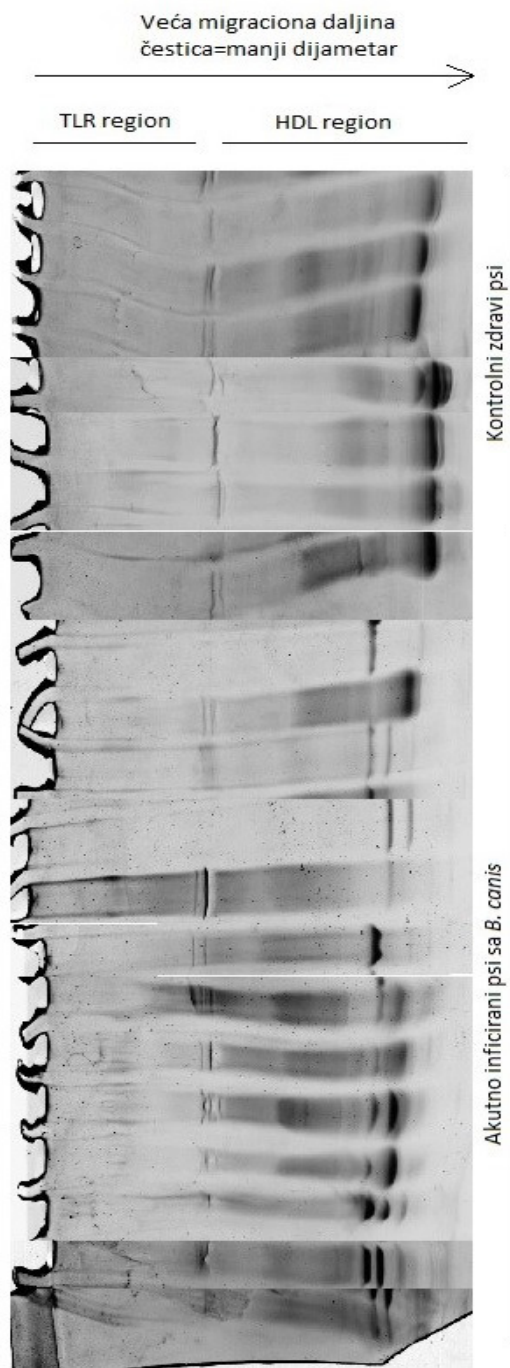


- dogs, *Vet. J.*, 183, 12–21.
181. Yang H, Fogo AB, Kon V, 2016, Kidneys: key modulators of high-density lipoprotein levels and function, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 25, 174–9.
  182. Ye RD, Sun L, 2015, Emerging functions of serum amyloid A in inflammation, *J leukoc Biol*, 98, 923-929.
  183. Yoshioka M, Wantabe A, Shimada N, Murata H, Yokomizo Y, Nakajima Y, 2002. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 425–33.
  184. Zannis VI, Kurnit DM, Breslow JL, 1982, Hepatic apo-A-I and apo-E and intestinal apo-A-I are synthesized in precursor isoprotein forms by organ cultures of human fetal tissues, *J. Biol. Chem.*, 257, 536–44.
  185. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P, 2009, LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor, *Science*, 325, 100–104.
  186. Zhang W, Hu J, Yao B, Yang X, Song L, Yin T, Liang L, 2017, Evaluation of Early Prognostic Factors of Mortality in Patients with Acute Pancreatitis: A Retrospective Study, *Gastroenterol. Res. Pract.*, 1–6.
  187. Zilversmit DB, Davids AK, 1950, Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation, *J. Lab. Clin. Med.*, 35, 155–60.
  188. Zimetti F, De Vuono S, Gomaschi M, Adorni MP, Favari E, Ronda N, Ricci MA, Vegalia F, Calabresi L, Lupattelli G, 2017, Plasma cholesterol homeostasis, HDL remodeling and function during the acute phase reaction, *J. Lipid Res.*, 58, 2051–2060.
  189. Zygner W, Gojska-Zygner O, Wedrychowicz H, 2012, Euthyroid sick syndrome in canine babesiosis caused by *babesia canis*, *Bull Vet Inst Pulawy*, 56, 525-27.

190. Zygnier W, Gojska-Zygnier O, Wędrychowicz H, 2011, Abnormalities in serum proteins in the course of babesiosis in dogs, *Bull Vet Inst Pulawy*, 55, 59–65.
191. Zygnier W, Gojska O, Rapacka G, Jaros D, Wędrychowicz H, 2007, Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland), *Vet. Parasitol.*, 145, 146–151.

## 9. PRILOG

Slika 3. Elektroforezogram lipoproteinskih frakcija razdvojenih elektroforezom na gradijentnom gelu kod pasa akutno inficiranih sa *B. canis* i zdravih kontrolnih pasa



## Biografija

Zorana Milanović rođena je 20.12.1989. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Mladenovcu. Osnovne integrisane akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine upisala je 07.07.2008. godine. Odbranivši diplomsku tezu pod mentorstvom Prof. Dr Milice Kovačević Filipović, pod naslovom: "Poremećaj metabolizma lipoproteina kod gojaznih pasa", diplomirala je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu 03.04.2014. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija 9,49.

07.11.2014. godine upisala je Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Zaključno sa 6.7.2017. godine je položila sve ispite predviđene planom i programom Doktorskih akademskih studija, sa prosečnom ocenom 9,80. Odlukom donešenom 18.10.2017. na 180-oj sednici Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine, Zorani Milanović je odobrena izrada doktorske disertacije pod naslovom "Disproteinemija i dislipoproteinemija tokom odgovora akutne faze kod pasa prirodno inficiranih sa *Babesia canis*", pod mentorstvom Prof. Dr Milice Kovačević Filipović.

U okviru centra za naučno-istraživački rad studenata, a pod mentorstvom Prof. Dr Milice Kovačević Filipović, Zorana Milanović je na trećoj godini osnovnih studija bila autor dva studentska rada: "Prevalence of obesity in pets and risk factors related to obesity in Serbia" i "Examination of lipid status, hematological and biochemical parameters of inflammation in obese dogs". Zorana Milanović je bila volonter Udruženja veterinara male prakse Srbije (2012-2014.), član IVSA-internacionalne veterinarske studentske organizacije, član uredništva i sekretar časopisa studenata veterinarske medicine "Hiron" (2013).

Zorana Milanović je dobitnica više nagrada i stipendija: Stipendije opštine Mladenovac (2009/2010., 2010/2011., 2011/2012., 2012/2013.), Stipendije zadužbine "Dragoljub Marinković" (2012/2013.), Nagrada najboljim studentima, Fakultet veterinarske medicine univerziteta u Beogradu (2010/2011., 2011/2012.), Nagrada najboljim diplomcima, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (2014), Radio Televizija Srbije, nagrada najboljim studentima (2010.), II nagrada na 23. Godišnjem savetovanju veterinara Srbije (2012.), nagrada najboljim studentima iz

oblasti prirodnih nauka ERSTE banke (2012/2013.), stipendija Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za studente doktorskih studija (2014/2015).

U periodu od 01.01.2015. do 07.05.2017. godine bila je zaposlena kao istraživač pripravnik na Katedri za patološku fiziologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na nacionalnom projektu Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja, Republike Srbije iz oblasti osnovnih istraživanja: ev. br. OI 175061 "Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja". Učestvovala je takođe na bilateralnom projektu Pavle Savić Srbija-Francuska: "Evaluation of canine joint tissue reaction after application of autologous mesenchymal stem cells", 2016-2017. Saradivala je u izvođenju praktične nastave na Katedri za patološku fiziologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu u zimskom semestru 2015/2016.

Od 08. 05. 2017. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za radioizotope, Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Beograd. Zorana Milanović je učesnik međunarodnog projekta: FP7-ERACHairs-pilot call-2013, MAGBIOVIN-Strengthening of the MagBioVin Research and Innovation Team for Development of Novel Approaches for Tumor Therapy based on Nanostructured Materials (2014-2018. godine). Na sednici Naučnog veća Instituta za nuklearne nauke "Vinča", održanoj 21. 12. 2017. godine, doneta je odluka kojom je Zorana Milanović stekla istraživačko zvanje istraživač saradnik.

Autor ili koautor je 5 radova, od kojih su 2 rada publikovana u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21, 2 u istaknutom međunarodnom časopisu kategorije M22 i jedan rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja kategorije M51; Ima 7 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima kategorije M34; 4 saopštenja na domaćim naučnim skupovima od kojih je jedan kategorije M61 i tri kategorije M64.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Милановић Зорана \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ 14/3 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

*Диспротеинемија и дислипопротеинемија током одговора акутне фазе код паса*

*природно инфицираних са *B. canis**

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Милановић Зорана \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_ 14/3 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Докторске академске студије \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ *Диспротеинемија и дислипопротеинемија током одговора  
акутне фазе код паса природно инфицираних са *V. canis**

Ментор \_\_\_\_ Др Милица Ковачевић Филиповић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Милановић Зорана \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

*Диспротеинемија и дислиппротеинемија током одговора акутне фазе код паса природно инфицираних са *B. canis**

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.