

4
5
6
7
8
9 **IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

10
11
12
13
14 **I PODACI O KOMISIJI:**

15
16 **1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:**

17
18 14.02.2018. godine,
19 180. Sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u
20 Beogradu

21
22 **2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže**
23 **naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,**
24 **ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:**

- 25
26 1. **Kovačević Filipović Milica**, redovni profesor, patološka fiziologija, Katedra za
27 patološku fiziologiju, 2017., Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu.
28
29 2. **Ivanovski Petar**, vanredni profesor, pedijatar hematolog, Katedra za pedijatriju,
30 2013., Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu.
31
32 3. **Svetlana Milanović**, docent, biohemija, Katedra za fiziologiju i biohemiju 2013.,
33 Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu.
34

35 **II PODACI O KANDIDATU:**

36
37 **1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:**

38
39 Zorana, Zoran, Milanović

40
41 **2. Datum rođenja, opština, Republika:**

42
43 20.12.1989. Beograd, Srbija

44
45 **3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:**

46
47 **4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:**

48
49 **III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:**

50
51 Disproteinemija i dislipoproteinemija tokom odgovora akutne faze kod pasa prirodno
52 inficiranih sa *Babesia canis*

53
54
55
56
57 **IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,**
58 **grafikona i sl.):**

1 Doktorska disertacija kandidata Zorane Milanović je napisana na 88 strana i sadrži
2 sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (25 strana), Cilj i zadaci istraživanja (1
3 strana), Materijal i metode (8 strana), Rezultati (18 strana), Diskusija (10 strana), Zaključci (1
4 strana), Literatura (22 strane), Prilog (1 strana). Poslednjih 5 strana sadrže biografiju i izjave
5 kandidata i nisu numerisane. Zahvalnica, kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku i
6 spisak skraćenica korišćenih u tekstu se nalaze u prvih 11 strana koje nisu numerisane. U
7 disertaciji se nalazi 2 šematska prikaza u poglavlju pregled literature, 9 tabela (4 tabele u
8 poglavlju Pregled literature i 5 tabela u poglavlju Rezultati), 9 grafikona u poglavlju Rezultati i
9 3 slike (2 slike u poglavlju Rezultati i 1 slika u poglavlju Prilog).

10
11
12 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
13 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
14 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
15 **nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u**
16 **doktorskoj disertaciji):**

17
18 U uvodu Kandidat definiše odgovor akutne faze i navodi da sam fenomen odgovora
19 akutne faze obuhvata vrlo kompleksne promene u različitim organima. Ističe se da se u
20 kliničkoj praksi praćenjem koncentracije pojedinih molekula – markera inflamacije, odgovor
21 akutne faze može stratifikovati, a stanje pacijenta pratiti merenjem koncentracije tih markera.
22 Kandidat dalje navodi da je infekcija pasa sa protozom *Babesia canis*, oboljenje koje izaziva
23 klasičan odgovor akutne faze koji se karakteriše groznicom, anoreksijom i slabošću, kao i to
24 da su istraživanja ove vrste aktuelizovana od kada je ustanovljeno da je mehanizam koji
25 dovodi do smrtnog ishoda sindrom sistemskog inflamatornog odgovora, odnosno sepsa.
26 Navodi se da forma ovog oboljenja može biti nekomplikovana kada je najčešći ishod kliničko
27 ozdravljenje, ili komplikovana, kada je čest letalan ishod. U medicini se rutinski, za detekciju i
28 praćenje odgovora akutne faze, koristi određivanje koncentracije različitih proteina akutne
29 faze. Podvlači se da je gotovo dve decenije poznato da određeni lipofilni proteini akutne faze,
30 a pre svega serum amilod A (SAA) i C-reaktivni protein (CRP), ulaze u sastav lipoproteina i
31 ističe se značaj paralelnog ispitivanja proteina i lipoproteina tokom odgovora akutne faze.
32 Navodi se da je regulacija metabolizma lipida i lipoproteina tokom akutne inflamacije direktno
33 uključena u patogenezu bolesti, odnosno odbranu organizma i održavanje njegove
34 homeostaze. Kandidat navodi da patogeneza nekomplikovanih i komplikovanih slučajeva
35 infekcije pasa sa *B. canis* još uvek nije u potpunosti ispitana, te da je od značaja utvrditi
36 promene u koncentraciji proteina i lipida u serumu, a potom i promene u frakcijama proteina i
37 lipoproteina seruma, odnosno okarakterisati disproteinemiju i dislipoproteinemiju, kao i
38 koncentraciju ApoA-I i SAA koji mogu imati ulogu u patogenezi ovog oboljenja.

39
40 Pregled literature je podeljen u dvanaest podpoglavlja. U prvom podpoglavlju pod
41 nazivom *Odgovor akutne faze* se govori o ovom fenomenu sa aspekta molekula koji ga
42 regulišu kao i o značaju promena koje nastaju. Drugo podpoglavlje nosi naslov *Proteini*
43 *akutne faze* a treće *Uloga elektroforetskog razdvajanja proteinskih frakcija seruma*. U ova dva
44 podpoglavlja se definišu proteini akutne faze i govori se o njihovoj podeli i elektroforetskoj
45 pokretljivosti. Četvrto podpoglavlje *Disproteinemija tokom infekcije sa Babesia spp.* je
46 posvećeno podacima iz literature vezanim za disproteinemiju kod infekcije sisara sa *Babesia*
47 spp. U petom podpoglavlju *Serum Amilod A* se razmatraju dostupni literaturni podaci vezani
48 za SAA koji tokom odgovora akutne faze postaje glavni apoprotein lipoproteina uključenih u
49 povratni transport holesterola. Šesto podpoglavlje nosi naziv *Građa i podela lipoproteina*,
50 sedmo *Apoproteini*, osmo *Karakteristike lipoproteina kod pasa*, deveto *Metabolizam*
51 *lipoproteina*, deseto *Receptori za lipoproteine*, jedanaesto *Metabolizam ApoA-I i HDL-a* i
52 dvanaesto podpoglavlje *Povezanost proteina akutne faze i lipoproteina plazme tokom*
53 *odgovora akutne faze*. U navedenim podpoglavljinama se razmatraju podaci vezani za
54 lipoproteine, apoproteine i njihove receptore u organizmu kao i njihov metabolizam kod
55 čoveka i životinja, sa ukazivanjem na postojanje specifičnosti kod pasa. Navodi se da kod
56 pasa postoje hilomikroni (HM), lipoproteini vrlo niske gustine (engl. *Very Low Density*
57 *Lipoproteins* - VLDL), lipoproteini niske gustine (engl. *Low Density Lipoproteins* - LDL) i
58 lipoproteini visoke gustine (engl. *High Density Lipoproteins* - HDL) kao i da je specifičnost
59 vezana za pse postojanje HDL-1 i HDL-2 čestica. Ukazuje se da ApoA-I predstavlja glavni
60 apoprotein HDL-a u stanju fiziološke ravnoteže, kao i metabolizmu samog HDL-a. Takođe se

1 navodi da je aktivnost proteina akutne faze povezana sa lipoproteinima plazme tokom
2 odgovora akutne faze i navode se glavne promene u proteinskom sastavu i morfologiji HDL-a
3 (povećanje dijametra) tokom odgovora akutne faze kod eksperimentalnih životinja i ljudi.
4 Takođe se navode i podaci iz literature o promenama u proteinskim i lipoproteinskim
5 frakcijama (disproteinemijama i dislipoproteinemijama) kod različitih akutnih i hroničnih
6 oboljenja kod ljudi i životinja.

7
8 **Cilj:** Prvi cilj ove doktorske disertacije je bio da se u krvi i serumu pasa sa klinički
9 jasnim odgovorom akutne faze nastalim usled prirodne infekcije sa *B. canis* (potvrđene
10 komercijalnim *real time* PCR testom i serološkim testovima), uz pomoć rutinskih hematoloških
11 i biohemijskih parametara utvrdi da li postoji poremećaj funkcije pojedinih organa i organskih
12 sistema. Drugi cilj je bio da se ispituju promene u koncentraciji pojedinih frakcija proteina i
13 lipoproteina uz pomoć elektroforeze na agaroznom gelu kao i da se utvrdi da li tokom ovog
14 oboljenja dolazi do promena koncentracije glavnih apoproteina HDL čestica – ApoA-I i SAA.
15 Da bi se ispunili navedeni ciljevi postavljeni su sledeći istraživački **zadaci**: (1.) Prikupljanje
16 viška uzoraka pune krvi i seruma od pasa za koje se sumnja da se nalaze u akutnoj fazi zbog
17 infekcije sa *B. canis* i kontrolnih zdravih pasa. (2.) Dijagnostika infekcije pregledom krvnog
18 razmaza, primenom navednog komercijalnog *real time* PCR testa, kao i određivanje titra
19 antitela na *B. canis* uz pomoć komercijalnog serološkog imunofluorescentnog testa. (3.)
20 Određivanje i analiza hematoloških i biohemijskih parametara u uzorcima krvi pasa kod kojih
21 je potvrđena infekcija sa *B. canis*. (4.) Određivanje koncentracije proteinskih frakcija dobijenih
22 posle elektroforeze na agaroznom gelu. (5.) Određivanje odnosa lipoproteinskih frakcija
23 dobijenih posle elektroforeze na agaroznom gelu. (6.) Određivanje dominantnih dijametara
24 lipoproteinskih čestica upotrebom gradijent gel elektroforetske tehnike na poliakrilamidnom
25 gelu. (7.) Određivanje koncentracije ApoA-I primenom radioimunoesej tehnike i koncentracije
26 SAA upotrebom ELISA testa.

27
28 **Materijal i metode** rada su opisane u okviru posebnog poglavlja sa detaljnim opisom
29 svake primenjene metode u okviru posebnog podpoglavlja. Kandidat navodi da je studija
30 izvedena na ukupno 45 uzoraka krvi i seruma pasa koji su klinički pregledani. Obolelih pasa
31 je bilo 30, a kontrolnih, klinički zdravih je bilo 15. Kandidat navodi da su uzorci krvi i seruma
32 pasa prirodno inficiranih sa *B. canis* sakupljeni kao višak materijala posle rutinske
33 dijagnostike bolesti ili od kontrolnih pasa prilikom rutinske kontrole zdravstvenog stanja tokom
34 sterilizacije.

35 Kandidat navodi da je 30 obolelih pasa (15 mužjaka i 15 ženki), različitih rasa,
36 starosti od 1 do 13 godina (medijana 3 godine) imalo kliničke znake akutne babezioze u
37 sezoni aktivnosti krpelja i upodručju koje je endemično za ovu bolest. Svi psi koji su praćeni
38 tokom ovog ogleada su se nakon standardne terapije sa imidokarb-dipropionatom uspešno
39 oporavili. Određeni su kriterijumi za postavljanje dijagnoze i uključivanje pasa u studiju i oni
40 su se sastojali u sledećem: 1. Prisustvo kliničkih znakova kod pasa koji ukazuju na akutnu
41 infekciju babezijom. 2. Krvni razmaz obojen BioDiff® (BioGnost, Croatia) pozitivan na
42 prisustvo intraeritrocitnih razvojnih oblika velikih babezija. 3. *B. canis* pozitivan test
43 *Tick/Vector Comprehensive RealPCR Panel Canine*, IDEXX Laboratories. Takođe je u svim
44 uzorcima seruma određen titar antitela na vrste *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* (MegaScreen
45 FLUOBABESIA canis, Diagnostic Megacor, Horbranz, Austria), imunofluorescentnim
46 serološkim testom (engl. *immunofluorescence antibody tests – IFAT*). Od 30 ispitanih seruma
47 obolelih pasa 16 je bilo IFAT negativno, 10 je imalo nizak titar na *B. canis* (1:64) i 4 seruma
48 su imala visoke titre antitela na *B. canis* (1:2048). Navodi se da između seroreaktivnih i
49 seronegativnih pasa nije bilo značajne razlike za ispitivane parametre, te da su svi rezultati
50 biohemijskih i hematoloških analiza prikazani objedinjeno. Kontrolnu grupu zdravih pasa činilo
51 je 15 pasa starosti od jedan do šest godina (medijana tri godine), od kojih je bilo 5 mužjaka i
52 10 ženki, koji su dovedeni u veterinarsku ambulantu radi sterilizacije. Kontrolna grupa pasa
53 nije pokazivala simptome bolesti tokom kliničkog pregleda i svi psi su bili negativni na krvnom
54 razmazu, PCR-u i IFAT testu. Navodi se da su vlasnici svih pasa koji su ušli u ovu studiju
55 potpisali da su saglasni da se rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka krvi i seruma njihovih
56 životinja koristiti u naučne svrhe i budu javno publikovani. Etički komitet Fakulteta
57 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu je odobrio ogled. Dozvola za ogled je dobijena
58 od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (broj dozvole 323-07-
59 03455/2015-05/3).

1 Uzorkovanje krvi tokom dijagnostike babezioze je izvedeno aseptičnom
2 venepunkcijom *v. cephalicae*. Krv je sakupljana u dve vrste epruveta: epruvete sa etilen-
3 diamin-tetra-sirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom radi dobijanja pune krvi za
4 hematološke i PCR analize i u epruvete sa gel separatorom. Epruvete sa gel separatorom su
5 centrifugirane na 2500 obrtaja tokom 10 minuta, nakon čega je odvojen serum. Uzorci su
6 uskladišteni na -20°C do izvođenja analiza. Krvni razmazi napravljeni iz pune krvi i obojeni
7 komercijalnom BioDiff® bojom su korišćeni kao prvi korak u dijagnostici babezioze. Kriterijum
8 za prepoznavanje velike babezije je bio nalaz merozoita/trofozoita babezije većih od
9 poluprečnika eritrocita prilikom pregleda razmaza svetlosnom mikroskopijom. U cilju potvrde
10 dijagnoze i određivanja vrste *Babesia* kao i eventualnih koinfekcija sa *Anaplasma* spp.,
11 *Ehrlichia* spp. uslužno je primenjena *real time PCR* tehnika koja je deo komercijalnog panela
12 pod nazivom - *Tick/Vector Comprehensive RealPCR Panel Canine*, IDEXX Laboratories.
13 Testovi su izvedeni u laboratoriji za istraživanje i razvoj firme IDEXX - IDEXX Laboratories,
14 Inc., Westbrook, Maine, USA. U istom cilju je izvedeno i serološko ispitivanje (IFA testom) za
15 dokazivanje titra antitela na *B. canis*, *B. vogeli* i *B. gibsoni*. Brzom kvalitativnom ELISA
16 metodom je ispitano prisustvo antitela na *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia*
17 spp, i *Borrelia* spp. (SNAP Multi-Analyte - IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA).

18 Parametri krvne slike su određeni na automatskom analizatoru, a broj retikulocita je
19 određen manuelnom metodom. Kod svih pasa koji su ušli u studiju je ispitivano da li su imali
20 kliničke i laboratorijske parametre koji bi ukazali na prisustvo sepse. Kriterijumi za dijagnostiku
21 sepse kod pasa sa akutnom infekcijom prouzrokovanom sa *B.canis* su bili prisustvo
22 minimalno dva od četiri navedena kriterijuma: 1. telesna temperatura jednaka ili viša od
23 39.7°C ili jednaka ili niža od 37.8°C . 2. Frekvencija rada srca jednaka ili viša od 160/min 3.
24 Broj respiracija viši od 40/min. 4. Broj leukocita $4 \times 10^9/\text{L}$ ili niži, ili $12 \times 10^9/\text{L}$ ili viši, a od tog
25 broja najmanje 10% su činili mladi, štapićasti neutrofilii.

26 Biohemijski parametri ispitivanih seruma su određeni na automatskom biohemijskom
27 analizatoru. Određena je koncentracija ukupnih proteina, albumina, uree, kreatinina, alkalne
28 fosfataze, aspartat amino transferaze, alanin amino transferaze, holesterola, triglicerida i
29 glukoze. Koncentracija ukupnih fosfolipida je određena precipitacijom sa trihlorsirćetnom
30 kiselinom poluautomatskom metodom.

31 Za određivanje proteinskih i lipoproteinskih frakcija seruma korišćeno je
32 elektroforetsko razdvajanje na agaroznom gelu. Elektroforetsko razdvajanje lipoproteina
33 seruma je izvedeno upotrebom komercijalnih agaroznih gelova po uputstvu proizvođača.
34 Gelovi su skenirani i denzitometrijska analiza je urađena u TotalLab TL120 programu.

35 Dominantni dijametri lipoproteina su određeni upotrebom vertikalne gradijent gel
36 elektroforetske tehnike na poliakrilamidnom gelu a lipidne frakcije su vizuelizovane Sudan
37 black B bojom. Gelovi su skenirani i denzitometrijska analiza je urađena uz pomoć *Image*
38 *Quant* softvera.

39 Koncentracija ApoA-I u serumima ispitivanih pasa je određena upotrebom
40 radioimunoesej tehnike (engl. *radioimmunoassay*- RIA). Serumi pasa su adsorbovani na
41 polistirenske epruvete u različitim razblaženjima u puferu sa definisanom pH vrednošću.
42 Obeležavanje primarnih anti-ApoA-I antitela je izvedeno sa radioaktivnim izotopom joda.
43 Nakon inkubacije uzoraka seruma i obeleženih antitela epruvete su isprane i zadržana
44 radiaktivnost je merena u gama-brojaču. Koncentracija SAA je određena upotrebom
45 komercijalnog ELISA testa (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), prema uputstvu
46 proizvođača.

47 Za statističku obradu podataka korišćen je program MedCalc. Kako je odbačena
48 normalnost distribucije podataka, primenjivani su neparametrijski statistički testovi. Za
49 ispitivanje značajnosti razlika između bolesnih i zdravih pasa korišćen je Mann-Whitney test.
50 Kada je prilikom poređenja grupa vrednost *p* bila ispod 0,05, razlika se smatrala statistički
51 značajnom. Za parametere inflamacije i lipide seruma određen je Pearson-ov koeficijent
52 korelacije sa vrednošću dominantnog dijametra HDL-a. Radi ispitivanja povezanosti
53 parametara inflamacije i lipidnog statusa sa koncentracijom HDL-2 i HDL-1 frakcija, urađena
54 je multipla regresiona analiza.

55 **Rezultati** u prvom delu ovog poglavlja kandidat navodi da je analizom kliničke slike,
56 hematoloških i biohemijskih parametara krvi i seruma dobijen uvid u opšte stanje životinja kao
57 i uvid u funkcionalno stanje pojedinih organa i organskih sistema; da je većina pasa iz grupe
58 obolelih ispunjavala kriterijume prema kojima se može postaviti dijagnoza sepse i da su
59 približno kod četvrtine obolelih pasa vlasnici prijavili prisustvo anoreksije, a da žutica nije bila
60 dominantan nalaz.

1 Analiza parametara bele krvne slike je pokazala da grupa obolelih pasa u odnosu na
2 kontrolnu grupu ima leukopeniju i to prevashodno zbog limfopenije, dok broj granulocita nije
3 bio značajno različit između ispitivanih grupa. Trombocitopenija je bila prisutna kod svih
4 obolelih pasa. Analiza parametara crvene krvne slike je pokazala da oboleli psi imaju
5 neregenerativnu anemiju.

6 Aktivnosti alkalne fosfataze i aspartat aminotransferaze su bile značajno više kod
7 obolelih pasa u odnosu na zdrave pse, dok se aktivnost alanin-aminotransferaze nije
8 razlikovala između ispitivanih grupa. Koncentracija glukoze je bila značajno viša kod pasa
9 inficiranih sa *B. canis*. Koncentracije kreatinina i uree nisu se razlikovale između ispitivanih
10 grupa.

11 Koncentracija ukupnih proteina i albumina nije se značajno razlikovala između grupe
12 obolelih i zdravih pasa. Rezultati analize frakcija globulina seruma razdvojenih na agaroznoj
13 elektroforezi su pokazali da je kod pasa inficiranih sa *B. canis* koncentracija α 1- globulina
14 značajno niža u odnosu na zdrave pse. Koncentracija proteina u β - i γ - globulinskim
15 frakcijama seruma se nije razlikovala između ispitivanih grupa.

16 Koncentracija holesterola i fosfolipida je bila značajno niža kod obolelih u odnosu na
17 zdrave pse, iako je kod većine životinja ta vrednost bila u okviru referentnih vrednosti.
18 Koncentracija triglicerida se nije razlikovala.

19 Posle elektroforetskog razdvajanja lipoproteina na agaroznom gelu dobijene su dve
20 glavne frakcije: α - i β - lipoproteinska frakcija. Značajno veći udeo u ukupnim lipoproteinima je
21 činila α -lipoproteinska frakcija sa vrlo jasno izdvojenom podfrakcijom α 1- koja je kod zdravih
22 pasa nosila najveću količinu lipida (50-80%). Udeo ukupne α -lipoproteinske frakcije je bio
23 značajno niži kod obolelih u odnosu na zdrave pse. Udeo HDL-1 frakcije se nije razlikovao
24 između ispitivanih grupa, dok je udeo HDL-2 frakcije bio značajno niži kod obolelih u odnosu
25 na zdrave pse. Frakcija bogata trigliceridima koja odgovara β - lipoproteinskoj frakciji nije se
26 značajno razlikovala između ispitivanih grupa. U okviru rezultata su prikazani reprezentativni
27 skenirani gelovi i elektroforetogrami lipoproteinskih frakcija kod obe ispitivane grupe.

28 Dominantni dijametar HDL čestica je bio značajno veći kod obolelih pasa u odnosu
29 na zdrave pse, dok dominantni dijametar LDL čestica nije bio različit između ispitivanih grupa.

30 Pokazano je da je koncentracija ApoA-I u proseku bila 1,5 \times povećana, a
31 koncentracija SAA je u proseku bila oko 80 \times povećana kod obolelih pasa u odnosu na
32 zdrave pse. Oba rezultata su se značajno razlikovala u odnosu na zdrave pse.

33 Takođe je opisano da postoji značajna pozitivna korelacija između vrednosti
34 koncentracije SAA i dominantnog dijametra HDL-a. Osim toga, opisano je da značajna
35 povezanost postoji između koncentracije SAA i ukupnog holesterola i između koncentracije
36 HDL-1 i γ - globulina.

37
38 Poglavlje **diskusija** je organizovano u četiri podpoglavlja u kojima se sopstveni
39 rezultati porede sa literaturnim podacima i iznose se zanimljive pretpostavke koje bi mogle da
40 objasne originalne rezultate dobijene u ovom radu. Prvo podpoglavlje nosi naziv *Hematološke*
41 *i biohemijske promene*. U njemu se navode objašnjenja za opisanu pancitopeniju i iznose se
42 mogući mehanizmi putem kojih bi uočena dislipidemija mogla da utiče na broj zrelih ćelija krvi.
43 Takođe se objašnjava da kombinacija rezultata hematoloških i biohemijskih promena
44 prevashodno ukazuje na to da su oboleli psi imali stresnu reakciju. U drugom podpoglavlju
45 koje nosi naziv *Disproteinemija* se diskutuje mogući mehanizam pada α 1-globulinske frakcije.
46 U trećem podpoglavlju pod nazivom *Lipidni status i dislipoproteinemija* se diskutuju uočene
47 promene u koncentraciji holesterola i fosfolipida, pad α 1-lipoproteinske frakcije i povećanje
48 dijametra HDL-a koji se u značajnoj meri uklapaju u literaturne podatke dobijene za ljude i
49 laboratorijske životinje ali koji su kod pasa po prvi put opisani u ovoj studiji. Poslednje
50 podpoglavlje nosi naziv *Promene koncentracije ApoA-I i SAA* i u ovom podpoglavlju se osim
51 poređenja rezultata sa drugim studijama, sistematično iznose mogući mehanizmi porasta
52 ApoA-I kod ispitivanih pasa i objašnjavaju se različite uloge koje povišena koncentracija SAA
53 može da ima u organizmu.

54
55 Poglavlje **Literatura** je sadrži 191 bibliografsku jedinice.
56
57
58
59
60

1 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj**
2 **disertaciji):**

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

8 1. Oboleli psi su imali anemiju, leukopeniju i trombocitopeniju. Limfopenija sa povećanjem
9 aktivnosti alkalne fosfataze i blagim porastom koncentracije glukoze je najverovatnije bila
10 odraz stresne reakcije.

11 2. Koncentracija holesterola i fosfolipida je bila snižena dok je koncentracija triglicerida kod
12 obolelih pasa ostala nepromenjena u odnosu na zdrave pse.

13 3. Koncentracija ukupnih proteina seruma, albumina i β - i γ - globulina se nije razlikovala
14 između ispitivanih grupa pasa. Disproteinemija se ogledala u padu koncentracije α 1-
15 globulina kod obolelih u odnosu na zdrave pse.

16 4. Dislipidemija se kod obolelih pasa ogledala u smanjenju udela α -lipoproteina koji
17 odgovaraju HDL česticama bogatim holesterolom, dok je udeo β -lipoproteina koji odgovaraju
18 VLDL i LDL česticama bogatim trigliceridima bio nepromenjen. Posebno je bilo izraženo
19 smanjenje udela α 1-lipoproteinske frakcije koja odgovara HDL-2 česticama - najvažnijim
20 nosiocima holesterola kod zdravih pasa.

21 5. Dominantan dijametar HDL čestica je bio veći, dok je dominantni dijametar LDL čestica bio
22 nepromenjen kod obolelih u odnosu na zdrave pse.

23 6. Kod obolelih pasa je utvrđen porast koncentracije ApoA-I i SAA.

24 7. Opisani tip disproteinemije i dislipoproteinemije kao i porast koncentracije ApoA-I nisu do
25 sada opisani tokom odgovora akutne faze što ukazuje da infekcija pasa sa *B. canis* trenutno
26 predstavlja jedinstveni model za ispitivanje promena u metabolizmu lipida i lipoproteina u
27 uslovima kada postoji paralelno povećanje ApoA-I i SAA.

28
29 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
30 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
31 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

32
33 Rezultati koji je dobio kandidat tokom izrade ove doktorske disertacije su u skladu sa
34 postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, prikazani su jasno i pregledno uz pomoć tabela,
35 grafikona i slika. Izvedeni su koncizni zaključci koji proizilaze iz dobijenih rezultata.

36
37 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

38
39 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

40
41 Doktorska disertacija pod naslovom "Disproteinemija i dislipoproteinemija tokom odgovora
42 akutne faze kod pasa prirodno inficiranih sa *Babesia canis*", kandidata Zorane Milanović je
43 napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

44
45 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

46
47 Doktorska disertacija kandidata Zorane Milanović pod naslovom "Disproteinemija i
48 dislipoproteinemija tokom odgovora akutne faze kod pasa prirodno inficiranih sa *Babesia*
49 *canis*", sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

50
51 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

52
53 U okviru ove doktorske disertacije po prvi put je izvršeno paralelno ispitivanje proteina akutne
54 faze, apoproteina i lipoproteina tokom odgovora akutne faze kod prirodne infekcije pasa sa *B.*
55 *canis*. Originalni doprinos nauci ove disertacije je nalaz povećanog dijametra HDL čestica i
56 povećanja koncentracije apolipoproteina A-I kod akutne infekcije pasa sa *B. canis*, što otvara
57 nova pitanja na polju ispitivanja patogeneze ovog oboljenja, karakteristika odgovora akutne
58 faze kod pasa i ispitivanja metabolizma lipoproteina u uslovima koji se značajno razlikuju od
59 svih do sada opisanih u literaturi.

60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

IX PREDLOG:

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

- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
- da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu
- da se doktorska disertacija odbije

DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

Dr Kovačević Filipović Milica, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu.

Dr Ivanovski Petar, vanredni profesor,
Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu.

Svetlana Milanović, docent,
Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu.