

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 14. јула 2016. године, одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мастер биохемичара Маријане В. Ковачић (рођена Буач), истраживача сарадника Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, под насловом:

„Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од bronhopneumonije”

Поднету дисертацију смо прегледали и подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Маријане В. Ковачић написана је на 163 стране, А4 формата и садржи 41 слику и 31 табелу. Рад обухвата следећа поглавља: 1. Увод, 2. Општи део, 3. Наши радови, 4. Експериментални део, 5. Литература. Поред наведеног, дисертација садржи: Извод на српском (3 стране) и енглеском језику (3 стране), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (4 стране), Захвалницу (2 стране), Биографију кандидата, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

У **Уводу** кандидат даје краћи осврт на област истраживања и тему свог рада. Објашњен је здравствени и економски значај бронхопнеумоније која је главни узрочник разбољевања и смртности говеда. У уводном делу објашњен је имунски одговор на бактеријске узрочнике бронхопнеумоније посредован IgG антителима и имунокомплексима које она формирају, и наглашено да њихова улога у патогенези болести није објашњена. Како имунокомплексе није могуће изоловати из ткива плућа живе телади, кандидат образлаже сврсисходност анализе имунокомплекса у циркулацији (циркулишућих имунокомплекса; CIC). Са циљем ближег дефинисања улоге CIC и његових конституената у патогенези бронхопнеумоније телади, кандидат је у овој докторској дисертацији испитивао протеински и липидни састав CIC телади старих три месеца, оболелих од бронхопнеумоније изазване бактеријом *Pasteurella multocida*, и њихову улогу као модулятора функција ћелија имунског система.

Општи део се састоји из четири целине. У првој целини кандидат даје општи приказ досадашњих знања о респираторним болестима говеда. Описани су клинички знаци и параметри за успостављање дијагнозе болести, са посебним освртом на потешкоће постављања дијагнозе због комплексне етиологије бронхопнеумоније. У другом делу је дат приказ најчешћих микробиолошких узрочника бронхопнеумоније и

начини који они користе да савладају урођени и стечени имунски одговор домаћина. *P. multocida* је главни узročник бронхопнеумоније на фармама у околини Београда због чега су посебно описане њене структурне компоненте као фактори вируленце и антигени одговорни за настанак и развој болести. Трећа целина говори о улози имуноглобулина у респираторним болестима говеда, са посебним освртом на неке специфичности структуре IgG говеда, и о улози IgG у патогенези бронхопнеумоније. У овој целини кандидат описује механизме којим имунокомплекси у чијем се саставу налазе IgG, доприносе инфламацији у ткиву плућа. У четвртој целини кандидат даје општи приказ липида и липопротеина као конституената имунокомплекса и њихов имуномодулаторни ефекат који остварују кроз утицај на ћелије имунског система.

Поглавље **Наши радови** се састоје из три целине. У првом делу кандидат описује физичко-хемијске особине СИС телади са бронхопнеумонијом и пореди их са физичко-хемијским особинама СИС здраве телади. У овом делу приказани су резултати мерења нивоа, величине и зета потенцијала СИС и величина конституената у њиховом саставу. У наставку су приказани резултати анализе протеина крвног серума и СИС електрофорезом у гелу агарозе и полиакриламидном гелу при чему највећи део резултата представља анализу протеинских фракција у којима се налази IgG. Састав липопротеина је анализиран електрофорезом у гелу агарозе и полиакриламидном гелу. Састав неутралних липида и фосфолипида је анализиран танкослојном хроматографијом на силика гелу а маснокиселински профил фосфолипида је анализиран гасно-течном хроматографијом. У другом делу приказани су резултати *in vitro* испитивања утицаја СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом на адхезију, синтезу реактивних кисеоничних једињења (ROS), вијабилност, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију леукоцита периферне крви здраве телади. У трећем делу, у поглављу **Закључци** кандидат је на основу детаљно продискутованих резултата, систематски резимирао закључке који су проистекли из ове докторске дисертације.

Експериментални део детаљно описује узорке, састав реагенса и процедуре које су коришћене у овој дисертацији. У поглављу **Литература** наведени су радови из области истраживања који покривају све делове дисертације, укупно 203 литературна навода. На крају дата је кратка биографија са библиографијом кандидата и неопходне изјаве.

Б) Кратак приказ резултата

У првом делу ове докторске дисертације кандидат је испитивао структурне и функционалне особине СИС изолованих преципитацијом полиетилен гликолом (PEG) из крвног серума телади старе три месеца која су оболела од благе форме бронхопнеумоније изазване бактеријом *P. multocida*, серотип А. Ниво СИС болесне телади (изражен као A₃₅₀ PEG преципитата) је био значајно виши од нивоа СИС здраве

телади. Вредности A_{350} PEG преципитата нису корелирале са концентрацијама укупних протеина, γ глобулина серума и концентрацијом протеинске фракције молекулске масе од 150-160 kDa која одговара IgG. Проточном цитометријом је показано да су СИС болесне телади нешто већи од СИС здраве телади. Фотон-корелационом спектроскопијом показано је да се у СИС и здраве и болесне телади налази пет група честица, али честице СИС болесне телади имале су већи хидродинамички радијус. Зета потенцијал СИС телади са бронхопнеумонијом је био незнатно већи од зета потенцијала СИС здраве телади.

У серумима телади са бронхопнеумонијом детектован је повишен ниво укупних протеина. PEG-ом је преципитирано око 3% серумских протеина, и концентрација укупних протеина у PEG преципитабилним СИС здраве и болесне телади се није разликовала. Електрофорезом у гелу агарозе протеини крвних серума и здраве и болесне телади се раздвајају у четири фракције: γ , β и α глобулине, и албумине које су присутне и у серумима одраслих говеда. Код болесне телади није запажена промена хомогености ових фракција. У серумима болесне телади је детектован пораст апсолутне концентрације α и γ глобулина. Пораст концентрације γ глобулина је био резултат пораста фракције анодних „брзих“ γ глобулина. Овом електрофорезом показано је да се и протеини СИС телади раздвајају на γ , β и α глобулине, и албумине и да је само концентрација γ глобулина била већа у СИС телади са бронхопнеумонијом.

Кандидат је SDS-PAGE у нередукујућим условима показао да се протеини крвног серума здраве телади и телади са бронхопнеумонијом раздвајају на четири главне електрофоретске фракције: протеине молекулске масе веће од 160 kDa, протеине који по молекулској маси од 150-160 kDa одговарају IgG, две протеинске фракције које по молекулским масама од 78 и 72 kDa одговарају главним молекулским варијантама говеђег трансферина и протеинску фракцију која по молекулској маси од 66 kDa одговара говеђем албумину. Дензитометријском анализом показано је да је концентрација IgG код болесне телади била већа у односу на здраву телад, а детектован је и пораст концентрације протеина молекулске масе веће од 160 kDa и трансферина. Фракција IgG није била електрофоретски хомогена већ се састојала од три или четири делимично суперпониране субфракције. SDS-PAGE у нередукујућим условима и протеини СИС болесне телади се раздвајају у исте четири фракције, али разлике у релативној и апсолутној концентрацији ових фракција између здраве и болесне телади нису детектоване. Резултати дензитометријске квантификације су показали да у састав СИС улази само мали проценат серумских протеина (4,3% код здраве и 3,3% код болесне телади). Код телади се IgG у саставу имунокомплекса по својим физичкохемијским и имунохемијским особинама разликују од слободних/неагрегираних IgG молекула у циркулацији и да су IgG молекули говеда изузетно хетерогени кандидат је паралелно са IgG у саставу СИС анализирао укупни IgG у нефракционисаним серумима, и фракцијама серума обогаћеним у садржају IgG, а које су добијене риванолском преципитацијом и ањонском хроматографијом. Да би се смањио утицај велике индивидуалне

варијабилности у електрофоретској покретљивости различитих форми IgG, кандидат је у даљем раду анализирао и збирне узорке серума, серумских фракција и CIC. SDS-PAGE у нередукујућим условима показано је да се укупни IgG збирних узорака серума и CIC раздвајају на више делимично суперпонираних фракција чија прецизна квантификација денситометријом није била могућа. Раздвајањем протеина серума анјонском хроматографијом показано је да су серумски IgG хроматографски хетерогени. Само у фракцији протеина која се није везивала за анјонски измењивач (протеини са високом вредности pI) IgG нису били контаминирани дугим серумским протеинима. Ова фракција у којој се налазило мање од 20% укупних IgG молекула је анализирана у даљем раду. SDS-PAGE у нередукујућим условима ови IgG се раздвајају на 4 субфракције чија количина код здраве и болесне телади није била једнака, и код болесне телади детектован је значајно повећан садржај варијанте IgG највеће молекулске масе. Риванолском преципитацијом протеина серума показано је да се у серумима телади налазе и риванол-солубилни и риванол-преципитабилни IgG. Због значајне контаминације другим протеинима серума и великог губитка при пречишћавању даље се нису анализирали риванол преципитабилни IgG. Након преципитације протеина серума риванолом, у риванолским супернатантима налазило се 30% IgG од укупних серумских IgG здраве телади, и 15% IgG од укупних серумских IgG болесне телади. У збирним узорцима риванол-солубилних IgG и здраве и болесне телади детектоване су три субфракције од којих је најзаступљенија (~90%) била фракција најмање молекулске масе. На основу електрофоретске покретљивости у SDS-PAGE у нередукујућим условима закључено је да се анјонском хроматографијом и риванолском преципитацијом идентификују квалитативно и квантитативно различите електрофоретске варијанте IgG. Кандидат даље изолује IgG из CIC, нефракционисаних серума и серумских фракција афинитетном хроматографијом на протеин G и протеин A sepharose. Садржај укупних IgG (IgG изоловани на протеину G) код болесне телади је био, у односу на здраву телади, или благо повишен (серум и риванол-солубилни протеини серума) или непромењен (IgG из CIC и IgG изолован анјонском хроматографијом). Садржај IgG2 (IgG изоловани на протеину A) је био благо повишен у серумима и CIC, непромењен у риванол-солубилним протеинима и смањен у IgG изолованим анјонском хроматографијом. И код здраве телади и код телади са бронхопнеумонијом удео IgG2 у укупним IgG CIC је био нижи од удела IgG2 у укупним IgG серума, IgG из риванол-солубилних протеина серума и протеина серума изолованих анјонском хроматографијом. Са свим изолованим IgG молекулама су копреципитирали други протени од којих су они од 80, 78 и 73 kDa копреципитирали само са IgG из CIC. Специфичним бојењем за гликопротеине (*Stain all* и *Shiff*-ов реагенс) протеина раздвојених нередукујућом SDS-PAGE није нађена разлика у гликозилацији IgG из CIC, укупних IgG серума и риванол-преципитабилних IgG серума здраве и болесне телади.

Повишена гликозилација IgG болесне телади је детектована само у фракцији серумских IgG изолованих анјонском хроматографијом.

Електрофорезом у гелу агарозе и нативном PAGE у серумима здраве и телади са бронхопнеумонијом детектовани су α (HDL)- и β (LDL) липопротеини и хиломикрони. Релативне концентрације (%) α и β липопротеина серума раздвојених у гелу агарозе и обојених бојом *Fat Red*, специфичном за неутралне липиде биле су једнаке код здраве и болесне телади. Међутим, апсолутна концентрација α липопротеина (процена денситометријом на основу интензитета боје) је код болесне телади била повишена. Након раздвајања нативном PAGE и бојења судан црним (боји све класе липида) показано је да се липопротеини серума и здраве и болесне телади раздвајају на четири фракције: α_1 и α_2 липопротеине, суперпониране пре β - и β - липопротеине и хиломикроне. У фракцији пре β - и β - липопротеина, денситометријском анализом се уочавају три суперпониране субфракције од којих је код неке болесне телади, детектован повећан садржај две спорије (катодне) субфракције. Обе електрофоретске технике су у СИС здраве и болесне телади детектовале фракцију липопротеина широке електрофоретске покретљивости у пре- β , β и пост- β зони.

У серумима телади са бронхопнеумонијом концентрација триглицерида и холестерола у саставу HDL је била повишена, а концентрација холестерола у саставу LDL- смањена. Концентрација ових липида у СИС је била испод нивоа детекције примењеном методом. У серумима и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом доминирали су неутрални липиди (холестерил-естри, триглицериди, слободне масне киселине и холестерол) који су чинили више од 80% укупних липида. Од фосфолипида у серуму су детектовани фосфатидилхолин, сфингофосфолипиди и лизофосфатидилхолин. У саставу СИС доминирали су фосфолипиди са уделом од 80%.

Одређивањем маснокиселинског профила у фосфолипидима збирних узорка серума и здраве и болесне телади гасно-течном хроматографијом детектовано је 13 масних киселина, а у СИС 9 масних киселина. У обе групе телади, садржај масних киселина у фосфолипидима серума и СИС није био једнак. У фосфолипидима серума су се у највећем проценту налазиле олеинска, стеаринска, линолна и палмитинска киселина, а у фосфолипидима СИС доминирала је олеинска киселина. Од засићених масних киселина у серуму телади биле су присутне миристинска, палмитинска и стеаринска киселина. У фосфолипидима серума болесне телади удео палмитинске и стеаринске киселине је био повећан, а миристинска киселина смањена. Процент мононезасићених масних киселина (палмитолеинска, олеинска и вакценска киселина) био је нижи у серумима болесне телади у односу на здраве контроле. У серумима и здраве и болесне телади детектовано је присуство полинезасићених масних киселина (линолна, дихомо- γ - линоленска, арахидонска, еикозапентаенска, докозатетраенска, докозапентаенска и докозахексаенска киселина) које су све, осим докозатетраенске, у повећаном проценту налазиле код болесне телади. У фосфолипидима СИС детектоване

су засићене (миристинска, палмитинска и стеаринска киселина), мононезасићене (палмитолеинска, олеинска и вакценска киселина) и полинезасићене масне киселине (линолна, дихомо-гама линолеинска и арахидонска киселина). У фосфолипидима СИС болесне телади проценат свих засићених масних киселина је био благо снижен. Садржај мононезасићених масних киселина је био или благо повишен (олеинска и вакценска киселина) или није био промењен (палмитолеинска киселина). Од полинезасићених масних киселина, проценат линолне и арахидонске је био смањен код болесне телади док је проценат дихомо-гама линолеинске киселине остао непромењен. TBARS методом показано је да се ниво пероксидације липида серума и СИС здраве и телади са бронхопнеумонијом није разликовао.

Кандидат је након приказа резултата нивоа, величине и састава СИС код здраве телади и телади са бронхопнеумонијом, истраживање наставио испитивањем капацитета СИС као регулатора имунског одговора. Пошавши од претпоставке да су СИС телади функционално активни испитиван је њихов ефекат као регулатора функције гранулоцита и мононуклеарних ћелија (MNC) периферне крви здраве телади *in vitro*. Испитиван је утицај СИС на адхезију, синтезу ROS, вијабилност, апоптозу и пролиферацију леукоцита. Испитивањем утицаја СИС на адхезивност леукоцита за полистирен и на синтезу ROS (NBT тест) је процењивано да ли СИС доводе до активације леукоцита. Резултати су показали да гранулоцити и MNC на стимулацију СИС или нису одговарали променом или су реаговали повећаном или смањеном активацијом. Ефекат је зависио од СИС (здрави *vs* болесни), али и од имунолошког стања донора респондерских ћелија.

МТТ тестом је показано да су обе категорије СИС у истом степену смањивали вијабилност гранулоцита и MNC стимулираних митогеном (фитохемаглутинин; РНА), док је ефекат СИС болесне телади на смањење вијабилности нестимулисаних MNC био израженији у односу на ефекат СИС здраве телади. С обзиром да смањена вијабилност може бити последица повећене апоптозе, промене ћелијског циклуса и пролиферације кандидат даље, методама проточне цитометрије анализира ефекат СИС на ове ћелијске функције. Апоптоза гранулоцита и MNC у 24- и 48h културама је анализирана двоструким бојењем Annexin-V и пропидијум јодидом. Након 24h СИС обе групе телади су повећавали проценат апоптотичких гранулоцита у субпопулацији гранулоцита ниске густине (гранулоцити у кокултури са MNC), док су након 48h СИС болесне телади смањивали апоптозу. Ефекат СИС на гранулоците велике густине је био супротан. У културама нестимулисаних MNC обе групе СИС су повећавале проценат апоптотичних малих лимфоцита након 24h, а након 48h, присуство СИС болесне телади је смањивало проценат апоптотичних ћелија. У популацији великих лимфоцита модулаторно су деловали само СИС болесне телади који су након 48h значајно смањивали проценат апоптотичких великих лимфоцита. У културама MNC стимулираним РНА обе категорије СИС су повећавале проценат апоптотичних малих лимфоцита након 24h, а

након 48h, СИС болесне телади су значајно смањивали проценат апоптотичних ћелија. У популацији великих стимулираних МНС, СИС нису утицали на апоптозу након 24h, а након 48h ефекат је био благо стимулаторан.

Резултати анализе утицаја СИС на ћелијски циклус (бојење пропидијум јодидом) су показали да се у популацијама и нестимулисаних и МНС стимулираних РНА највећи број ћелија налазио у G0/G1 фази ћелијског циклуса, али је у популацији великих лимфоцита проценат ћелија у G0/G1 фази био мањи. СИС и здраве и болесне телади су нестимулисане МНС задржавале у G0/G1 фази, док је ефекат на стимулисане МНС са РНА био супротан.

Резултати испитивања ефекта СИС на пролиферацију МНС обојених CFSE су показали да код телади чији су лимфоцити пролиферисали у одговору на стимулацију митогеном, СИС су благо инхибирани пролиферацију митогеном стимулираних МНС, а стимулисали пролиферацију МНС култивисаних без митогена. Код телади чији лимфоцити нису пролиферисали у одговору на стимулацију РНА, само СИС болесне телади су значајно повећали пролиферацију и то МНС у култури са РНА.

Резултати *in vitro* тестова су показали да су СИС и здраве телади и телади са бронхопнеумонијом били функционално активни и модулисали су адхезију, синтезу реактивних кисеоничних једињења, вијабилност, апоптозу, ћелијски циклус и пролиферацију мирујућих леукоцита периферне крви здраве телади. Ефекат је био или стимулаторан или инхибиторан зависно од структуре СИС условљене здрављем телади, и од функционалног стања и степена активације ћелија донора.

Као општи закључак проистиче да се различит функционални капацитет СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом може објаснити квалитативним и квантитативним различитим саставом протеина и липида. Потребна су даља истраживања да би се утврдило које од структурних компоненти СИС су одговорне за њихову биолошку активност и да ли су ове компоненте ендогеног или егзогеног порекла.

В) Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Бронхопнеумонија је најчешћи узрок разбољевања и смртности говеда у свету. У плућима оболеле животиње се јавља снажна запаљенска реакција чије су последице фиброза и губитак функционалног капацитета плућа. Болест има негативан утицај на прираст, а код животиња које се користе за обнову стада продужава се време првог тељења. Бронхопнеумонија узрокује велике економске губитке на говедарским фармама јер смртност може да буде и до 25% што са ценом третмана оболелих животиња повећава трошкове производње. Ефикасна вакцина за превенцију ове болести не постоји.

До данас није разјашњено зашто имунски систем телади не одговара ефикасно на узрочнике бронхопнеумоније и зашто се након вакцинације не ствара протективни имунски одговор. Бактеријски узрочници бронхопнеумоније (*P. multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni*...) су коменсали и могу да изазову

болест само када је имунолошка одбрана слаба (код телета је то повезано са укупном незрелошћу, предоминантним Th2 имунским одговором и ниским садржајем имуноглобулина у серуму) и када су животиње изложене стресу (неповољне временске прилике, смештај у слабо вентилираном, пренасељеном и влажном простору). Имуноски одговор на неке од бактеријских узрочника бронхопнеумоније телади је зависан од специфичних IgG антитела, при чему су од највећег протективног значаја антитела IgG2 подкласе, чија је синтеза део Th1 имунског одговора. У складу са протективном улогом имуноглобулина су и подаци да се серумом телета које је прележало бронхопнеумонију могу пасивно имунизовати друга телад, и да је инциденца бронхопнеумоније максимална код теледи старих два до четири месеца. У том узрасту концентрација укупних серумских имуноглобулина и имуноглобулина специфичних за микробиолошке узрочнике бронхопнеумоније је на свом најнижем нивоу због скоро потпуног катаболизма колостралних IgG и непотпуне синтезе сопствених имуноглобулина. Додатну тежину у изучавању IgG посредованих болести говеда чини енормна антигенска и биохемијска хетерогеност говеђих IgG, која им даје статус инфракласе имуноглобулина. О значају IgG2 подкласе у бронхопнеумонијама говоре подаци да су IgG2 дефицијентна говеда и говеда са нижим титром IgG2 подложнија овој болести. У бронхопнеумонији која је експериментално индукована инфекцијом говеда бактеријом *H. somnus*, повећан титар IgG2 у бронхоалвеоларној течности корелира са нестанком бактерија из ње. Иако повећање титра IgG1 и IgA предходи повећању титра IgG2, уклањање бактерија се дешава тек када се концентрација IgG2 повећа. Серум телета које је прележало пнеумонију узроковану *H. somnus*, може се користити за пасивну имунизацију здраве теледи при чему је протективна заштита антителима IgG2 подкласе десет пута већа него антителима IgG1 подкласе. Улога подкласа IgG у бронхопнеумонији теледи изазване *P. multocida*, главним узрочником бронхопнеумоније теледи у нашем региону, до сада није изучавана.

Имунокомплекси се формирају као део физиолошког имунског одговора и њихово формирање је предуслов за ефикасно уклањање антигена/патогена. Код здраве теледи СИС се детектују већ шестог сата по рођењу. Иако су од огромног значаја за имунолошку одбрану теледи, подаци о њиховој структури и функцији су малобројни. У бронхопнеумонији, повишен ниво имунокомплекса који садрже IgG антитела је детектован у циркулацији, а депозити имунокомплекса заједно са хистолошким знацима инфламације су откривени у ткиву плућа оболелих животиња што указује да имунокомплекси имају улогу у патогенези болести. Опште је познато да имунокомплекси делују као имуномодулатори који могу да покрену проинфламаторне или антиинфламаторне реакције зависно од своје величине, састава и структурних карактеристика њихових молекулских конституената (протеина, липида, нуклеинских киселина, полисахарида) и ћелијског и цитокинског састава на месту инфламације. Улога имунокомплекса у патогенези бронхопнеумоније теледи није разјашњена. Група

истраживача из Института за медицинска истраживања и Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, показала је да је ниво СИС повишен код телади са бронхопнеумонијом и да расте са напредовањем болести. Иста група истраживача је показала да IgG из СИС болесне телади имају повећан садржај сијалинске киселине и на лаким и на тешким ланцима. Повећана сијалинизација IgG је повезана са смањеном проинфламаторном улогом ових молекула и аутори сматрају да код телади она представља један од механизма којим се имунски систем бори против неконтролисане активације ћелија и оштећања ткива плућа. У исто време, повећана сијалинизација IgG доводи до смањења афинитета везивања IgG за Fc γ рецепторе па барем делом може бити одговорна за неефикасну елиминацију патогена.

По нашем сазнању, осим ове студије, не постоје друге студије које су се бавиле анализом састава и структуре конституената СИС телади са бронхопнеумонијом. Такође, механизми којим имунокомплекси остварују своје дејство на ћелијске и молекулске компоненте имунског одговора у овој болести нису познати. Податке о механизмима којим имунокомплекси оштећују ткиво али и учествују у опоравку ткива плућа углавном су добијени у студијама рађеним на експерименталним моделима глодара. Ове студије показале су да интраалвеоларне насlage имунокомплекса у чији састав улазе IgG активирају систем комплемента и ткивне макрофаге на месту депоновања, активирају епителне ћелије плућа, активирају ендотел за којима следи привлачење неутрофила, моноцита и лимфоцита из циркулације и њихова активација у ткиву плућа. Активиране ћелије излучују проинфламаторне цитокине, ROS, липидне медијаторе, и бројне протеазе које изазивају акутну инфламацију у плућима која је саставни део успешне елиминације антигена. Инфламација ткива плућа изазвана депоновањем имунокомплекса требало би да се заврши ендогено, као резултат синтезе антиинфламаторних цитокина и инхибитора протеиназа леукоцита и матриксних металопротеаза који посредују поправку оштећеног ткива. Међутим, када постоји непрецизна регулација проинфламаторних и антиинфламаторних компоненти у повређеном плућном ткиву, што је одлика имунолошки незрелих јединки, развија се снажна запаљенска реакција и настаје бронхопнеумонија.

Имајући у виду огроман здравствени и економски значај бронхопнеумоније код телади, и непостојање ефикасног начин за превенцију болести, остаје нејасно зашто механизми настанка болести тј. механизми неефикасне имунолошке одбране телади од узрочника болести, нису детаљније проучени. Свакако тешкоћу у изучавању механизма представља извођење експеримената на телићима (велика цена животиња, неприступачне фарме, различити услови гајења на фармама, потреба за великим бројем техничког особља...). Због свега наведеног резултати ове докторске дисертације, у којој су испитиване структурне и функционалне особине СИС изолованих из крвног серума здраве телади и телади која су оболела од благе форме бронхопнеумоније изазване

бактеријом *P. multocida*, дају редак допринос разумевању физиологије имунског одговора телади и разумевању патогенезе болести.

Резултати ове докторске дисертације показују да су СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом разликују у нивоу, величини конституената, саставу протеина и липида. Такође, показују да су СИС здраве телади и телади са бронхопнеумонијом активни као модулатори функције леукоцита. У даљим истраживањима остаје да буде утврђено које од структурних компоненти СИС су одговорне за ову активност, да ли су ове компоненте ендогеног или егзогеног порекла, и на које све групе ћелија (хематопоетских и нехематопоетских) од значаја за функционисање имунског одговора СИС делују модулаторно.

Г) Објављени радови и саопштења која чине део дисертације

1) Објављени радови

1. **Kovačić M**, Marković D, Maslovarić I, Obrenović S, Grujić-Milanović J, Arsić A, Milanović Z, Savić O, Fratrić N, Ilić V. Serum proteins and lipids in mild form of calf bronchopneumonia: candidates for reliable biomarkers. *Acta Veterinaria- Beograd*, 2017, 67(2): 207-227. (категирија M22)
<https://content.sciendo.com/abstract/journals/acve/67/2/article-p201.xml?rskey=UWsbek&result=7>
2. **Buač M**, Mojsilović S, Mišić D, Vuković D, Savić O, Valčić O, Marković D, Gvozdić D, Ilić V, Fratrić N. Circulating immune complexes of calves with bronchopneumonia modulate the function of peripheral blood leukocytes: *In vitro* evaluation. *Research in Veterinary Science*. 2016, 106: 135-142. (категирија M21)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528816300698>
3. Fratrić N, Gvozdić D, Vuković D, Savić O, **Buač M**, Ilić V. Evidence that calf bronchopneumonia may be accompanied by increased sialylation of circulating immune complexes` IgG. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012, 150: 161– 168. (категирија M21a)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524271200339X>

2) Саопштења

1. Fratric N, Stojic M, Mistic D, **Kovacic M**, Ilic V, Jakic-Dimic D, Nadaskic M, Savic B, Gvozdic D. Capsular antigen type determination of *P. multocida* isolated from calves in Serbia. 30th World Buiatric Congress, Avgust 28- September 1, 2018, Sapporo, Japan. Abstract Book, YS-P04, page 383-384. (категирија M34)
2. **Kovačić M**, Maslovarić I, Milanović Z, Savić O, Fratrić N, Ilić V. Proteins and lipoproteins in sera of bronchopneumonic calves. XVII Middle European Buiatrics Congress, 3-6. Maj 2017, Slovačka, Štrbske Pleso-High Tatras, Proceedings, page 98. (категирија M34)

3. Fratrić N, **Buač M**, Nadaškić M, Ilić V, Vuković D, Gvozdić D, Đoković R, Mišić D. Bronchopneumonia in dairy calves associated with *Pasteurella multocida* – three years epidemiological survey. XIV Middle European Buiatrics Congress, 25-27. Maj 2014, Varšava, Poljska, Proceedings, page 119. (категорија M34)
4. Fratric N, **Buac M**, Gvozdc D, Vukovic D, Ilic V. Functional changes of peripheral blood leukocytes induced by circulating immune complexes in calves with bronchopneumonia. 8th EBHM symposium, 28.-30. August 2013, Bern, Švajcarska, Proceedings, page 179. (категорија M34)
5. Fratrić N, **Buač M**, Gvozdić D, Vuković D, Djoković R, Ilić V. Glycosilation profile of IgG isolated from blood serum and circulating immunocomplexes in calves and dairy cows. XIII Middle European Buiatric's Congress, Belgrade, Serbia, June 5 - 8, 2013. Congress proceedings, page 73-74. (категорија M33)
6. Fratric N, Stojic V, Gvozdic D, **Buac M**, Ilic V, Djokovic R. Calf bronchopneumonia is accompanied by increased sialylation of immune complexes' IgG. XXVII World Buiatric Congress, 3-8 June, 2012, Lisabon, Portugalija. Abstract Book, OC: 169, page 32. (категорија M34)
7. **Ковачић М**, Мојсиловић С, Арсић А, Дрвеница И, Грујић-Милановић Ј, Станчић А, Марковић Д, Мојсиловић С, Фратрић Н, Илић В. Молекулска структура и имунорегулаторна улога циркулишућих имунокомплекса телади са бронхопнеумонијом. Светски дан имунологије 2017, 27. Април 2017. Србија, Београд. Књига апстраката. (категорија M64)

Поред наведених публикација које су проистекле из ове докторске дисертација кандидат је коаутор на пет радова који су штампани у часописима категорије M20 и тринаест саопштења на домаћим и иностраним скуповима.

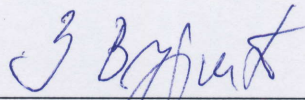
Д) Закључак

Комисија на основу детаљног прегледа докторске дисертације и на основу свега изложеног, може закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „**Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од бронхопнеумоније**”, кандидат Маријана В. Ковачић успешно одговорила на постављене задатке који се односе на испитивање структурних и функционалних карактеристика имунокомплекса код телади оболеле од бронхопнеумоније. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације су објављени у једном међународном часопису истакнутих вредности (M21a), једном раду штампаном у врхунском међународном часопису (M21), једном раду штампаном у истакнутом међународном часопису (M22), једном саопштењу са међународног скупа штампано у целини (M33), пет саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34) и једном саопштењу са скупа од националног значаја (M64).

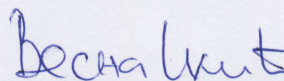
На основу свега изложеног Комисија предлаже Наставно-научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Маријане В. Ковачић под насловом „Структурне и функционалне особине имунокомплекса код телади оболеле од бронхопнеумоније” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду,
28.09.2018.

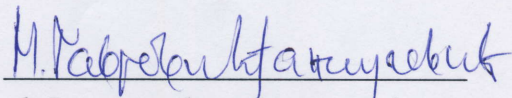
Комисија:



др Зоран Вујчић, редовни професор
Хемијски факултет
Универзитет у Београду



др Весна Илић, научни саветник
Институт за медицинска истраживања
Универзитет у Београду



др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор
Хемијски факултет
Универзитет у Београду