

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

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

10 Na 254. Sednici Komisije za procenu podobnosti kandidata i tema za izradu
11 doktorskih disertacija i specijalističkih radova, održanoj 23.01.2024. godine, predložena je
12 Komisija za ocenu završene doktorske distertacije Vladimira Milovanovića, Dr. vet. spec. pod
13 nazivom: „Karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i
14 terapijskog antivenoma“.

15 Na 252. sednici Nastavno naučnog veća, održanoj 25.01.2024. godine., doneta je
16 odluka da se usvoji predložena Komisija.

17
18 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
19 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
20 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 21 ○ Prof. dr Vitomir Ćupić, redovni profesor u penziji, Farmakologija i toksikologija, 2004.
22 godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
23 ○ Prof. dr Sunčica Borozan, redovni profesor u penziji, Hemija, 2011. godine, Fakultet
24 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
25 ○ dr Rajna Minić, naučni savetnik, 2021. godine, Institut za virusologiju, vakcine i
26 serume “Torlak”, Beograd

27
28 II PODACI O KANDIDATU:

29
30 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

31 Vladimir, Momčilo, Milovanović

32
33 2. Datum rođenja, opština, Republika:

34 26.10.1967., Beograd, Savski venac, Republika Srbija

35
36 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

37 /

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

39 /

40 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

41 „Karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i
42 terapijskog antivenoma“

43
44 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
45 grafikona i sl.):

46 Doktorska disertacija kandidata Vladimira Milovanovića napisana je na 96 strana i
47 sadrži sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (19 strana), Cilj i zadaci (1
48 strana), Materijal i metode (11 strana), Rezultati (37 strana), Diskusija (14 strana), Zaključci (2
49 strane), Literatura (10 strana, 142 reference), Biografija (1 strana) i Prilozi 1-3 (4 strane).
50 Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku nalazi se na prve 4 strane, a biografija
51 kandidata i prilozi, na poslednjih pet strana disertacije. Disertacija sadrži 65 slika (10 u
52 poglavlju Pregled literature i 55 u poglavlju Rezultati) i 14 tabela (2 u poglavlju Pregled
53 literature, 1 u poglavlju Materijal i metode i 11 u poglavlju Rezultati).

54
55 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
56 svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i
57 zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –
58 nije ograničeno, diskusije - do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u
59 doktorskoj disertaciji):

1 **Uvod** sadrži podatke o vrstama zmija koje žive na teritoriji Republike Srbije. Od ukupno 10
2 vrsta zmija, 3 vrste su otrovnice i pripadaju porodici *Viperidae*: poskok (*Vipera ammodytes*),
3 šarka (*Vipera berus*) i šargan (*Vipera ursinii*), od kojih najveću toksičnost ima venom poskoka.
4 Najzastupljenija zmija otrovnica i po brojnosti i po arealu rasprostranjenosti u Srbiji i na
5 Balkanu je poskok. Trovanje nastalo kao posledica zmijskog ujeda, Svetska zdravstvena
6 organizacija (SZO) definiše kao bolest potencijalno opasnu po život, koja je izazvana
7 venomom zmija otrovnica. U junu 2017. godine, SZO je ujed zmija otrovnica dodala na svoju
8 prioritetnu listu zanemarenih tropskih bolesti. Kandidat navodi da su venomi zmija otrovnica
9 veoma složeni po hemijskom sastavu, a da su najzastupljeniji proteini, koji imaju vrlo
10 specifične efekte na biološke procese sisara, kao što su: koagulacija krvi, regulacija krvnog
11 pritiska, neurotransmisija. U uvodu se ističe da posledice ujeda poskoka mogu biti trajni
12 gubitak funkcija pojedinih tkiva i organa ili još teži ishod kao što je amputacija delova
13 ekstremiteta. U najtežim okolnostima je moguć i letalni ishod. U Evropi je učestalost ujeda
14 zmija otrovnica daleko manja nego u tropskim područjima. Međutim, zbog navedenih
15 potencijalnih posledica, ujedi zmija otrovnica u veterinarskoj i humanoj medicini neizostavno
16 zavređuju pažnju i opreznost, pogotovo u zemljama Balkanskog regiona. Najugroženije
17 kategorije ljudi su deca, starije osobe sa hroničnim bolestima i žene u trudnoći. U
18 veterinarskoj medicini, ujedi zmija su češći kod pasa i mačaka u poređenju sa drugim vrstama
19 domaćih životinja. Jedina specifična terapija kod ujeda zmija otrovnica je primena
20 antivenoma. Kandidat ističe značaj pretkliničkih ispitivanja antivenoma.

21 **Pregled literature** se sastoji od 4 podpoglavlja. (1) Prvo podpoglavljje se odnosi na detaljni
22 sastav venoma poskoka. Proteini venoma pripadaju porodici: serin-proteaza (SVSPs), L-
23 aminokiselinskih oksidaza (LAAOs), metaloproteinaza (SVMPs), fosfolipaza grupe II (PLA2s) i
24 pet neenzimskih porodici: sekretni proteini bogati cisteinom (CRISPs), lektini C-tipa
25 (snaclecs), faktori rasta nerava (NGFs), faktori rasta vaskularnog endotela (VEGFs) i inhibitori
26 proteaza Kunitz-tipa (SPIs). Od ukupnog broja različitih proteina venoma, 22% čine
27 komponente koje ostvaruju toksični efekat različitim mehanizmima dejstva. Među njima su
28 najbolje proučeni enzimi venoma. U venomima *Viperidae* dominiraju enzimi: SVMPs, PLA2s i
29 SVSPs. SVMPs su proteaze, čine 25% proteina venoma i glavni su nosioci hemotoksičnosti.
30 PLA2s zmijskog venoma čine 26% ukupnih proteina venoma poskoka. Najpoznatija i
31 najtoksičnija PLA2 je amoditoksin (Atx), koji ispoljava neurotoksično dejstvo. SVSP čine 30%
32 ukupnih proteina venoma poskoka, a primarno deluju na faktor koagulacije X, protrombin,
33 fibrinogenazu i plazminogen. U venomu poskoka sa 5% je zastupljena LAAO. Patološki efekti
34 ovih oksidaza su indukcija ili inhibicija agregacije trombocita, indukcija apoptoze, hemoliza,
35 hemoragija, antikoagulantna aktivnost i stvaranje edema. LAAO takođe poseduju
36 antibakterijsko i antivirusno dejstvo. Enzimi koji su u venomu prisutni veoma retko i u malim
37 količinama su: glutation-peroksidaza, aspartat-proteaza i 5'-nukleotidaza. (2) Drugo
38 podpoglavljje se odnosi na toksične efekte venoma. U ovom delu kandidat daje prikaz dva
39 najvažnija toksična efekta venoma poskoka: hemotoksično i neurotoksično dejstvo.
40 *Hemotoksini* venoma oštećuju ćelijsku membranu eritrocita (hemoliza), oštećuju krvne sudove
41 (hemoragija), ometaju hemostazu (koagulotoksičnost). Hemotoksični venomi mogu
42 prouzrokovati trajna oštećenja tkiva i organa, a u teškim slučajevima i smrtni ishod. Glavni
43 nosioci hemotoksičnosti venoma su enzimi. *Neurotoksičnost* je jedna od ključnih
44 karakteristika patološkog stanja koje nastaje nakon ujeda zmija otrovnica, a da pri tome
45 mehanizmi neurotoksičnog dejstva još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Najvažniju i najtežu
46 kliničku manifestaciju neurotoksičnosti zmijskog venoma predstavlja akutna neuromuskularna
47 paraliza sa respiratornom insuficijencijom. U osnovi se smatra da neurotoksini zmijskih
48 venoma uzrokuju dve vrste neuromuskularne blokade: presinaptičku i postsinaptičku. U
49 pregledu literature, kandidat je naveo 9 potencijalnih mesta delovanja neurotoksina poreklom
50 iz venoma različitih vrsta zmija. Moguće target mesto PLA2 su i adenzin-trifosfataze
51 (ATPaze), koje su lokalizovane u fosfolipidnom dvosloju ćelijske membrane. Funkcionalno je
52 najznačajnija Na⁺/K⁺-ATPaza, poznatija kao Na-K-pumpa. Detaljno je opisana struktura i
53 funkcija ovog enzima. (3) Treće podpoglavljje se odnosi na imunski odgovor, koji je veoma
54 važan za proizvodnju antivenoma. Antivenom se može proizvesti korišćenjem celih
55 imunoglobulina (IgG), kao i fragmenata F(ab')₂ ili Fab. Prednost pripreme antivenoma sa
56 celim imunoglobulinom je znatno jednostavniji proizvodni proces, međutim primena ovako
57 dobijenog antivenoma u 10% slučajeva izaziva značajne alergijske reakcije. Proizvodnja
58 antivenoma sa Fab fragmentima je složenija, ali je ovakav antivenom pogodan u terapiji ujeda
59 zmija sa dominantno neurotoksičnim dejstvom (porodici: *Elapidae*). Komponente venoma ove

1 familije zmija su manje i lako mogu da dospeju u krvne kapilare, da se putem krvi
2 transportuju i brzo stignu do nervnog tkiva. Krupni proteini venoma *Viperidae* se kreću daleko
3 sporije – putem limfotoka i lečenje F(ab')₂ fragmentima je adekvatnije. (4) Četvrto
4 podpoglavlje se odnosi na principe produkcije antivenoma. Za proizvodnju antivenoma
5 najčešće se koriste konji, a za imunizaciju konja u cilju dobijanja antivenoma koristi se
6 kompletan, nativni venom poskoka. Imunizacija se vrši supkutanom aplikacijom venoma na
7 više mesta. Ciklus imunizacije traje 7 do 8 nedelja.

9 **Cilj istraživanja**

10 U cilju karakterizacije venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i
11 ispitivanja terapijskog dejstva antivenoma, postavljeni su sledeći zadaci:

- 12 1. Ispitivanje enzimske aktivnosti komponenti venoma koje su dominantni nosioci
13 toksičnosti venoma.
- 14 2. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma
15 neutrališu aktivnost toksičnih enzimskih komponenti venoma.
- 16 3. Ispitivanje lokalnih i sistemskih toksičnih efekata venom poskoka (citotoksičnost,
17 neurotoksičnost, hemotoksičnost) na animalnim modelima i/ili *in vitro*.
- 18 4. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma
19 neutrališu lokalne i sistemske toksične efekte venom poskoka (citotoksičnost,
20 neurotoksičnost, hemotoksičnost).
- 21 5. Određivanje korelacije između standardnog testa potence kojim se procenjuje
22 efikasnost antivenoma, sa *in vitro* testovima u kojima se procenjuje sposobnost
23 antivenoma da neutrališe mereni toksični efekat ili enzimsku aktivnost.
- 24 6. Ispitivanje potence kojom poliklonski F(ab')₂ imunoglobulinski fragmenti antivenoma,
25 dobijeni imunizacijom konja venomom poskoka, neutrališu dejstvo venoma drugih
26 zmija familije *Viperidae*: *Vipera aspis*, *Macrovipera lebetina* i *Montivipera xanthina*.

27 **Materijal i metode rada**

28 **LABORATORIJSKE ŽIVOTINJE** korišćene u ispitivanjima potiču iz sopstvenog uzgoja (Institut za
29 virusologiju, vakcine i serume „Torlak“): 60 outbred miševa oba pola Intor: Swiss i 50 outbred
30 pacova Wistar soja, muškog pola. Za proces imunizacije, korišćene su zdrave domaće kobile,
31 starosti od 5 do 10 godina, telesne mase preko 600 kg, koje ranije nisu korišćene za
32 imunizaciju u cilju proizvodnje antivenoma. Za ispitivanja je korišćen venom podvrste *Vipera*
33 *ammodytes ammodytes* koja je skoro jedina podvrsta zastupljena u Srbiji. Venom poskoka je
34 dobijan „mužom“ odraslih poskoka. Vrednost LD₅₀ venoma određena je na outbred miševima
35 Intor:Swiss, prema uputstvima Evropske farmakopeje, sa šest razblaženja venoma. Svako
36 razblaženje je ispitano na po šest miševa, telesne mase 18-22 g. Od osnovnog rastvora
37 venoma napravljena je serija razblaženja u intervalu od 5,25 µg do 25 µg po mišu. Ukupna
38 zapremina od 0,25 ml razblaženog venoma, aplikovana je miševima intravenski (repna vena).
39 Određivanje vrednosti ED₅₀ antivenoma (potence), izveden je na outbred miševima
40 Intor:Swiss. Nakon definisanja vrednosti LD₅₀, pripremane su smeše serijskih razblaženja
41 antivenoma sa količinom od 5xLD₅₀ venoma i aplikovane intravenski (repna vena). Potenca je
42 definisana kao broj LD₅₀ koji se može neutralisati 1 ml antivenoma i izražava se kao broj
43 antitoksičnih jedinica po mililitru (AJ/mL). Određivanje LD₅₀ venoma poskoka na pacovima
44 Wistar soja (albino, outbred), rađena je na isti način kao kod miševa, sa tom razlikom što su
45 testirane doze venoma u rasponu od 1,25 do 0,25 mg/pacovu. Razlika između svake dve
46 uzastopne doze iznosila je 0,125 mg.

47 **METODE**

- 48 ○ **Određivanje koncentracije proteina (spektrofotometrijska metoda)**

49 Određivanje koncentracije proteina rađeno je metodom po Bradford-u u prisustvu Komasi
50 brilijant plave boje G-250. Meren je intenzitet boje na talasnoj dužini od 580 nm. Sva merenja
51 su vršena na ELISA čitaču Thermo Scientific™ Labsystems, model Multiscan Ascent V1.24,
52 korišćenjem Thermo Scientific™ Ascent™ Software.

- 53 ○ **Test potence za određivanje efikasnosti poliklonskih imunoglobulinskih fragmenata
54 antivenoma u neutralisanju efekata venoma**

55 Test potence je izveden na outbred miševima soja Intor:Swiss prema važećim standardnim
56 propisima evropske Farmakopeje. Određena je vrednost LD₅₀ venoma za i.v. način aplikacije.
57

1 Primenjivane su smeše različitih serijskih razblaženja antivenoma sa LD₅₀ dozom venoma, a
2 zatim je rađena i.v. aplikacija svakoj grupi životinja. Na taj način je određena vrednost ED₅₀
3 antivenoma.

4 ○ *Frakcionisanje proteina venoma (hromatorgamske metode)*

5 *Frakcionisanje proteina venoma prema njihovoj veličini* izvedeno je gel-filtracijom na
6 Sephacryl S-300SF HR, Super fine, (Healtcare) matriksu, korišćenjem ÄKTA™ (Pharmacia)
7 laboratorijskog sistema za hromatografiju.

8 *Frakcionisanje proteina prema naelektrisanju*, izvršeno je jonoizmenjivačkom hromatografijom
9 na koloni (FPLC Mono Q, Pharmacia), korišćenjem ÄKTA™ sistema. Eluiranje proteina
10 vršeno je sa 20 mM Hepes pufera pH 8,0, u linearnom gradijentu soli od 0 do 1 M NaCl.
11 Elucioni profil proteina praćen je merenjem apsorbance na 215 i 280 nm.

12 Hromatografija venoma, antivenoma i kompleksa venom/antivenom izvedena je tečnom
13 hromatografijom visokih performansi (HPLC), korišćenjem aparata Hewlett Packard
14 (Beaverton, OR) 1100 sa Hewlett-Packard 1100A sa UV detektorom. Za analizu uzoraka
15 korišćena je kolona sa TSK gel QC-PAK GFC 300 matriksom, koji je pogodan za razdvajanje
16 proteina do 500 kDa.

17 ○ *Određivanje relativne molekulske mase proteina venoma, antivenoma i proteinskih*
18 *frakcija (SDS-PAG elektroforeza)*

19 Proteini venoma, antivenoma i proteinskih frakcija su razdvojeni na 9% gelu korišćenjem
20 sistema za vertikalnu elektroforezu (Mini Protean II System, Bio-Rad, USA) i napajanjem
21 strujom sa ispravljačem (LKB BROMMA 2197, Uppsala, Sweden). Gelovi su obojeni sa
22 Komazi brilijant plavim (Coomassie Brilliant blue R-250, CBB). Kao standard za molekulska
23 masu proteina korišćena je komercijalno dostupna smeša proteina poznatih molekulskih
24 masa (SDS7B2, Sigma Aldrich, USA) od 26,6-180 kDa.

25 ○ *Imunoblot analiza reaktivnosti poliklonskih imunoglobulinskih F(ab')₂ fragmenata*
26 *antivenoma sa proteinima venoma (western blot - analiza)*

27 Da bi se odredila reaktivnost poliklonskih (Fab')₂ fragmenata imunoglobulina, proteini
28 venoma su razdvojeni polunativnom elektroforezom (9%, SDS - PAGE). Nakon završene
29 elektroforeze proteina, izvršen je transfer (LKB BROMMA 2117-250, Electroforetic Transfer
30 Kit, Uppsala, Sweden) proteinskih traka na nitroceluloznu membranu (NC 45 µm, Serva,
31 Milipore Corporation Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Blokiranje
32 nespecifičnog vezivanja izvršeno je inkubacijom u 3% rastvoru odmašćenog mleka u PBS
33 puferu. Membrana je inkubirana u puferu sa antitelom specifičnim za IgG konja i konjugovano
34 sa biotinom (V-7515, Sigma) u rastvoru alkalne-fosfataze. Za vizuelizaciju reaktivnih
35 proteinskih traka upotrebljen je NBT/BCIP supstrat.

36 ○ *Imunoenzimski test (ELISA)*

37 Za oblaganje dna bunarčića ELISA ploča (Nunc MaxiSorp™, Roskilde, Denmark) nanošeno
38 je 50 µl/bunarčić venoma koncentracije 2 µg/ml. Blokiranje nespecifičnog vezivanja
39 postignuto je inkubiranjem sa 200 µl/bunarčić 1% w/v BSA/PBS. Uzorci koji su testirani ovom
40 metodom (poliklonski (Fab')₂ fragmenti, serumi i plazme konja) razblaženi su sa 1%
41 BSA/0,1% Tween 20/PBS u odgovarajućem odnosu. Vezivanje IgG antitela ili (Fab')₂
42 fragmenata specifičnih za proteine venoma, detektovano je zečijim IgG antitelom specifičnim
43 za IgG konja i kuplovanog sa peroksidazom (A6917, Sigma Aldrich, USA). Boja je razvijena
44 o-fenilendiamin-sistemom (OPD/H₂O₂/H₂SO₄), a apsorbance merena na 492/620 nm na
45 ELISA čitaču Thermo Scientific™ Labsystems.

46 ○ *Određivanje aktivnosti fosfolipaze grupe II (PLA₂),*

47 Fosfolipaze grupe II zmijskih venoma hidrolizuju estarske veze fosfolipida, pri čemu se
48 oslobađaju masne kiseline i dolazi do smanjenja pH. Aktivnost ovog enzima iz venoma ili
49 smeše venom/antivenom, određivana je na osnovu brzine smanjenja pH u deoksiholatnom
50 rastvoru kokošijeg žumanca kao supstrata. Smanjenje pH za 0,1/mg venoma/min na sobnoj
51 temperaturi, definisano je kao jedna arbitrarna jedinica. Za sva merenja pH vrednosti korišćen
52 je pH-metar Orion Star™ A111, Thermo Scientific.

53 ○ *Određivanje aktivnosti proteaza*

54 Za određivanje aktivnosti proteaza, kao supstrat je korišćen azokazein. Delovanjem proteaza
55 oslobađaju se molekuli malih molekulskih masa, koji ne precipitiraju sa trihlorsirćetnom
56 kiselinom. Oslobodene aminokiseline ili peptidi, u prisustvu azo-boje detektovani su
57 merenjem apsorbance na 440 nm na ELISA čitaču Thermo Scientific™ Labsystems.
58 Aktivnost metaloproteinaza (SVMP) i serin-proteaza zmijskog otrova (SVSP), određena je
59 dodavanjem inhibitora za serin-proteaze (PMSF), odnosno inhibitora metaloproteinaza
60 (Na₂EDTA).

1 ○ *Određivanje aktivnosti oksidaze-L-aminkokiselina (LAAO)*

2 Određivanje LAAO aktivnosti venoma vršeno je na osnovu količine H₂O₂ koja se stvara tokom
3 reakcije. Kao supstrat za LAAO korišćen je 75 mM L-fenilalanin. Enzimskom reakcijom
4 streptavidin-peroksidaze i o-fenilendiamin dihidrohlorida (OPD) kao supstrata, praćena je
5 količina H₂O₂ koja se stvara tokom reakcije. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 2 M H₂SO₄,
6 a apsorbancu merena na 492/620 nm na ELISA čitaču Thermo Scientific™ LabSystems.

7 ○ *Histološka analiza mišićnog tkiva*

8 Mišićno tkivo (*musculus gastrocnemius*), tretirano venomom ili smešom venom/antivenom,
9 fiksirano je 10%-tnim puferisanim rastvorom formaldehida. Nakon dehidratacije rastućim
10 koncentracijama alkohola, prosvetljivanja ksilolom i kalupljenja u parafin, iseći tkiva debljine
11 5 μm bojeni su hematoksilin/eozin bojama i analizirani svetlosnim mikroskopom (Reichert
12 Biovar).

13 ○ *Određivanje citotoksičnosti venoma*

14 Citotoksičnost venoma je ispitivana na Vero ćelijama permanentne ćelijske kulture.
15 Primenjivane su sledeće metode:

- 16 a) Bojenje živih adhezivnih ćelija kristal-violet bojom koja se vezuje za proteine i DNK.
17 Intenzitet boje, proporcionalan količini živih ćelija, meren je na 570 nm na ELISA
18 čitaču Thermo Scientific™ LabSystems;
- 19 b) Merenje metaboličke aktivnosti (aktivnosti celularnih oksidoreduktaza) vijabilnih ćelija
20 vršeno je u prisustvu MTT-boje. Intenzitet boje meren je na 580 nm na ELISA čitaču
21 Thermo Scientific™ LabSystems;
- 22 c) Određivanje zastupljenosti mrtvih ćelija vršeno je korišćenjem fluorescentnog
23 reagensa propidijum-jodida koji se inkorporira u ćelijsku DNK. Merenja su obavljena
24 protočnom citofluorometrijom (BD FACSCalibur™).
- 25 d) Detekcija vijabilnih, nekrotičnih, kao i ćelija u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze izvedeno je
26 bojenjem ćelija fluorescentnim bojama, akridin-oranž i etidijum-bromid (AcOr/EtBr),
27 koje se inkorporiraju u DNK. Obojene ćelije su brojane korišćenjem fluorescentnog
28 mikroskopa Olympus BH-2.

29 ○ *Eritrolitički efekat venoma ili smeše venom/antivenom*

30 Eritrolitički efekat venoma ili smeše venom/antivenom praćen je na agaru sa ovčijim
31 eritrocitima. Petri šolje su inkubirane na 37°C, u inkubatoru Heraeus preko noći. Eritrolitički
32 efekat je kvantifikovan merenjem prečnika prosvetljene zone u agaru.

33 ○ *Baktericidno delovanje venoma ili smeše venom/antivenom*

34 Baktericidno delovanje venoma ili smeše venom/antivenom praćeno je na hranljivom agaru
35 na kome je zasejan konfluentan sloj *Escherichia coli* (Gram-negativna) ili *Staphylococcus*
36 *aureus* (Gram-pozitivna bakterija). Petri šolje su inkubirane na 37 °C, u inkubatoru Heraeus
37 preko noći. Baktericidni efekat je određivan merenjem prečnika prosvetljene zone u agaru.

38 ○ *Fibrinolitički efekat venoma*

39 Efekat venoma ili smeše venom/antivenom određen je formiranjem fibrina u smeši fibrinogena
40 i trombina. Razgradnja fibrina u prisustvu različitih koncentracija venoma ili smeša
41 venom/antivenom, praćena je na 12% SDS-PAG elektroforetski. Intenzitet traka analiziran je
42 denzitometrijski, korišćenjem softvera TotalLab TL 120.

43 ○ *Fibrinogenolitički efekat venoma*

44 Fibrinogenolitički efekat venoma ili smeše venom/antivenom određen je inkubiranjem
45 uzoraka sa rastvorom humanog fibrinogena. U određenim vremenskim tačkama, uzimani su
46 aliquoti, a reakcija je zaustavljena puferom koji sadrži 5% SDS, 2 mM EDTA i 10% beta-
47 merkaptetanol. Uzorci su analizirani na 12% SDS-PAG elektroforetski.

48 ○ *Plazminogenolitički efekat venoma*

49 Plazminogenolitički efekat venoma određen je inkubiranjem plazminogena sa različitim
50 koncentracijama venoma ili smeše venom/antivenom. U određenim vremenskim tačkama
51 uzimani su aliquoti, a zatim analizirani na 12% SDS-PAG elektroforetski.

52 ○ *Ispitivanje neurotoksičnosti venoma*

53 Kontraktilnost izolovane dijafragme pacova ispitivana je softverski regulisanim sistemom za
54 ispitivanje kontrakcija preparata izolovanih organa (EIUnit, Beograd).

55 Za ispitivanja na izolovanoj dijafragmi, korišćeni su pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne
56 mase 200±20 g. Neposredno nakon žrtvovanja, pacovima je izvađena kompletna dijafragma
57 na koštanoj osnovi koju čine rebra i grudna kost. Za održavanje izolovane dijafragme u *in vitro*
58 uslovima korišćen je temperirani Tirodov rastvor na 37°C.

1 Sa kompletne dijafragme, makazama se odvoji leva i desna hemisfera. Od hemisfera
2 dijafragme, preparati se pripremaju poprečnim isecanjem centralnog dela hemisfere, dužine
3 10 mm i širine 5 mm. Isečak se odmah postavlja vertikalno u vodeno kupatilo zapremine
4 20ml, sa Tirodovim rastvorom pH 7,4 na 37°C. Oksigenacija Tirodovog rastvora u vodenom
5 kupatilu za izolovane organe, vrši se mešavinom kiseonika (95%) i ugljen-dioksida (5%).
6 Jedan kraj preparata dijafragme se fiksira za stalak, dok se drugi pričvrsti za izometrijski
7 transdjuser. Elektrode od platine obezbeđuju električnu poljnu stimulaciju preparata izolovane
8 dijafragme i povezane su sa stimulatorom BioSMART 150 (EIUnit, Beograd), koji preko
9 softvera eLAB44 (EIUnit, Beograd) omogućava stimulaciju preparata i beleženje kontrakcija u
10 realnom vremenu. Preparati izolovane dijafragme su stimulisani tetaničnim pulsevima, serijom
11 od 5 stimulacija svakih 30 sekundi (35 Hz, 20 μ s, 2 s, 15 V). U zavisnosti od protokola rada,
12 pauze između serija kontrakcija su iznosile 5, 15 ili 30 minuta. Protektivni efekat antivenoma u
13 odnosu na kontraktinost preparata izolovane dijafragme, ispitivan je primenom smeša
14 venom+antivenom u različitim masenim odnosima (w/w): 1:2, 1:10 i 1:20. Pre aplikacije u
15 vodeno kupatilo sa preparatom izolovane dijafragme, smeše su inkubirane 30 minuta na
16 konstantnoj temperaturi od 37°C.

17 ○ *Određivanje aktivnosti acetilholin-esteraze (AChE) u dijafragmi*

18 Aktivnost AChE u dijafragmi je određena primenom acetilholin-jodida kao supstrata, metodom
19 po Ellman-u. Reakcija je praćena spektrofotometrijski, tokom perioda od 5 minuta na 412 nm.
20 Rezultati su izraženi u jedinicama U/mg proteina u dijafragmi. Koncentracija proteina
21 određena je metodom po Lowry-u i izračunata iz jednačine prave $y=0,03267x-0,006328$,
22 $r=0,9987$. Kao standard je korišćen rastvor goveđeg serum albumina (BSA) koncentracije
23 0,4mg/mL.

24 ○ *Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aza u dijafragmi*

25 Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺-ATP-aza u dijafragmi je urađeno po metodi Pari i Murugavel.
26 Supernatant dijafragme je dodat u reakcionu smešu koja sadrži 50 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂,
27 100mM NaCl, 20 mM KCl, pH 7,5 i smeša je zatim inkubirana na 37°C u prisustvu 10 mM
28 ATP. Reakcija je zaustavljena dodavanjem hladnog rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA).
29 Posle taloženja proteina i centrifugiranja na 10.000 rpm, u supernatantu je određena
30 koncentracija oslobođenog neorganskog fosfora inkubacijom smeše sa rastvorom
31 (NH₄)₆MO₇O₂₄ i vitamina C, a zatim merena apsorbancija na 620 nm. Aktivnost enzima je
32 izražena preko koncentracije neorganskog fosfora u jedinicama U/mg P, a izračunata je iz
33 jednačine prave $y=0,29738x+0,01356$, $r=0,99801$. Kao standard je korišćen 3 mM rastvor
34 primarnog kalijum-fosfata.

35
36 **Rezultati.**

37 U cilju ispitivanja toksičnosti venoma i protektivnog dejstva antivenoma poskoka određena je
38 vrednost LD₅₀ na miševima i ona iznosi 12,2 μ g/miš venoma. Za određivanje potence
39 antivenoma (ED₅₀), koristio se petostruki umnožak LD₅₀ koji iznosi 61 μ g. Potenca
40 antivenoma sa kojim su rađeni svi eksperimenti u ovoj doktorskoj disertaciji iznosila je 130
41 AJ/ml. Jedna antitoksična jedinica sadrži 0,769 mg proteina. Vrednost LD₅₀ za Wistar pacove
42 je 1,79 mg/kg.

43 *Ispitivanje lokalnih efekata* venoma obuhvatilo je testiranje *edema*, *miotoksičnosti* i
44 *hemotoksičnosti*. Intenzitet edema je prikazan kao procenat povećanja mase mišića u koji je
45 aplikovan venom. Povećanje doze venoma povećava edem *m. gastrocnemius*-a. Definisana
46 je edem-formirajuća doza (EFD), kao najmanja količina venoma koja indukuje najveće
47 povećanje mase *m. gastrocnemius* 4 sata nakon i.m. aplikacije i iznosi 10 μ g venoma. Daljom
48 analizom ispitan je antiedemski potencijal antivenoma. Količina antivenoma od 0,1 AJ
49 sprečava nastajanje edema (95%) koje izaziva venom poskoka.

50 *Miotoksičnost* je ispitana na *m. gastrocnemius* nakon i.m. aplikacije venoma. Na
51 histološkim preparatima zapaža se da je struktura mišićnih vlakana narušena, a u tkivu se
52 pojavljuje prostor sa limfocitnim i hemoragičnim infiltratima. U mišićnom tkivu kome je
53 aplikovana niža koncentracija venoma promene su manje izražene. Ispitan je i antimiotoksični
54 efekat antivenoma. Histološkom analizom je ustanovljeno da količina antivenoma od 0,1 AJ u
55 potpunosti neutrališe toksični efekat izazvan venomom.

56 *Hemotoksičnost* venoma je praćena merenjem hemoragijskih površina sa unutrašnje
57 strane kože i na peritoneumu. Definisana je minimalna hemoragijska doza (MHD) venoma
58 poskoka koja indukuje hemoragijsku leziju prečnika 10 mm, 24 sata nakon supkutane
59 aplikacije venoma i iznosi 0,5 μ g/dozi. Antihemoragijska potenca antivenoma testirana je sa 5

1 MHD venoma. Dokazano je da antivenom već od 0,05 AJ neutrališe 50% površine
2 hemoragijske lezije izazvane venomom.

3 Tokom posmatranja *eritrolize* u prisustvu venoma na agaroznim pločama uočeno je
4 da dominiraju dva tipa prosvetljenja: jedno - tamnija i/ili svetlija nijansa braon boje, i drugo -
5 providno. Antivenom je uspešno inhibirao komponentu koja ima efekat eritrolize. Eritroliza je
6 praćena spektrofotometrijski u prisustvu i u odsustvu zasićenih masnih kiselina. Najmanja
7 testirana količina venoma (0,160 µg/ml) lizira eritrocite u prisustvu zasićenih masnih kiselina.
8 Potpuno liziranje eritrocita postiže se sa 1 µg/ml venoma. Izabrana koncentracija venoma sa
9 kojom je testirana potenca antieritrolize antivenoma je 1 µg/ml. Eritroliza izazvana ovom
10 količinom venoma neutralisana je 50%, sa količinom antivenoma od 80 µg/ml, dok dalje
11 povećanje količine antivenoma nije doprinelo daljoj neutralizaciji eritrolize.

12 Ispitivanje stepena koagulacije izazvanog venomom praćen je određivanjem
13 minimalne koagulacione doze venoma merene na krvnoj plazmi (MCD-P). Definisana je kao
14 najmanja količina venoma koja koaguliše humanu plazmu za 60 sekundi na 37 °C i u testu je
15 iznosila 20 g/ml. Vreme potrebno da plazma koaguliše iznosilo je 18,64±0,8 sekundi.
16 Intenzitet neutralizacije koagulacije, označen kao efektivna doza (ED) antivenoma, definisana
17 je kao maseni odnos venom/antivenom pri kome se vreme koagulacije poveća tri puta u
18 poređenju sa vremenom koagulacije plazme inkubirane samo sa venomom. Potpuna
19 neutralizacija koagulacije 20 µg/ml venoma postignuta je sa 2 mg/ml antivenoma (maseni
20 odnos 1:100).

21 Za određivanje minimalne defibrinogenišuće doze venoma (MDD-WBC), miševima je
22 uzeta krv 1 sat nakon intravenske aplikacije venoma. MDD-WBC je definisana kao ona
23 količina venoma koja ne dovodi do koagulacije krvi ni posle trideset minuta stajanja na sobnoj
24 temperaturi. Tokom eksperimenta, ni jedna koncentracija venoma nije inhibirala koagulaciju
25 krvi. Pri aplikovanju subletalne doze, krv miševa je koagulisala za manje od 15 minuta nakon
26 vađenja, a miševi su uginjavali neposredno nakon vađenja krvi. Krv miševa kojima su
27 aplikovane doze manje od subletalne, takođe je koagulisala. Miševi kojima je aplikovana veća
28 doza od subletalne, nisu preživeli do vremena definisanog za uzorkovanje krvi. Primenom ove
29 metode nije bilo moguće detektovati MDD-WBC. Dobijeni rezultati ukazuju da je MDD-WBC
30 doza venoma veća od letalne doze venoma za miševe. Ispitivan je i stepen fibrinolize pod
31 dejstvom venoma. Rezultati pokazuju da se sa venomom finalne koncentracije od 62,5 µg/ml
32 postiže maksimalna fibrinoliza od 8,5 mm. Maksimalnu neutralizaciju fibrinolitičke aktivnosti
33 100 µg/ml venoma postiže sa koncentracijom od 750 µg/ml antivenoma.

34 *Citotoksičnost* venoma ispitana je na Vero ćelijskoj liniji. Vrednost IC₅₀ venoma
35 određena je različitim tehnikama bojenja (MTT, CV, TB, PI). Koncentracija venoma koja
36 dovodi do smanjenja vijabilnosti 50% ćelija u suspenziji (IC₅₀) dobijena MTT metodom iznosi
37 62,5 µg/ml. Kompletna neutralizacija se postiže sa 0,1 AJ/ml. EC₅₀ antivenoma određena
38 MTT testom iznosila je 0,01 AJ/ml. CV bojenjem dobijena je vrednost IC₅₀ od 55 µg/ml. Ovim
39 bojenjem utvrđena je EC₅₀ od 0,3 AJ/ml. IC₅₀ venoma određen bojenjem TB iznosio je 66
40 µg/ml. Neutralizacija IC₅₀ venoma antivenomom iznosila je 6,5 AJ/ml, koja skoro u potpunosti
41 neutrališe citotoksično dejstvo venoma. IC₅₀ venoma određen bojenjem sa PI, primenom
42 protočne citometrije iznosio je 87 µg/ml. Pri koncentracijama venoma većim od 250 µg/ml ne
43 mogu se detektovati žive ćelije. Osim na Vero ćelijama, analiza citotoksičnosti venoma
44 rađena je i na leukocitima periferne krvi, koji su bojeni PI. Rezultati ukazuju da su granulociti
45 najosetljivija leukocitna subpopulacija, dok najveću otpornost na dejstvo venoma imaju
46 limfociti.

47 Za ispitivanje apoptoze primenili smo FITC AnnexinV/PI bojenje (protočnom
48 citometrijom) i AO/EB bojenje (fluorescentnom mikroskopijom). Rezultati analize nakon FITC
49 AnnexinV/PI bojenja ukazuju da se pri koncentracijama 0 do 4 µg/ml prisustvo ranih
50 (AnnexinV⁺/PI⁻) i kasno apoptotičnih (AnnexinV⁺/PI⁺) ćelija povećava, ali se pri većim
51 koncentracijama venoma sve ćelije: vijabilne (AnnexinV⁻/PI⁻), apoptotične i mrtve (AnnexinV⁻/
52 /PI⁺) dezintegrišu. Antivenom prevenira dezintegraciju ćelija i povećava prisustvo vijabilnih i
53 apoptotičnih ćelija, počevši od odnosa venom/antivenom 1:0,6 (w/w). Da bi se u potpunosti
54 neutralisao efekat venoma, uključujući indukciju apoptoze, potrebno je upotrebiti veliku
55 količinu antivenoma, do odnosa 1:80 (w/w). Prisustvo apoptotičnih, živih i mrtvih ćelija u
56 suspenzijama Vero ćelija tretiranih venomom ili smešom venom/antivenom potvrđeno je i
57 AO/EB bojenjem.

58 *Baktericidno dejstvo* venoma poskoka je dokazano na *Esherichia coli* i
59 *Staphylococcus aureus*. Venom ispoljava jaču inhibiciju rasta *S. aureus* u odnosu na *E. coli*.

1 Antivenom je efikasniji u neutralizaciji baktericidnog dejstva venoma na rast *E. coli*, u odnosu
2 na rast *S. aureus*.

3 U okviru ispitivanja *neurotoksičnog dejstva* antivenoma, rađena su *in vitro* ispitivanja
4 kontraktilnosti preparata izolovane dijafragme pod uticajem venoma i smeša
5 venom/antivenom u različitim masenim odnosima (1:2; 1:10, 1:20), kao i određivanje
6 aktivnosti AChE i Na⁺/K⁺-ATP-aze u dijafragmi. U cilju validacije metodologije urađena je
7 serija kontrolnih kontrakcija preparata dijafragme u funkciji vremena. Indirektna EFS sa
8 parametrima stimulacije: 35 Hz, 20 μs, 2 s, 15 V, obezbeđuje zahteve da su „paketi“
9 kontrakcija stabilni u funkciji vremena, a pet kontrakcija u okviru svakog „paketa“ ujednačene
10 po visini kontrakcija. U sledećem delu ispitivanja urađena je serija kontrakcija preparata
11 dijafragme pod dejstvom venoma u funkciji vremena. Dobijeni rezultati pokazuju da venom
12 poskoka u vremenskom periodu od 180 minuta, dovodi do progresivnog pada kontrakcija
13 dijafragme. U cilju ispitivanja mehanizma toksičnog delovanja venoma na neuromišićnom
14 nivou, na kraju ove serije smo izazvali 2 „paketa“ kontrakcija dijafragme primenom
15 parametara direktne stimulacije (100 Hz, 500 μs, 2 s, 50 V). Dobijene srednje vrednosti
16 kontrakcija bile su približno iste vrednosti kao i kontrolne kontrakcije. U naredne tri serije
17 ispitivanja, procenivan je protektivni efekat antivenoma u pogledu sprečavanja progresivnog
18 pada kontraktilnosti dijafragme pod dejstvom venoma. Ove serije ispitivanja su urađene
19 primenom smeša venom+antivenom (V+A) u različitim masenim odnosima (w/w), V+A=1:2,
20 V+A=1:10 i V+A=1:20. Posle primene smeše V+A=1:2 u vodeno kupatilo sa izolovanom
21 dijafragmom pacova, takođe je došlo do progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme, a posle
22 180 minuta ekspozicije srednja vrednost kontrakcija je iznosila 10,54% od kontrolnih
23 vrednosti. Smeša V+A=1:10 je posle 180 minuta ekspozicije, dovela do pada kontrakcija
24 dijafragme na 22,61% od kontrolnih vrednosti. Pošto smo u preliminarnim ispitivanjima uočili
25 da posle primene smeše sa najvećim testiranim udelom antivenoma (V+A=1:20), kontrakcije
26 dijafragme posle 180 minuta ekspozicije ne opadaju ispod 50% kontrolnih vrednosti, u finalnoj
27 seriji smo produžili ekspoziciju za 45 minuta (ukupna ekspozicija 225 minuta). I nakon ove
28 ekspozicije, kontrakcije dijafragme su se zadržale iznad 50% kontrolnih vrednosti (iznosile su
29 56,90% od kontrole). Posle svake od tri serije ispitivanja smeša venom/antivenom,
30 primenjivani su parametri direktne stimulacije koja je izazvala kontrakcije dijafragme približno
31 iste kontrolnim kontakcijama. Nelinearnom regresijom su dobijene preračunate vrednosti
32 srednjeg efektivnog vremena (ET₅₀) za koje se kontrakcije dijafragme smanje na 50%
33 kontrolnih vrednosti i one iznose: za venom 60,17±2,43 minuta, za smešu V+A=1:2
34 73,29±3,02 minuta, za smešu V+A=1:10 114,80±12,16 minuta i za smešu V+A=1:20
35 317,80±40,46 minuta. Statistički značajna razlika je dokazana između ET₅₀ za venom i ET₅₀
36 za smeše venom/antivenom u masenim odnosima 1:2 (p<0,05); 1:10 (p<0,001) i 1:20
37 (p<0,001). Takođe, postoji i statistički visoko značajna razlika između vrednosti ET₅₀ za sva tri
38 masena odnosa venom/antivenom (p<0,001).

39 Nije dokazana razlika u aktivnosti enzima AChE u preparatima dijafragme pod
40 uticajem venoma i smeša venoma/antivenoma u svim ispitivanim masenim odnosima, u
41 poređenju sa kontrolnom grupom (p>0,05).

42 U pogledu ispitivanja mehanizma neurotoksičnog dejstva venoma poskoka ispitivali
43 smo aktivnost Na⁺/K⁺-ATP-aze u uzorcima izolovane dijafragme. Pod dejstvom venoma
44 poskoka dolazi do inhibicije aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi za 52%. Smeša sa
45 najvećim udelom antivenoma (1:20) je gotovo u potpunosti oporavila aktivnost Na⁺/K⁺-
46 ATPaze. Dobijena je veoma jaka pozitivna korelacija (r=0,9150, p<0,001) između aktivnosti
47 Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi i masenog udela antivenoma u smeši venom/antivenom.

48 Detekcija LAAO potvrđena je sa dve metode: PAGE i MTT supstratom u
49 mikrotitarskoj ploči. Nakon PAGE izvršeno je bojenje gela CBB-om, u prisustvu H₂O₂ sa DAB
50 supstratom i korišćenjem MTT kao supstrata. Svim navedenim metodama detektovana je
51 jedna proteinska traka veličine oko 66 kDa. Aktivnost LAAO ispitani su MTT testom kao i
52 inhibicija aktivnosti ovog enzima u prisustvu antivenoma u mikrotitarskoj ploči. Oko 52% LAAO
53 aktivnosti u 1 mg/ml venoma je inhibirano sa 13 mg (20 AJ/ml) antivenoma. Korelacioni faktor
54 između testa potence i inhibicije venomske LAAO u 1 mg venoma poskoka iznosi R=82,57%.
55 Na osnovu rezultata dobijenih za aktivnost PLA2 venoma poskoka, za procenjivanje anti-
56 PLA2 aktivnosti antivenoma, izabrana je koncentracija venoma od 1 mg/ml. Dokazano je da
57 se aktivnost enzima PLA2 koji se nalazi u 1 mg venoma, u potpunosti neutrališe sa 18,12 mg
58 antivenoma. Korelacija između PLA2 venoma i testa potence iznosi 88,4%. Proteolitička
59 aktivnost venoma poskoka određivana je na osnovu brzine razlaganja azokazeina u prisustvu
60 35 μg/ml venoma. Ova aktivnost praćena je i u prisustvu inhibitora enzima: PMSF i EDTA.

1 Inhibitor metaloproteinaza - EDTA, doveo je do inhibicije 80% proteazne aktivnosti venoma,
2 dok je PMSF doveo do inhibicije 11,8% serin-proteinazne aktivnosti. Rezultati neutralizacije
3 aktivnosti serin-proteaze antivenomom pri masenom odnosu 1:12,5 sa 89% neutrališe
4 proteolitičku aktivnost venoma.

5 Tečnom hromatografijom venoma, antivenoma kao i njihove smeše mogu se proceniti
6 molekulske interakcije pomeranjem pika u elucionom profilu. U uzorku smeše venoma i
7 antivenoma vidi se da smanjenjem pikova venoma i antivenoma, proporcionalno dolazi do
8 povećanja pikova većih molekulskih masa koji pripadaju smeši venom/antivenom.
9 Nedvosmisleno je pokazana reaktivnost antivenoma sa različitim komponentama venoma.

10 Nakon elektroforetskog razdvajanja antivenoma u neredukujućim uslovima i bojenja
11 sa CBB zapaža se prisustvo trake oko 110 kDa. Pod istim uslovima u uzorcima venoma
12 uočljive su trake najzastupljenijih proteina u rasponu od 200 do 25 kDa. Nakon SDS-PAGE
13 na 12% gelu i transfera proteina na membranu Western blotom tehnikom dokazano je
14 prisustvo većeg broja proteinskih traka od 90 kDa do 30 kDa.

15 U cilju praćenje indukovano titra antitela koja neutrališu komponente venoma,
16 razvijena je nova tehnika ELISA testa. Ovom metodom optimizovana je: (1) količina
17 (koncentracija) antigena koja je nanošena na dno bunarčića mikrotitarske ploče; (2) u procesu
18 optimizacije ispitivani su najpovoljniji uslovi za saturaciju ploče; (3) uslovi ispiranja
19 mikrotitarske ploče između svakog koraka testa. Rezultati inhibitornog ELISA testa ukazuju
20 da F(ab')₂ fragmenti antivenoma specifično interaguju sa komponentama venoma na dozno
21 zavistan način. Pokazano je da 1 µg venoma poskoka skoro u potpunosti inhibira vezivanje 2
22 µg antivenoma. Da bi utvrdili da li antivenom poskoka može da neutrališe venome drugih
23 vrsta zmija, izvedeni su ELISA testovi potence. Dobijeni rezultati potvrđuju da F(ab')₂
24 fragmenti specifično prepoznaju imunogene venoma poskoka, kojim su konji imunizovani.
25 Osim toga, ELISA testovi pokazuju da antivenom poskoka prepoznaje i antigene venoma
26 drugih otrovnica familije *Viperidae*: *V. berus*, *V. aspis*, *Montivipera xantina* i *Macrovipera*
27 *lebetina*.

29 Diskusija

30 U okviru poglavlja Diskusija, dobijene rezultate kandidat je na adekvatan način diskutovao i
31 upoređivao sa dostupnim podacima uglanom iz strane literature.

33 Literatura

34 Poglavlje Literatura sadrži 142 bibliografske jedinice, najvećim delom iz strane literature.

35 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 36 disertaciji):

- 38 1. Posle i.m. aplikacije u *m. gastrocnemius* miševa, venom poskoka dovodi do pojave
39 sledećih lokalnih efekata: edem, hemoragije i miotoksičnost. Neutralizaciona potenca
40 0,1 AJ antivenoma za definisanu edem-formirajuću dozu iznosi 95%. Antihemoragijska
41 potenca 0,1 AJ antivenoma iznosi 61,5%. Patohistološkom
42 analizom *m. gastrocnemius* miševa, na mestu i.m. aplikacije venoma, dokazano je da
43 0,1 AJ antivenoma u potpunosti neutrališe miotoksični efekat venoma.
- 45 2. Venom ispoljava sledeće sistemske hemotoksične efekte: (a) eritrolizu indirektnog
46 tipa u kojoj posreduje više komponenti venoma; (b) aktivira koagulacione faktore
47 spoljašnjeg i unutrašnjeg puta koagulacije u plazmi; (c) dovodi do fibrinolize
48 koagulisane plazme. Defibrinogenišući efekat venoma nije bilo moguće utvrditi zbog
49 dominantnog neurotoksičnog dejstva kod miševa, koje je dovelo do njihovog uginuća.
50 Antivenom neutrališe 50% eritrolize indukovane venomom. Antivenom u potpunosti
51 neutrališe definisanu minimalnu koagulacionu dozu venoma za plazmu i poseduje
52 snažni antifibrinolitički efekat.
- 54 3. Venom na kulturi Vero ćelija i leukocitima periferne krvi ispoljava citotoksični efekat.
55 Različitim metodama za određivanje vijabilnosti ćelija, dobijene su veoma slične
56 vrednosti IC₅₀ venoma, dok su se vrednosti EC₅₀ antivenoma razlikovale. Razlike u
57 vrednostima EC₅₀ antivenoma su posledica različite imunogenosti molekula, koji su
58 ključni za mehanizme na kojima je zasnovana svaka pojedina metoda. Dokazano je

- 1 da venom indukuje ćelijsku smrt nekrozom i apoptozom. Ispitivanjem anticitotoksične
2 potence antivenoma na leukocitima periferne krvi je dokazano da su granulociti
3 najosetljiviji na dejstvo venoma.
4
- 5 4. Dokazano je da venom poskoka deluje baktericidno na *Staphylococcus aureus* i
6 *Escherichia coli*. Antivenom neutrališe baktericidni efekat venoma na obe bakterije.
7
- 8 5. Venom poskoka dovodi do progresivnog pada kontrakcija dijafragme, koje posle 180
9 minuta ekspozicije iznose 8,78% od vrednosti kontrolnih kontrakcija. Venom poskoka,
10 u dijafragmi ne dovodi do poremećaja na nivou kontraktilne mišićne mašinerije,
11 odnosno na nivou interakcije aktin – miozin.
12
- 13 6. Sigmoidne krive smanjenja kontrakcija dijafragme u funkciji vremena, za sve tri
14 testirane smeše venom/antivenom, pomerene su u desno u odnosu na sigmoidnu
15 krivu venoma. Posle primene smeše venom/antivenom sa najvećim masenim udelom
16 antivenoma (1:20), postignut je najefikasniji protektivni efekat u pogledu sprečavanja
17 progresivnog pada kontraktilnosti dijafragme pod dejstvom venoma.
18
- 19 7. Aktivnost AChE u preparatima dijafragme koji su izloženi dejstvu venoma, ne
20 razlikuje se statistički značajno u odnosu na aktivnost enzima u kontrolnim
21 preparatima, što dokazuje da venom poskoka ne ostvaruje neurotoksično dejstvo
22 posredstvom AChE.
23
- 24 8. Pod dejstvom venoma poskoka dolazi do inhibicije aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u
25 dijafragmi za 52%. Posle primene smeše venom/antivenom sa najvećim masenim
26 udelom antivenoma (1:20), aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze iznosi 94,55% kontrolnih
27 vrednosti enzima. Između aktivnosti Na⁺/K⁺-ATPaze u dijafragmi i rastućih masenih
28 udela antivenoma u smešama venom/antivenom, dobijena je veoma jaka pozitivna
29 korelacija (r=0,9150).
30
- 31 9. Glavni nosioci toksičnosti venoma poskoka su serin-proteaze, metaloproteinaze, L-
32 aminokiselinske oksidaze i fosfolipaza 2. Dokazano je da 80% proteazne aktivnosti
33 potiče od aktivnosti metaloproteaza, a 20% od serin-proteaza, iako su podjednako
34 zastupljene u venomu. Antivenom ispoljava visoku antiproteaznu potencu, jer sa 89%
35 neutrališe aktivnost ovih enzima. Aktivnost L-aminokiselinske oksidaze potiče samo
36 od monomerne jedinice, dok aktivnost ostalih izoformi nije detektovana. Zbog toga je
37 potenca antivenoma delimično niska i iznosi 50%. Aktivnost enzima fosfolipaze 2
38 venoma, antivenom neutrališe u potpunosti, što je u skladu sa neutralizacijom
39 neurotoksičnog dejstva venoma.
40
- 41 10. Venom poskoka predstavlja smešu proteina. Nativnom elektroforezom dokazano je
42 šest proteinskih traka venoma Mr od 26,2 do 180 kDa, dok je za F(ab')₂ fragmente
43 antivenoma dokazano prisustvo samo jedne trake Mr 110 kDa. Dokazano je da
44 antivenomski fragment reaguje sa komponentama venoma od 25 do 200 kDa, jer
45 komponente venoma manje ili veće mase nisu imunogene. Stvaranje imunog
46 kompleksa antigen/antitelo, koga formiraju venom i antivenom, potvrđeno je HPLC
47 metodom.
48
- 49 11. Antivenom poskoka neutrališe efekte venoma još dve vrste zmija familije *Viperidae*:
50 *Vipera aspis* i *Vipera berus*, dok u manjoj meri neutrališe efekte venoma *Montivipera*
51 *xantina* i *Macrovipera lebetina*.
52
53

1 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
2 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
3 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**
4

5 U okviru ove doktorske disertacije, dobijeni rezultati istraživanja su u potpunosti u skladu sa
6 postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja. Rezultati su prikazani precizno, logičnim
7 redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Izvedeni zaključci su jasno formulisani, u
8 saglasnosti su sa postavljenim ciljevima i proizilaze iz dobijenih rezultata istraživanja.
9

10 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

11
12 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**
13

14 Doktorska disertacija kandidata Vladimira Milovanovića pod naslovom: „Karakterizacija
15 venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i terapijskog
16 antivenoma“, napisana je u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.
17

18 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**
19

20 Doktorska disertacija kandidata kandidata Vladimira Milovanovića pod naslovom
21 „Karakterizacija venoma poskoka (*Vipera ammodytes*) sa teritorije Republike Srbije i
22 terapijskog antivenoma“ sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu
23 doktorsku disertaciju.
24

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

27 U doktorskoj disertaciji Vladimira Milovanovića ispitani su efekti venoma poskoka i njegovog
28 antivenoma na kulturama ćelija (Vero ćelije, eritrociti, leukociti periferne krvi), izolovanom
29 organu (dijafragma) i laboratorijskim životinjama (miš, pacov), te zbog toga ovaj rad
30 predstavlja prve pretkliničke studije humanog leka – antivenoma za terapiju ujeda poskoka sa
31 teritorije Republike Srbije. Tokom izrade doktorske disertacije prvi put su razvijene metode:
32 mikrotitarski MTT test za određivanje LAAO aktivnosti i MTT bojenje LAAO aktivnosti na
33 PAGE.
34

35 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
36 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne)?**
37

38 **Ne** (Provera originalnosti doktorske disertacije je izvršena od strane Univerzitetske biblioteke
39 Svetozar Marković i pokazala je indeks podudarnosti 7%).
40

41 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
42 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
43 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
44 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
45 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**
46

47 1. Milovanovic V., Minic R., Vakić J., Ivanovic S., Cupic V., Borozan S., Nesic A., Zivkovic I.
48 (2021). MTT based L-aminoacid oxidase activity test for determination of antivenom potency
49 against *Vipera ammodytes* envenomation. *Toxicon : official journal of the International Society*
50 *on Toxinology*, 192, 57–65.
51 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.01.012>
52
53

1 X PREDLOG:
2

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

5 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

6 ~~- da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu~~

7 ~~- da se doktorska disertacija odbije~~
8
9

10 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

11
12 05.03.2024. godine
13
14

15
16 1. Dr Vitomir Ćupić, red.prof.
17 Fakultet veterinarske medicine,
18 Univerzitet u Beogradu
19
20

21 _____
22
23
24
25
26 2. Dr Sunčica Borozan, red. prof.
27 Fakultet veterinarske medicine,
28 Univerzitet u Beogradu
29
30

31 _____
32
33
34
35 3. Dr Rajna Minić, naučni savetnik,
36 Institut za virusologiju, vakcine i
37 serume "Torlak", Beograd
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47