

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 09. 12. 2024. године, на основу молбе ментора др Душка Ћировића, ванредног професора Универзитета у Београду - Биолошког факултета и др Снежане Томановић, научног саветника Универзитета у Београду - Института за Медицинска истраживања у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милице К. Куручки**, истраживача сарадника Универзитета у Београду - Биолошког факултета, под насловом: „*Hepatozoon canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на територији Србије” у саставу:

1. др Ратко Сукара, научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за Медицинска истраживања;
2. др Александра Пенезић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет
3. др Анђелко Петровић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет;

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Милице К. Куручки**, под називом „*Hepatozoon canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на територији Србије” представља оригинално научно истраживање у оквиру ког су публикована два научна рада. Дисертација је написана на српском језику на **83** стране и подељена је на седам целина: **увод** (20 страна), **циљеви** (1 страна), **материјал и методе** (7 страна), **резултати** (32 стране), **дискусија** (6 страна), **закључци** (1 страна), **литература** (15 страна). Дисертација садржи и следеће непагиниране стране које обухватају: насловне стране на енглеском и српском језику, податке о менторима и члановима Комисије, захвалницу, сажетак докторске дисертације са кључним речима на енглеском и српском језику и садржај. Такође, на крају дисертације приложена су следећа документа: биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације **Милице К. Куручки** је детекција и генетички диверзитет крпељски преносивог патогена *H. canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на простору Србије. Истраживање је вршено на основу претходно прикупљених узорака слезине вука и шакала у сарадњи са ловачким удружењима у периоду од 2010. до 2020. године. Током ове студије молекуларним методама је потврђено присуство патогена *H. canis* у слезинама вука и шакала. Детекција присуства у домаћину је

први корак у детерминацији елемената циклуса кружења крпељима преносивог патогена (*H. canis*) и идентификацији потенцијалних жаришта обољења хепатозоозе коју узрокују. Дивље каниде су препознате као домаћини и резервоари великог броја екто- и ендопаразита на глобалном нивоу. Истовремено мало је доступних података са подручја Европе који говоре о улози шакала и вука у ширењу и одржавању векторима преносивих болести. Истраживања која су спроведена у овој дисертацији по први пут су у Србији указала на епидемиолошки значај шакала и вука као резервоара овог патогена, просторну дистрибуцију овог паразита у популацијама ове две врсте канида, његову преваленцу као и генетичку варијабилност сојева који циркулишу у популацијама ових домаћина. Такође на основу добијених резултата у овој дисертацији и депонованих секвенци у базама података, приказани су и резултати свеобухватних филогенетских анализа патогена *H. canis*. Студије овог карактера су од великог значаја јер могу да укажу на улогу шакала и вука у ензоотским циклусима кружења векторима преносивих патогена на истраживаном подручју као и проценама ризика преноса на домаће животиње.

Прва целина докторске дисертације, **Увод**, подељена је на три поглавља у оквиру којих се налазе додатна потпоглавља. Кандидаткиња је у првом поглављу „Вук (*Canis lupus* Linnaeus, 1758)“ и другом поглављу „Шакал (*Canis aureus* Linnaeus, 1758)“ врло концизно изложила основне биолошке и еколошке одлике испитиваних врста. Дат је и осврт на некадашње и тренутно распрострањење врста у свету и Европи, али и на најновије податке о статусу и популационим трендовима вука и шакала на подручју Србије. Треће поглавље под насловом „*Hepatozoon* sp.“ даје детаљан преглед досадашњих сазнања о присуству врста рода *Hepatozoon* на глобалном нивоу, са фокусом на врсти *H. canis*, њеним векторима, дистрибуцији, животном циклусу и путевима трансмисије као и дивљим канидама као најзначајнијим потенцијалним резервоарима овог патогена.

У оквиру друге целине, **Циљеви докторске дисертације**, концизно и јасно су представљени циљеви истраживања. Узимајући у обзир статус ловних врста - вука и шакала на територији Србије, као и познавање екологије истраживаних врста, кандидаткиња као главни циљ докторске дисертације поставља утврђивање значаја вука и шакала као резервоара узрочника хепатозоозе коју преносе крпељи. Поред главног дефинише и пет специфичних циљева докторске дисертације:

1. Утврђивање преваленце патогена *Hepatozoon canis* у популацијама шакала и вука.
2. Утврђивање просторне дистрибуције овог патогена у популацијама ове две карниворне врсте у Србији.
3. Утврђивање генетичке варијабилности сојева *Hepatozoon canis* који циркулишу у популацијама шакала и вука.
4. Утврђивање епидемиолошког значаја шакала и вука за *Hepatozoon canis* у Србији.
5. Анализа фактора (абиотичких и биотичких) који утичу на присуство и заступљеност патогена *Hepatozoon canis* у популацијама шакала и вука.

У целини **Материјал и методе** налази се пет поглавља, у оквиру којих се налазе додатна потпоглавља. У првом поглављу „Прикупљање узорака“ детаљно је описана процедура прикупљања узорака вука и шакала у сарадњи са ловачким удружењима у оквиру редовног и планираног одстрела. Узорци животиња прикупљени су са великог дела дистрибуције вука и шакала у Србији. У другом поглављу „Изолација ДНК и молекуларна детекција *Hepatozoon canis* у слезинама вука и шакала“ детаљно је описан протокол за изолацију и детекцију ДНК патогена из слезине вука и шакала. Описана је комплетна

процедура од момента узорковња ткива слезине, хомогенизације и употребе комерцијалног кита за екстракцију ДНК према протоколу произвођача. Приказана је и лабораторијска опрема Биолошког факултета Универзитета у Београду која је коришћена у сврху израде ове студије. У трећем поглављу „Секвенцирање узорака“ објашњена је процедура припреме позитивних узорака за секвенцирање у комерцијалној лабораторији MacroGen Europe. Даља обрада секвенци вршена је у програмима FinchTV™, BioEdit™, MEGA™, а идентификација врсте детектованог патогена вршена је на основу поређења добијених секвенци са претходно депонованим секвенцама у банци гена (National Center for Biotechnology Information - NCBI). У четвртом поглављу „Филогенетске анализе“ објашњено је спровођење филогенетских анализа на два сета секвенци (један сет изолован из вука, а други изолован из шакала на простору Србије), где је процена еволутивних модела, као и конструисање филогенетских стабала урађено у програму MEGA X. У петом поглављу „Статистичка обрада података“ описано је коришћење статистичких анализа добијених резултата уз помоћ Хи-квадрат (χ^2) и Г-теста са нивоом значајности $p < 0,05$. Хи-квадрат тест коришћен је да објасни статистичку значајност у преваленцији патогена између полова код вука и шакала, између региона (источни и западни) код вука и узраста (адулти и јувенилне јединке) код шакала. Г-тест је коришћен да објасни статистички значајности између региона код шакала (северни, источни и западни). Статистичке анализе су урађене у програмима: Statistica 5.1, Excel и R Software (version 4.2.2).

У целини **Резултати** се налазе четири поглавља, у оквиру којих су додатна потпоглавља. У првом поглављу „Прикупљени узорци животиња“ наведено је да је у периоду од једанаест година (2010-2020) прикупљен 221 узорак слезине вука и шакала са простора 53 општине на подручју Србије. Узорци вука прикупљени су у периоду од 10 година (2010-2019), и прикупљено је 107 узорака слезине адултних јединки вука из 30 општина на ширем простору Србије. За потребе анализа присуства, преваленције и идентификације потенцијалних жаришта хепатозоозе у популацији вука, у овој студији територија Србије је подељена на источни и западни регион у односу на положај Велике и Јужне Мораве. Највећи број узорака вука сакупљен је на подручју Сјенице, Чајетине, Жагубице, Ужица и Параћина. Од укупно 107 узорака вука, 63 су били мужјаци, а 44 женке. У периоду од 11 година (2010-2020) прикупљено је 114 узорака шакала пореклом са подручја 23 општине, са ширег простора распрострањења. С обзиром да шакал има ширу дистрибуцију у односу на вука, за потребе ове студије (анализа присуства, преваленције и идентификација потенцијалних жаришта хепатозоозе) територија Србије је подељена у односу на положај река Саве и Дунава, Велике и Јужне Мораве на три региона, северни, источни и западни. У оквиру ових региона анализирано је присуство и преваленција у популацијама шакала. Узорак шакала обухватао је 99 адултне јединке и 15 јувенилних јединки (старосне доби од 3 до 7 месеци). Највише животиња сакупљено је на подручју Сурчина и Великог Градишта. Од укупно 114 узорака шакала, 64 су били мужјаци, а 50 женке. Из зимске сезоне (од децембра до фебруара) потиче највећи број узорака што се поклапа са главном ловном сезоном, када је и одстрел најмасовнији.

У другом поглављу „Молекуларна детекција *Hepatozoon canis* у слезинама вука и шакала“ описана је детекција патогена у ове две популације. Од 107 анализираних узорака вука 62 (57,94%) је било позитивно на *H. canis*. Од 44 анализираних женке, 24 (54,55%) је било позитивно, док је од 63 мужјака 38 (60,32%) било позитивно. Нису утврђене статистички значајне разлике у преваленцијама између полова. Животиње заражене овим патогеном биле су пореклом са 26 локалитета, по 13 локалитета из источног и западног региона Србије. Међутим, постојале су статистички значајне разлике у преваленцији између источног 32/44 (72,7%) и западног региона 30/63 (47,6%). Највећи број позитивних узорака (12/23) био је из 2012. године. У западном региону је преваленција била највећа 2012. године (9/17 узорака), а 2014. године у источном региону (8/9 узорака). У фебруару је у западном региону детектован највећи број позитивних узорака (10/19), у источном региону је то било током јануара

(11/16). Од укупно 114 анализираних узорака шакала 90 (78,95%) је било позитивно на присуство DNK *H. canis*. Од укупно 50 женки, 40 (80%) је било позитивно, док је од укупно 64 мужјака, 50 (78,13%) било позитивно. Хи-квадрат тестом није уочена статистичка значајност у преваленцији међу половима. Резултати Г-теста указују да је било статистичке значајности у преваленцији између северног (68,9%), западног (95,6%) и источног (84,8%) региона. Највећи број позитивних узорака шакала (19/22) је био из 2013. године. У северном региону детектована је највећа преваленција током 2013. године (14/17 узорака), током 2012. године у западном региону (6/6 узорака), а 2016. године у источном региону (6/6 узорака). Регионално посматрано, највећи број позитивних шакала 12/14 (северни регион), 12/12 (западни регион) је био током јануара, односно 13/15 током децембра (источни регион). Преваленција код адултних јединици шакала била је 84,84% (84/99), а код јувенилних јединки 40% (6/15). Статистичке анализе су показале да постоји значајност у преваленцији код ове две узрастне категорије у корист адултних јединки.

У трећем поглављу „Разлике у преваленцији *Hepatozoon canis* у популацијама вука и шакала“ приказана је разлика у преваленцијама између ове две врсте канида у Србији. Код шакала детектована је далеко већа преваленција (78,95%), док је у узорку вука била значајно нижа (57,94%). Такође разлика је уочена и у преваленцији патогена код женки вука и женки шакала, као и код мужјака вука и мужјака шакала. Код женки вука преваленција је била 54,55%, а код женки шакала 80%, док је код мужјака вука преваленција била 60,32%, а код мужјака шакала 78,13%.

Четврто поглавље „Диверзитет различитих генотипова *Hepatozoon canis* у популацијама вука и шакала“ детаљно је описан диверзитет регистрованих генотипова. У анализираном узорку вука 36 секвенци је подвргнуто секвенцирању. Анализиране секвенце 18S rRNK гена *H. canis*, дужина у распону од 454 до 627 бп, показале су извесну хетерогеност. Поравнање је извршено на основу 30 секвенци које покривају дужину од 539 бп, где су уочене варијабилне позиције секвенци, док је шест секвенци искључено из анализе због недовољне дужине на 5' или 3' крају. Све репрезентативне секвенце су депоноване у банци гена (GenBank[®]) под приступним бројевима (OP012773 - OP012802). Секвенце су показале варијабилност на пет позиција, што одговара пет различитих типова секвенци. То су типови секвенци C1, C2, C3, C4 и C5. По четири секвенце (4/30, 13,3%) припадају C1, C4 и C5 типу секвенци, 17/30 (56,7%) припада типу секвенце C2, а једна секвенца (1/30, 3,4%) припада типу секвенце C3. У погледу регионалне дистрибуције, 20 секвенци потиче од животиња са локалитета у источном региону и 10 са локалитета у западном региону. Свих пет типова секвенци су присутне у западном региону, док су четири (C1, C2, C4 и C5) присутне у источном региону у коме једино секвенца C3 није пронађена. Иако је тип секвенце C2 био доминантан у оба региона (65% у источном региону, 40% у западном региону), уочене су незнатне разлике у погледу дистрибуције типова секвенци између региона, са доминацијом C2 и C4 на западу и C1, C2 и C5 на истоку. Филогенетске „neighbour-joining“ анализе 18S rRNK секвенци *H. canis* код вука су вршене на укупно 30 секвенци дужине 539 бп, код којих се на основу уочених варијабилних позиција издвојило пет различитих типова секвенци (C1-C5) патогена *H. canis*. За даљу анализу одабрано је пет репрезентативних секвенци добијених у овој студији, по једна из сваког типа секвенце. На основу резултата БЛАСТ претраге са претходно депонованим секвенцама доступним у банци гена (GenBank[®]) секвенца C1 типа је показала 100% идентичност са секвенцама *H. canis* у псима из Хрватске, Мађарске и Немачке и лисицама из Словачке и Немачке; репрезентативна секвенца C2 типа са секвенцама *H. canis* у псима из Хрватске и Немачке, лисицама из Чешке и Мађарске, вуковима из Хрватске и крпељима *Ixodes ricinus* из Словачке и Чешке. Тип секвенце C3 поклапа се са само две секвенце из банке гена (GenBank[®]), обе пореклом из лисица из Италије. Репрезентативна секвенца C4 типа показала је 100% идентичност са секвенцама *H. canis* у псима из Немачке, Јужне Кореје, Кубе, Кине и Малезије, лисицама из Србије и Словачке и једне јужноамерчке врсте лисица (*Dusicyon thous*) из Бразила и крпељу *Rhipicephalus sanguineus* са пса из Египта. C5 тип секвенце био је

идентичан са секвенцама *H. canis* у псима из Ирана, Замбије, Киргистана, Турске, Мађарске и Хрватске, лисицама и шакалама из Румуније, вуковима из Хрватске и *R. sanguineus* крпељу са пса из Египта. У узорку шакала секвенцирано је 35 узорака, 32 адултне јединке и 3 јувенилне јединке PCR-позитивних на *H. canis*. Секвенце 18S rRNA гена *H. canis*, биле су дужине у распону од 606 до 622 бп, док је поравнање свих секвенци било дужине 567 бп. Све секвенце су депоноване у банци гена (GenBank®) под приступним бројевима (PP711216 - PP711250). Анализом секвенци детектована је варијабилност на три позиције у секвенцама *H. canis* пореклом из шакала. Идентификована су четири различита типа секвенци. Два типа секвенци су идентична типовима секвенци претходно идентификованих код вука (С4 и С5), док су друга два јединствена типа секвенци означена као С6 и С7. Од свих идентификованих секвенци, 14/35 (40%) су припадале С4 типу, 16/35 (45,7%) С5 типу, 3/35 (8,57%) С6 типу, а једна је припадала С7 типу секвенци. Регионално, 19 секвенци је пореклом из северне Србије, 8 из западне Србије и 8 из источне Србије. Сви типови секвенци су присутни на северу, три (С4, С5, С6) типа су присутна на истоку, а два (С4, С5) на западу. С5 тип је доминирао у северном (53%) и западном (63%) региону, док је С4 тип доминирао на истоку (75%). У северном региону тип секвенце С4 (32%) и С6 (10%) су биле друга, односно трећа по заступљености, у источном региону то су секвенце С6 (13%) и С5 (12%), а у западном С4 секвенца (37%). Филогенетске анализе су вршене на укупно 35 секвенци дужине 567 бп, где се на основу уочених варијабилних позиција издваја четири различита типа секвенци (С4-С7) *H. canis*. Секвенце *H. canis* пореклом из шакала, прелиминарном БЛАСТ анализом показале су подударност са раније објављеним секвенцама из Србије, укључујући оне пореклом из вукова, лисица, паса, жутогрлог миша и псећег смећег крпеља. Комбиновани скуп података од 77 секвенци гена 18S rRNA *H. canis* (35 из ове студије и 42 раније објављених) подвргнута је филогенетској анализи. Филогенетске анализе „maximum likelihood – ML скр.“ и Бајесова статистика свих секвенци укључених у студију дале су углавном сличне резултате. Филогенетска анализа открила је три велика кластера. Први кластер, је био хетероген (29/77, 37,66%), и секвенце изоловане из шакала су показале 100% идентичност са секвенцама изолованим из вука, лисица и једном из жутогрлог миша, све су припадале С4 типу. Други кластер (24/77, 31,17%) је био разнолик и садржао је секвенце из шакала, вука и једног псећег смећег крпеља, где је доминирао С5 тип, уз само три присутне секвенце шакала класификоване као С6 тип. Трећа класа (21/77, 27,27%) је била монофилетска, састојала се од секвенци изолованих из вука, у којој је доминирао С2 тип секвенци уз само четири присутне С1 секвенце. Три секвенце се нису уклапале у ове кластере и класификоване су као С3 изолована из вука, С7 изолована из шакала у току ове студије и С8 изолована из пса. Напоменуто је да је једини изузетак између два филогенетска стабла уочен у положају једне секвенце која потиче од вука. У филогенетском стаблу „maximum likelihood“, ова секвенца је идентификована као тип секвенце С3, док је у Бајесовом стаблу класификована у тип секвенце С4.

У оквиру целине **Дискусија**, која је организована у четири сегмента, кандидаткиња је на јасан и садржајан начин сумирала резултате и анализирала их у контексту 271 цитиране референце коришћене у овој докторској дисертацији. У тој анализи, кандидаткиња је показала изузетну зрелост и способност да своје резултате тумачи на адекватан начин у контексту постојећих знања.

На самом почетку дискусије, кандидаткиња је продискутовала о досадашњим истраживањима вука и шакала као потенцијалних резервоара крпељски преносивих патогена. Указано је да на подручју Србије није било интензивнијих истраживања на популацији вука, док код шакала постоји свега неколико студија о крпељски преносивим болестима те како су резултати ове студије од великог значаја јер указују на улогу коју ове дивље каниде имају у ензоотским циклусима кружења *H. canis*.

У првом делу дискусије кандидаткиња дискутује о преваленцијама детектованим у популацијама вука и шакала на простору Србије. Кандидткиња истиче да су регистроване

преваленције у ове две популације високе као и да постоје разлике у преваленцијама између ове две каниде, што би могла бити последица преференције различитих типова станишта, односно климатских и географских одлика тих станишта која могу у већој или мањој мери погодовати крпељима или патогену. Такође, експоненцијални раст и велика густина популације шакала у Србији могу у великој мери објаснити већу преваленцију *H. canis* код ове каниде, с обзиром на то да је популација вука у Србији стабилна, али и мање бројна. Постојале су и разлике у преваленцијама у односу на пол у анализираним узорцима вука и шакала, али статистичке анализе нису показале значајност између полова унутар врста. Наведено је да би будућа истраживања требала да расветле добијене разлике између полова. Истакнуто је да је од укупно 15 анализираних јувенилних јединки шакала, шест (40%) било позитивно на *H. canis*. Пuteви инфицирања штенаца шакала би могли бити различити. Они се као и одрасле јединке могу инфицирати прилоком тимерења крзна и случајне ингестије зараженог крпеља. Међутим, постоји и друга могућност трансмисије, трансплацентално са мајке на потомство. Овај вид преноса патогена је већ описан у литератури и представља специфичан пут трансмисије овог крпељски преносивог патогена. Чињеница да су штенци старости свега неколико месеци били позитивни на *H. canis* управо указује на овај потенцијани вид трансмисије. Свакако даљим истраживањима и експериментима овај вид трансмисије код штенаца шакала (потенцијално и других канида) треба недвосмислено доказати.

У односу на просторни аспект регистроване су одређене разлике у преваленцијама код вука и шакала. Статистичке анализе показале су постојање статистички значајних разлика у просторно-временским преваленцијама код обе каниде. Резултати указују да су највеће преваленције код вука и шакала биле у периоду 2012. - 2013. година, а разлог томе би могли бити климатски услови из тог периода који су погодовали развоју бројности популација крпеља и њиховој инфицираности. Наглашено је да ово објашњење може бити прихваћено само на нивоу хипотезе с обзиром на то да у Србији не постоји системски популациони мониторинг крпеља који подразумева процене бројности и густине популација као и преваленције овог патогена. Кандидаткиња сугерише да у будућим истраживањима крпељски преносивих патогена, свакако треба обратити посебну пажњу на популационо-еколошке аспекте различитих врста крпеља који имају медицински и/или ветеринарски значај. Са просторно-временског аспекта, забележена је извесна флукуација преваленција током 11 анализираних година код шакала (2010-2020. година), односно 10 код вука (2010-2019. година). Као и на нивоу целе Србије, особености и разлике регионалне климе који су биле током година могу бити разлог различитим преваленцијама које су регистровне на нивоу анализираних региона.

У другом делу дискусије кандидаткиња дискутује о великој генетичкој варијабилности *H. canis* код вука и шакала као и сродности секвенци добијених у оквиру ових истраживања и секвенци преузетих из банке гена (GenBank®). Кандидаткиња истиче да су добијени резултати у оквиру ових истраживања показали већи генетички диверзитет у секвенцама 18S rRNA гена *H. canis* пореклом из вука (укупно пет типова секвенци С1-С5) у поређењу са онима из шакала (укупно четири типа секвенце С4-С7) и да се ове разлике могу приписати факторима као што су специфичност и адаптација домаћина, динамика популације домаћина, динамика преноса и географска специфичност региона. Већи диверзитет секвенци указује на вука као примарног домаћина који дели дужу еволуциону историју интеракције са *H. canis*. Указано је на то да се географско подручје и преклапање популација вука и шакала у Србији разликује између региона, што доводи до разлика у изложености различитим сојевима паразита или условима животне средине који погодују преношењу патогена. Наиме на подручју северног региона вук је само спорадично присутан (крајњи југоисток Баната), док је шакал широко распрострањен. Као посебан феномен истакнута је С4 секвенца вука и шакала које је била идентична са секвенцама изолованим из лисица у Србији у ранијим студијама. С обзиром на то да је ова секвенца присутна код све три аутохтоне каниде у Србији, могла би потенцијално бити основни тип који је касније

диверзификовао кроз промену домаћина од лисице, до шакала и вука. Наглашено је да је потребна детаљнија студија како у Србији тако и на нивоу Европе, која би потврдила обрасце и диверзификацију секвенци *H. canis* код дивљих канида.

У трећем делу дискусије, кандидаткиња дискутује о још једном потенцијалном виду трансмисије *H. canis*. Висока генетичка варијабилност *H. canis* у Србији, добијена током ове студије, може бити узрокована широким спектром врста плена вука и шакала. С4 тип секвенце је детектован код жутогрлог миша, док је С5 тип секвенце регистрован код смеђег псећег крпеља чији су уобичајени домаћини дивљи преживари (у чијим слезинама је недавно регистровано присуство *H. canis*). Како су глодари главни плен шакала у Србији, а дивљи преживари вука постоји могућност инфицирања овим патогеном током исхране пленом. Овај начин инфицирања - ингестијом заражених крпеља заједно са ткивом плена (посебно кожом) је већ раније доказан код неких врста рода *Hepatozoon*, што даје потпору овој тези.

На самом крају, кандидаткиња је продискутовала да су досадашње студије у Србији такође потврдиле високу преваленцију *H. canis* код лисица, а да је у току ових истраживања регистрована висока преваленција код вука и шакала и да овакви резултати указују на постојећи ризик од трансмисије *H. canis* из силватичног циклуса у градска, урбана подручја. Наглашено је да постоје лимитирани подаци о преваленцијама код паса и да су неопходна даља истраживања која би требала да дају више информација о потенцијалном значају дивљих канида као извора заразе за псе.

У оквиру целине **Закључци** је на основу резултата докторске дисертације изведено 11 појединачних закључака:

1. По први пут у Србији утврђена је висока преваленција 62/107 (57,94%) *H. canis* у анализираном узорку вука у Србији.
2. Овом студијом регистрована је и висока преваленција 90/114 (78,95%) *H. canis* код шакала у Србији и тиме потврђени раније публиковани резултати.
3. Потврђене високе преваленције код вука и шакала у Србији указују на њихов значај као резервоара у циклусу кружења патогена *H. canis* у природи.
4. Релативно висока регистрована преваленција код јувенилних шакала (40%) може указивати на трансплацентални вид преношења овог патогена.
5. У географском погледу, утврђено је постојање разлика у преваленцији *H. canis* код вука и шакала на подручју Србије. Код вука већа преваленција је била у источном региону (72,7%) у односу на западни (47,6%). Код шакала највећа преваленција забележена је у западном региону (95,6%), затим у источном (84,8%) и потом у северном региону (68,9%).
6. Поред високе преваленције *H. canis* код вука, уочена је и висока генетичка варијабилност *H. canis*. Идентификоване секвенце су показале варијабилност на пет позиција где је регистровано пет типова секвенци (С1-С5).
7. У географском погледу сви типови секвенци (С1-С5) су заступљени у западном, док су четири типа (С1, С2, С4 и С5) заступљена у источном региону. С2 тип секвенце је доминантан у оба региона, док су секвенце С3 и С4 су заступљеније у западном, а С1, С2 и С5 у источном региону.
8. Филогенетске анализе 18S rRNK секвенци *H. canis* детектованих код шакала показале су присуство четири различита типа секвенце (С4-С7) у комбинацији са три варијабилна места, што такође указује на висок генетички диверзитет *H. canis* код шакала у Србији.
9. У географском погледу највећи диверзитет је регистрован у северном региону, где су регистрована сва четири типа секвенци (С4-С7), нешто мањи диверзитет је детектован у источном (С4-С6), а најмања разноврсност је уочена у западном региону (С4-С5).

10. Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације су показали већи генетички диверзитет у секвенцама 18S rRNA гена *H. canis* пореклом из вука у поређењу са онима из шакала. Ове разлике се могу приписати факторима као што су специфичност и адаптација домаћина, динамика популације домаћина, динамика преноса и географске специфичности региона.

11. С4 тип секвенце патогена *H. canis* детектован у склопу ове дисертације код вука и шакала у Србији је идентичан са нуклеотидним секвенцама *H. canis* које су раније откривене код лисица из Србије. Ова чињеница указује на могући заједнички образац преношења патогена *H. canis* између три аутохтоне каниде у Србији.

Последња целина **Литература** садржи **271** библиографску јединицу. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

Публиковани радови и конгресна соопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја (M20):

1. **Kuručki, M.**, Tomanović, S., Sukara, R., & Ćirović, D. (2022). High prevalence and genetic variability of *Hepatozoon canis* in grey wolf (*Canis lupus* L. 1758) population in Serbia. *Animals*, 12(23), 3335. <https://doi.org/10.3390/ani12233335>
(M21a, IF2022 3.0, Oblast: 13/144 Veterinary Science)
2. **Kuručki, M.**, Sukara, R., Ćirković, V., Ćirović, D., & Tomanović, S. (2024). Molecular Detection and Genetic Variability of *Hepatozoon canis* in Golden Jackals (*Canis aureus* L. 1758) in Serbia. *Biology*, 13(6), 411. <https://doi.org/10.3390/biology13060411>
(M21, IF2022 4.2, Oblast: 25/92 Biology)

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње Милице К. Куручки, број индекса Е3002/2018 послата је у Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ дана 10. 12. 2024. године на софтверску проверу оригиналности коришћењем програма iThenticate. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили истог дана. Резултати електронске провере ове докторске дисертације показују да индекс подударности износи 13%. Увидом у Извештај уочено је подударање са 118 сумарних извора.

Детаљном анализом добијеног Извештаја и поклапања по сегментима, утврђено је да је подударање са једним извором било је 7%, два извора са 6% и једним са 5% и шест извора са подударањем од 3%. Сва остала подударања била су са 2% или 1% подударања (108 извора). Поклапања су потицала од термина на енглеском, база података, афилијација ментора, публикација које су проистекле из докторске дисертације, цитата, уобичајених прилога који прате докторску дисертацију као и општих појмова и фраза које су типичне за проблематику која је била предмет докторске дисертације.

Када се све предходно изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Милице К. Куручки, под насловом “*Hepatozoon canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на територији Србије”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Милице К. Куручки**, истраживача сарадника Универзитета у Београду – Биолошког факултета, под насловом: „*Hepatozoon canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на територији Србије”, представља прво свеобухватно истраживање у оквиру популација вука и шакала као потенцијалних резервоара патогена *Hepatozoon canis* и даје значајан допринос у разумевању трансмисије овог патогена, као и динамике преноса међу популацијама дивљих канида. По свом приступу истраживању и интерпретацији резултата, ова дисертација представља оригиналан научни допринос у познавању улоге вука и шакала у ширењу и одржавању *Hepatozoon canis* на простору Србије. Израдом ове докторске дисертације, кандидаткиња је показала способност да прецизно дефинише научне проблеме и циљеве истраживања, да примени одговарајуће методе прикупљања и анализирања података, као и да их на квалитетан начин дискутује и изведе адекватне закључке на основу добијених резултата.

На основу изложених чињеница у вези докторске дисертације Милице К. Куручки које указују на квалитет и оригинални научни допринос добијених резултата, а имајући у виду да су задаци постављени у циљу овог истраживања испуњени и верификовани кроз објављене радове у часописима међународног значаја, као и да теза садржи све релевантне и неопходне елементе, Комисија са посебним задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и омогући **Милице К. Куручки** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „*Hepatozoon canis* у популацијама вука (*Canis lupus*) и шакала (*Canis aureus*) на територији Србије”.

У Београду, 16.12.2024. године.

КОМИСИЈА:

др Ратко Сукара, научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за медицинска истраживања,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Александра Пенезић, доцент,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Анђељко Петровић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет