

Универзитет у Београду
Факултет ветеринарске медицине

Милан Ж. Рајковић

Молекуларна, паразитолошка и клиничка
испитивања ефекта терапије паса природно
инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*

Докторска дисертација

Београд, 2025

University of Belgrade
Faculty of veterinary medicine

Milan Ž. Rajković

Molecular, parasitological and clinical studies of the
effect of therapy in dogs naturally infected with the
nematode *Dirofilaria immitis*

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Ментори:

др Урош Главинић, доцент

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

др Даница Богуновић, доцент

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

Чланови Комисије:

др Зоран Станимировић, редовни професор

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

др Саша Траиловић, редовни професор

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

др Тамара Илић, редовни професор

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

др Дарко Давитков, доцент

Универзитет у Београду – Факултет ветеринарске медицине

др Зоран Дебељак, научни сарадник

Ветеринарски специјалистички институт „Краљево“

Датум одбране докторске дисертације: _____

Захвалница

Докторска дисертација реализована је захваљујући ресурсима научноистраживачког пројекта ев. бр. ИИИ 46002, руководиоца проф. др Зорана Станимировића, под називом:

„Молекуларно-генетичка и екофизиолошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“

подржаном од Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у периоду од 2011. до 2019. године, а од 2020. године настављено институционално финансирање у оквиру научноистраживачког рада Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (Уговор ев. бр. 451-03-68/2020-14/200143; 451-03-9/2021-14/200143; 451-03-9/2022-14/200143; 451-03-47/2023-01/200143 и 451-03-66/2024-03/200143).

The doctoral dissertation was realized thanks to the resources of the scientific research project No. III 46002, supervised by Prof. dr. Zoran Stanimirović, entitled:

"Molecular genetic and ecophysiological research in the protection of indigenous animal genetic resources, preservation of welfare, health and reproduction of farmed animals and production of safe food"

supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia in the period from 2011 to 2019, and since 2020, institutional funding has continued within the framework of scientific research work of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade (Contract No. 451-03-68/2020-14/200143; 451-03-9/2021-14/200143; 451-03-9/2022-14/200143; 451-03-47/2023-01/200143 and 451-03-66/2024-03/200143).

Највећу захвалност дугујем свом професору и руководиоцу пројекта, а пре свега пријатељу, проф. др Зорану Станимировићу, на пруженој шанси, безграничном стрпљењу, подршци и поверењу које ми је указао од првог дана наше сарадње. Хвала Вам професоре.

Белику захвалност дугујем и менторима доц. др Урошу Главинићу и доц. др Даници Богуновић који су ми несебично помогли око израде ове докторске дисертације. Хвала вам ментори моји.

Захваљујем се и члановима комисије проф. др Саши Траиловићу, проф. др Тамари Илић, доц. др Дарку Давиткову и др Зорану Дебељаку на конструктивним и добронамерним саветима и помоћи у изради и писању ове дисертације.

Белику захвалност дугујем и колективу Катедре за биологију и учесницима пројекта ИИИ 46002, на помоћи у савладавању молекуларно-генетичких метода и писању научно-истраживачких радова. Зваљујем се проф. др Јевросими Стевановић, проф. др Нинославу Ђелићу, др Марку Ристанићу и свим учесницима који су усмерили мој истраживачки пут. Хвала Вам.

Белику захвалност дугујем компанији Медипорт ДОО из Београда, посебно директору Горану Цветковићу, на помоћи при обезбеђивању имунохроматографских тестова за извођење експерименталног дела ове докторске дисертације. Хвала.

Захваљујем се и колегама из ветеринарских амбуланти: НС ВЕТ из Новог сада, ВЕТ ПЛАНЕТ из Београда, ДИИМИТРИЈЕВИЋ-ВЕТ из Пожаревца и РАЈКОВИЋ-ВЕТ из Неготина на помоћи у обезбеђивању пацијената и прикупљању узорака за израду ове докторске дисертације. Хвала вам.

Захвалност дугујем и члановима моје Катедре за паразитологију на прихватању, подршци, несебичној помоћи и професионалном усмеравању. Хвала вам на колегијалности и будућем заједничком раду.

Ову дисертацију посвећујем породици Рајковић, мајци Весни, оцу Живојину и брату Владану.

Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*

Сажетак

У овој докторској дисертацији извршена су молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта примењене терапије код паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*. У терапији паса је коришћен „slow kill“ протокол који подразумева пролонгирану примену ивермектина и доксицилина. Утицај паразита на домаћина и процена ефикасности примењене терапије, праћени су испитивањем присуства и броја микрофиларија у крви применом класичних паразитолошких и молекуларних метода (PCR и qPCR); анализом концентрација хематолошких и биохемијских параметара и биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer*; и анализом параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК.

У испитивање су укључена 34 пса, која су била позитивна на тестирању „брзим“ имунохроматографским тестом којим се детектује присуство антигена утеруса женке *D. immitis*. На основу тежине клиничке слике пси су разврстани у три групе: (а) пси без испољених симптома болести – Г₁; (б) пси са испољеном средњом клиничком сликом – Г₂ и (в) пси са тешком клиничком сликом – Г₃. Клинички преглед и прикупљање узорака вршени су у три момента: пре почетка терапије – на презентацији (Д₀); на средини терапије (90. дана – Д₉₀) и на крају терапије (180. дана – Д₁₈₀).

Присуство и количина ларвених облика *D. immitis* (микрофиларија) у крви паса доказивано је применом модификованог Нотовог теста, а ДНК применом PCR и qPCR и умножавањем региона 16S rRNA и фрагмента *cox1* гена специфичних за *D. immitis*, редом. Основни хематолошки и биохемијски параметри анализирани су на аутоматским анализаторима. Концентрације *NT-proBNP* и *D-dimer* анализирани су на флуоресцентном имуноесеј анализатору коришћењем уређаја за тестирање. Одређивање активности антиоксидативних ензима супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион С-трансферазе, као и концентрације малондиалдехида обављено је спектрофотометријски. Степен оштећења ДНК домаћина, као и отпорност леукоцита на спољашње мутагене процењивани су применом базног комет теста.

Старост јединки је статистички значајно утицала на тежину клиничке слике, док телесна маса паса није имала утицај на тежину клиничке слике код паса. Резултати добијени применом модификованог Нотовог теста и молекуларних метода показали су да је терапија смањила број позитивних паса на циркулишуће микрофиларије, али и стваран број микрофиларија у крви током времена. Број циркулишућих микрофиларија у све три групе био је статистички значајно већи пре терапије (Д₀) у односу на средину (Д₉₀) и крај терапије (Д₁₈₀) када микрофиларије нису детектоване ($p < 0,001$), ни паразитолошким, нити молекуларним методама. Молекуларне методе показале су вишу осетљивост од модификованог Нотовог теста имајући у виду да код шест паса (17,65%) пре терапије нису установљене микрофиларије у циркулацији применом ове метода, док су помоћу молекуларних метода и код ових јединки установљене микрофиларије у циркулацији.

Код испитиваних паса установљене су промене основних хематолошких параметара који су се вратили у опсеге референтних интервала на крају терапије (Д₁₈₀). Најзначајније промене су уочене у активностима ензима *AST*, *ALT* и *LDH*, које су биле су више од горње границе референтног интервала пре почетка терапије паса. До смањења активности ензима *AST* и *ALT* дошло је већ на средини терапије, док је активност *LDH* остала повишена, што се задржало и на крају терапије (Д₁₈₀). Код осталих биохемијских параметара установљене су или незнатне промене активности или није било детектованих промена.

Коришћењем флуоресцентног имуноесеј анализатора праћена је концентрација биомаркера *NT-proBNP* као један од параметара оштећења срчаног мишића. Вредности су биле

више код паса са тежом клиничком сликом. На крају терапије сви пси су имали патолошке концентрације *NT-proBNP* ($> 900 \text{ pmol/l}$), док су пси са средњом и тешком клиничком сликом имали концентрације које указују на постојање кардиоваскуларног обољења ($> 1800 \text{ pmol/l}$). Такође, коришћењем флуоресцентног имуноесеј анализатора праћена је и концентрација биомаркера *D-dimera* као параметар промена у коагулацији. Код свих паса концентрација овог биомаркера пре почетка терапије се кретала унутар утврђених референтних интервала. Пси са средњом и тешком клиничком сликом имали су повишене концентрације овог биомаркера на средини терапије, док су се на крају терапије (180. дана) код ових паса концентрације смањиле, али су и даље биле изнад референтних интервала, што указује на присуство васкуларних промена код ових група паса.

Присуство оксидативног стреса као последица примењене терапије праћено је анализом промена у активности антиоксидативних ензима и код свих паса је примећен статистички значајан пораст супероксид дисмутазе, каталазе и глутатион С-трансферазе на средини и на крају терапије. Концентрација малондиалдехида значајно се смањивала током терапије, што указује на смањење оксидативног стреса и повећање антиоксидативне заштите код испитиваних паса.

Степен оштећења ДНК праћен је применом *in vivo* и *ex vivo* комет теста. Резултати укупног комет скова (*in vivo* комет тест) добијени пре почетка терапије показали су највећи степен оштећења ДНК код паса у групи Г₃, док је временски зависно смањење оштећења ДНК услед дејства примењене терапије уочено код свих испитиваних група. Применом *ex vivo* комет теста детектовано је повећање отпорности леукоцита на спољашње мутагене на крају терапије, односно након елиминисања микрофиларија из циркулације паса, што је последично довело до смањења оксидативног стреса.

На основу добијених резултата може се закључити да се примењени „slow kill“ протокол, који подразумева продужену примену ивермектина и доксициклина показао ефикасним у елиминацији микрофиларија *D. immitis* код природно инфицираних паса, што је последично довело до смањења оксидативног стреса, степена оштећења ДНК и повећања отпорности леукоцита код инфицираних паса.

Кључне речи: биомаркери; *D-dimer*; *Dirofilaria immitis*; комет тест; молекуларна дијагностика; *NT-proBNP*; оксидативни стрес; паразитолошка дијагностика;

Научна област: Ветеринарска медицина

Уже научне области: Паразитологија, Ветеринарска генетика

УДК број:

Molecular, parasitological and clinical studies of the effect of therapy in dogs naturally infected with the nematode *Dirofilaria immitis*

Abstract

In this doctoral dissertation, molecular, parasitological, and clinical investigations were conducted to assess the effect of applied therapy in dogs naturally infected with the nematode *Dirofilaria immitis*. The "slow kill" protocol, which involves prolonged administration of ivermectin and doxycycline, was used for the therapy. The impact of the parasite on the host and the evaluation of the therapy's effectiveness were monitored by testing for the presence and number of microfilariae in the blood using classical parasitological and molecular methods (PCR and *q*PCR), analyzing concentrations of hematological and biochemical parameters, biomarkers *NT-proBNP* and *D-dimer*, and evaluating oxidative stress parameters and DNA damage levels.

A total of 34 dogs that tested positive using a "rapid" immunochromatographic test detecting the presence of *D. immitis* female uterine antigens were included in the study. Based on the severity of the clinical signs, the dogs were classified into three groups: (a) asymptomatic dogs – Group 1 (G_1), (b) dogs with mild clinical signs – Group 2 (G_2), and (c) dogs with severe clinical signs – Group 3 (G_3). Clinical examination and sample collection were performed at three time points: before therapy (Day 0 – D_0), at the mid-point of therapy (Day 90 – D_{90}), and at the end of therapy (Day 180 – D_{180}).

The presence and quantity of larval forms of *D. immitis* (microfilariae) in the blood of the dogs were tested using a modified Knott's test, while DNA was assessed using PCR and *q*PCR by amplifying the 16S rRNA region and the *cox1* gene fragment specific to *D. immitis*. Hematological and biochemical parameters were analyzed using automatic analyzers. *NT-proBNP* and *D-dimer* concentrations were analyzed using a fluorescent immunoassay analyzer. The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase) and the concentration of malondialdehyde were determined spectrophotometrically. DNA damage and the resistance of leukocytes to external mutagens were evaluated using the basic comet assay.

The age of the dogs significantly influenced the severity of the clinical signs, while their body weight had no impact on the clinical severity. The results from the modified Knott's test and molecular methods showed that therapy reduced the number of dogs positive for circulating microfilariae, as well as the actual number of microfilariae in the blood over time. The number of circulating microfilariae in all three groups was significantly higher before therapy (D_0) compared to the mid-point (D_{90}) and the end of therapy (D_{180}), when microfilariae were not detected by either parasitological or molecular methods ($p < 0.001$). Molecular methods showed higher sensitivity than the modified Knott's test, as microfilariae were not detected in circulation by the Knott's method in six dogs (17.65%) before therapy, while molecular methods still detected them in circulation in these individuals.

Changes in basic hematological parameters were observed in the studied dogs, and these parameters returned to reference interval values by the end of therapy (D_{180}). The most significant changes were noted in the activities of *AST*, *ALT*, and *LDH* enzymes, which were elevated above the upper reference limit before therapy. A reduction in *AST* and *ALT* activity was observed by the mid-point of therapy, while *LDH* activity remained elevated, which persisted until the end of therapy (D_{180}). For other biochemical parameters, either minimal changes in activity were noted or no changes were detected.

NT-proBNP concentration was monitored using the fluorescent immunoassay analyzer as a parameter of cardiac muscle damage. The values were higher in dogs with more severe clinical signs. At the end of therapy (D_{180}), all dogs had pathological *NT-proBNP* concentrations (> 900 pmol/l), with dogs in the moderate and severe clinical groups having concentrations indicating cardiovascular disease (>1800 pmol/l). *D-dimer* concentrations were also monitored using the fluorescent immunoassay analyzer as a marker of coagulation changes. Before therapy (D_0), all dogs had concentrations within the established reference intervals. Dogs with moderate and severe clinical signs

had elevated *D-dimer* concentrations at the mid-point of therapy, but by the end of therapy (D₁₈₀), the concentrations decreased, though they remained above the reference intervals, indicating vascular changes in these groups.

Oxidative stress as a result of the applied therapy was monitored by analyzing changes in antioxidant enzyme activity, with a statistically significant increase in superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase activity observed in all dogs at the mid-point and end of therapy. Malondialdehyde concentration significantly decreased during therapy, indicating reduced oxidative stress and increased antioxidant protection in the studied dogs.

DNA damage was evaluated using *in vivo* and *ex vivo* comet assays. The total comet score (*in vivo* comet test) obtained before therapy showed the highest level of DNA damage in dogs from group G₃, with a time-dependent reduction in DNA damage observed in all groups due to the therapy. The *ex vivo* comet test detected an increase in leukocyte resistance to external mutagens at the end of therapy (D₁₈₀), after the elimination of microfilariae from the dogs' circulation, which consequently led to reduced oxidative stress.

Based on the obtained results, it can be concluded that the applied "slow kill" protocol, involving prolonged administration of ivermectin and doxycycline, proved effective in eliminating microfilariae of *D. immitis* in naturally infected dogs, leading to reduced oxidative stress, decreased DNA damage, and increased leukocyte resistance in the infected dogs.

Keywords: biomarkers, *D-dimer*, *Dirofilaria immitis*, comet assay, molecular diagnostics, *NT-proBNP*, oxidative stress, parasitological diagnostics

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfields: Parasitology, Veterinary genetics

UDC number:

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Таксономски статус и морфолошке карактеристике адулта <i>Dirofilaria immitis</i>	3
2.2. Развојни циклус <i>Dirofilaria immitis</i>	4
2.3. Ендосимбиотска бактерија <i>Wolbachia pipientis</i>	6
2.4. Прелазни домаћини у развојном циклусу <i>Dirofilaria immitis</i>	6
2.5. Епизоотиолошка ситуација у свету.....	7
2.6. Патогенеза кардиопулмоналне диروفилариозе паса	9
2.7. Оксидативни стрес и оштећење молекула ДНК домаћина.....	11
2.8. Клиничка слика кардиопулмоналне диروفилариозе паса.....	14
2.9. Методе које се користе у дијагностици и прогнози кардиопулмоналне диروفилариозе... 15	
2.9.1. Методе детекције <i>Dirofilaria immitis</i> код паса.....	15
2.9.1.1. Имунохроматографски тестови	16
2.9.1.2. Паразитолошке методе	16
2.9.1.3. Молекуларне методе	17
2.9.2. Биомаркери	17
2.9.2.1. Н-терминални про-Б-тип натриуретски пептид (<i>NT-proBNP</i>).....	18
2.9.2.2. <i>D-dimer</i>	19
2.10. Терапија кардиопулмоналне диروفилариозе.....	20
2.11. Мере профилаксе	23
3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	24
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА	25
4.1. Материјал	25
4.1.1. Животиње укључене у истраживање	25
4.2. Методе	25
4.2.1. Клинички преглед животиња.....	25
4.2.2. Узорковање крви	26
4.2.3. Доказивање присуства и бројање микрофиларија у крви паса применом модификованог Нотовог теста.....	27
4.2.4. Доказивање антигена женке <i>Dirofilaria immitis</i> у крви паса помоћу „брзог“ имунохроматографског теста.....	27
4.2.5. Доказивање присуства ДНК микрофиларија <i>Dirofilaria immitis</i> помоћу конвенционалне PCR методе	28

4.2.5.1. Екстракција ДНК из прикупљене крви	28
4.2.5.2. Провера квалитета екстраховане ДНК	28
4.2.5.3. PCR амплификација циљаних секвенци	28
4.2.5.4. Електрофореза умножених PCR продуката	30
4.2.6. Релативна квантификација ДНК <i>Dirofilaria immitis</i> помоћу qPCR методе	30
4.2.7. Хематолошке и биохемијске анализе	33
4.2.8. Одређивање концентрације биомаркера <i>NT-proBNP</i>	33
4.2.9. Одређивање концентрације биомаркера <i>D-dimer</i>	35
4.3. Одређивање параметара оксидативног стреса	36
4.3.1. Одређивање активности ензима супероксид дисмутаза (<i>SOD</i>)	36
4.3.2. Одређивање активности ензима каталаза (<i>CAT</i>)	36
4.3.3. Одређивање активности ензима глутатион С-трансфераза (<i>GST</i>)	37
4.3.4. Одређивање концентрације биомаркера малондиалдехида (<i>MDA</i>)	37
4.4. Одређивање степена оштећења ДНК у леукоцитима паса помоћу комет теста	38
4.4.1. Припрема предметног стакла	38
4.4.2.1. Припрема и третман леукоцита паса за извођење <i>in vivo</i> комет теста	38
4.4.2.2. Припрема и третман леукоцита паса за извођење <i>ex vivo</i> комет теста	38
4.4.3. Извођење комет теста	38
4.5. Место и време истраживања	40
4.6. Статистичка обрада података	40
5. РЕЗУЛТАТИ	41
5.1. Старост паса	41
5.2. Телесна маса паса	42
5.4. Праћење броја микрофиларија применом модификованог Нотовог теста	43
5.5. Резултати PCR анализе	45
5.6. Резултати qPCR анализе	46
5.7. Резултати основних параметара црвене крвне лозе	47
5.8. Резултати основних параметара беле крвне лозе	49
5.9. Резултати основних биохемијских параметара	50
5.10. Резултати концентрације биомаркера <i>NT-proBNP</i>	52
5.11. Резултати концентрација биомаркера <i>D-dimer</i>	53
5.12. Резултати параметара антиоксидативне заштите и оксидативног стреса	55
5.12.1. Активност ензима супероксид дисмутаза (<i>SOD</i>)	55
5.12.2. Активност ензима каталаза (<i>CAT</i>)	56

5.12.3. Активност ензима глутатион С-трансферазе (<i>GST</i>).....	58
5.12.4. Концентрација малондиалдехида (<i>MDA</i>).....	60
5.13. Резултати процене степена оштећења ДНК паса	61
5.14. Резултати отпорности леукоцита паса на оштећење ДНК	63
6. ДИСКУСИЈА	65
7. ЗАКЉУЧЦИ	77
8. ЛИТЕРАТУРА	79

1. УВОД

У савременом друштву, човек и пас могу развити дубоку и блиску повезаност. Власници своје псе често описују као важан извор емоционалне подршке, све чешће наглашавају и њихов значај у процесу дружења, у ослобађању од стреса и неговању физичке активности током шетње, због чега ови љубимци често добијају статус чланова породице. У последњим годинама, друштвене мреже су постале главни начин повезивања људи, а због модерног и брзог начина живота, посебно након пандемије COVID-19, интерперсонални контакти су значајно смањени. Таква удаљеност има за последицу јачање веза које људи успостављају са својим кућним љубимцима. Услед тога, пси све више постају пуноправни чланови и саставни део правних и друштвених односа.

Болести кућних љубимаца изазивају велику забринутост власника, како због потенцијалне патње пса и страха власника од губитка љубимца, тако и индиректно због ризика од преношења узрочника различитих болести са животиња на људе. Заразне болести паса, које преносе артроподни вектори могу бити узроковане широким спектром различитих бактерија, вируса и паразита. Веома распрострањено паразитско обољење паса у Србији, је кардиопулмонална диروفилариоза проузрокована нематодом *Dirofilaria immitis*, која се јавља и код других сисарских врста и кућних љубимаца. Домаћи пси су најпријемчивија врста, али прави домаћини могу бити и друге врсте из фамилије канида, као и мачке. Раширеност овог паразита умногоме зависи од климе и топографије, које условљавају присуство прелазних домаћина – вектора, комараца из родова *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* и *Coquillettidia*. Ширење инфекције почиње када пријемчиви комарац унесе L_1 ларве *D. immitis* – микрофиларије, приликом сисања крви инфицираног домаћина. Ларве се даље развијају у дигестивном тракту комарца и достижу стадијум L_3 , који је инфективан за правог домаћина. Хранећи се крвљу правог домаћина инфицирана женка комарца, преко свог усног апарата, уноси инфективне ларве (L_3) у његов организам.

У организму правог домаћина инфективне ларве се пресвлаче до стадијума адулта, који углавном паразитирају у плућним артеријама, а ређе и у десној срчаној комори. Тежина болести директно зависи од броја паразита, времена трајања инфекције, здравственог статуса и имунског одговора домаћина. Паразити изазивају механичка оштећења крвних судова што најчешће доводи до појаве тромбозе. Оштећењем зида плућних артерија повећава се пропустљивост малих крвних судова, што доводи до настанка интерстицијалних и алвеоларних инфилтрата. Хроничне запаљенске промене паренхима плућа у каснијој фази болести доводе до настанка фиброзних промена у плућном ткиву. Такође, уинули паразити потенцирају стварање тромбова и даљу опструкцију крвотока, што појачава оштећење паренхима плућа. Задебљање зида крвних судова, у комбинацији са опструктивним променама, доводи до повећања отпора у крвним судовима плућа, што може изазвати повећање плућног артеријског притиска. Поред тога, може да се појави и алергијски пнеумонитис, односно интензивна алергијска реакција организма на присуство микрофиларија у плућној циркулацији, а последично и еозинофилна грануломатоза плућа. Као последица плућне хипертензије и постојања накнадног оптерећења за десну комору, долази до хипертрофије и попуштања десног срца. Током трајања инфекције, поред наведених патофизиолошких промена, у организму животиње стварају се и непотпуно редуковани кисеоникови производи (*Reactive Oxygen Species* – *ROS*). Повећано стварање *ROS* надвладава механизме антиоксидативне заштите организма што нарушава равнотежу између прооксиданаса и антиоксиданаса, доводећи до стања које се назива оксидативни стрес. Да би се одржала хомеостаза, организам активира различите системе одбране који, између осталог, укључују стварање антиоксидативних ензима, као што су супероксид дисмутаза (*SOD*), каталаза (*CAT*) и глутатион С-трансфераза (*GST*). Концентрација ових ензима у серуму може послужити као користан показатељ нивоа оксидативног стреса. Поред наведених ензима, значајан

показатељ нивоа оксидативног стреса је и концентрација малондиалдехида (*MDA*). Повећано стварање *ROS* може довести до појаве оксидативних измена ћелијских макромолекула попут липида и протеина као и нуклеинске киселине (ДНК). Овакво оштећење протеина може резултирати губитком биохемијске функције. Слично, дефекти ДНК као генетског материјала могу индуковати настанак мутација, грешака у репликацији, нестабилности генома уопште, као и смрти ћелија. Код многих паса симптоми обољења изостају или су слабо изражени, а и када дође до испољавања видљивих симптома, клиничка слика је неспецифична. Основни клинички симптоми су кашаљ, нетолеранција на појачану физичку активност, диспнеја, кахексија, ређе хемоптиза, а могу се појавити и гастроинтестиналне и неуролошке промене, као и изненадна смрт. Дијагноза кардиоваскуларне дирофилариозе се поставља на основу анамнестичких података, клиничког прегледа, хематолошких и биохемијских анализа, паразитолошких метода (модификовани Нотов тест (*Knott's test*) и брзи имунохроматографски тестови), као и применом радиографских и ехокардиографских анализа. Последњих година развијане су и различите молекуларне методе (PCR и *real-time qPCR*) које могу послужити у постављању прецизне дијагнозе. Како су код ове болести најпогођенији крвни судови и срце, као и код појаве других срчаних и васкуларних обољења, неколико биомаркера може да се користи у дијагностичке и прогностичке сврхе. Веома корисни биомаркери су *NT-proBNP* (Н-терминални про-Б-тип натриуретски пептид) и *D-dimer*, који се рутински користе у хуманој медицини, а имају велики потенцијал за употребу и у ветеринарској медицини. За откривање и анализу *NT-proBNP* користе се имуноензимски тестови (сендвич ELISA). *NT-proBNP* поседује исту осетљивост и специфичност као бета натриуретички пептид (*BNP*), а предност му је дужи биолошки полуживот. Анализа *NT-proBNP* је индикована код паса са симптомима респираторних поремећаја непознатог узрока, као и приликом процене тежине срчаних обољења. Тромбоза и тромбоемболија могу отежати плућну циркулацију код паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе. *D-dimer* је производ разградње фибрина, односно мали фрагмент протеина присутан у крви након што се крвни угрушак разгради у процесу фибринолизе. Доказано је повећање концентрације *D-dimera* код паса са плућном тромбоемболијом, која настаје као резултат разградње стабилизованог угрушка, и за разлику од других производа разградње, специфична је за активну коагулацију и фибринолизу. Терапија паса са потврђеном инфекцијом узрокованом нематодом *D. immitis* обухвата дуготрајну употребу лекова, смањење физичке активности паса, а у ретким ситуацијама и хируршку интервенцију. Тренутно се у клиничкој пракси у Републици Србији за терапију ове паразитозе примењује „*slow kill*“ протокол који подразумева употребу антибиотика доксициклина (група тетрациклина) у дози од 10 mg/kg т.м. на 12 сати, током 30 дана терапије; и апликацију ивермектина (група макроцикличних лактона) у дози од 6–12 µg/kg т.м. на 14 дана, током шест месеци. Након завршеног шестомесечног циклуса терапије врши се тестирање на присуство паразита у циљу провере ефикасности спроведене терапије. Терапија се прекида у случају негативног теста, док се у случају позитивног теста циклус терапије понавља.

Имајући у виду негативне ефекте паразита на организам домаћина и негативне ефекте терапије, као и све већу раширеност кардиопулмоналне дирофилариозе у Републици Србији, циљ ове докторске дисертације је био праћење тока инфекције анализом присуства и броја микрофиларија у крви паса, затим хематолошких и биохемијских параметара, концентрације биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer*, уз праћење нивоа параметара оксидативног стреса са степеном оштећења ДНК, ради процене утицаја паразита на домаћина и ефикасности примењене терапије код паса природно инфицираних нематодом *D. immitis*, пре, током и након примене терапијског протокола.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Инфекције животиња и људи узроковане паразитима могу изазвати тешке здравствене проблеме који се, неретко, могу завршити и смртним исходом. Описано је више од 16.000 паразитских врста из типа Nematoda (Hugot и сар., 2001) које представљају веома значајну претњу по здравље људи и животиња, укључујући и кућне љубимце широм света. Пси су прави домаћини бројних филарија, од којих неке могу инфицирати и друге сисаре (каниде, фелиде и људе) (Otranto и сар., 2013). Преваленција кардиопулмоналних нематодоза паса се значајно повећала у централној и севороисточној Европи (Dimri и сар., 2012; Fuehrer и сар., 2020; Genchi и Kramer, 2020), као и у Србији (Tasić-Otašević и сар., 2022), што је проузроковало и већу заинтересованост ветеринара за побољшањем дијагностичких и терапијских протокола у сузбијању ових обољења.

Један од важнијих ендопаразита кућних љубимаца, како са патоморфолошке и клиничке, тако и са економске стране, је *Dirofilaria immitis*, паразитска нематода која изазива кардиопулмоналну диروفилариозу, која носи колоквијални назив „болест срчаног црва“. Код паса, инфекција узрокована нематодом *D. immitis* може дуго бити неоткривена, међутим често доводи до испољавања клиничке слике различите тежине – од средње до тешке, укључујући на крају и кавални синдром, дисфункцију јетре и бубрега, срчану инсуфицијенцију и смрт (Nelson и сар., 2018). Терапија кардиопулмоналне диروفилариозе, без обзира који терапијски протокол је одабран, подразумева продужену употребу лекова и ограничење физичке активности инфицираних паса, и то у трајању од неколико месеци. Овако дугачак период терапије додатно отежава како емоционални, тако и економски статус власника. Процењује се да у Сједињеним Америчким Државама трошкови лечења паса оболелих од кардиопулмоналне диروفилариозе достижу чак 75 милиона америчких долара годишње (Self и сар., 2019), што значајно утиче на буџет власника паса.

2.1. Таксономски статус и морфолошке карактеристике адулта *Dirofilaria immitis*

Dirofilaria immitis (Leidy, 1856) припада царству Animalia, типу Nematoda, класи Secernentea, поткласи Spiruria, реду Spirurida, суперфамилији Filarioidea, фамилији Onchocercidae и роду *Dirofilaria*. Од паразита паса, у род *Dirofilaria* поред *D. immitis* спада и *Dirofilaria (Nochtiella) repens*, узрочник супкутане диروفилариозе, који представља глобалну претњу по здравље и добробит кућних љубимаца (Bowman и Atkins, 2009; Capelli и сар., 2018). Поред ове две врсте, у Хонг Конгу и Индији установљена је и нова врста која паразитира код паса означена као *Candidatus Dirofilaria hongkongensis* (Nazar и сар., 2017; Yilmaz и сар., 2019).

Адулти *D. immitis* су издужене нематоде сиво-беличасте боје. Тело је ваљкастог и кончастог изгледа, а сужава се ка танком и заобљеном цефаличном крају (Слика 1). Тело није сегментисано, а карактеристично је и одсуство кутикуларних попречних пруга које окружују дејриде (структуре које имају хеморецепторску односно сензорну улогу), отвор вулве женки и анус (Furtado и сар., 2010; Khanmohammadi и сар., 2020). На површини тела налазе се неупадљиве бочне линије, сачињене од дискретних дисконтинуираних гребена у предњем и задњем делу тела, као и две или три паралелне континуиране линије по целом телу (Furtado и сар., 2010). На предњој страни тела поседују округли усни отвор, без усана, окружен са четири пара малих цефаличних папила и једним паром бочних амфида које представљају хеморецепторни орган нематоде. У овој регији налазе се и два пара малих отвора који представљају остатке цефаличног цилијарног и централног канала. Ови канали имају улогу у

развоју незрелих одраслих стадијума нематодe. На усни отвор наставља се једњак који се састоји из два дела – кратког и пространог мишићног односно фарингеалног, и широког жлезданог дела са маргиналним жлезданим ћелијама. Задњи део једњака је благо заобљен, а нервни прстен је ширине око једне трећине уздужног пресека једњака (*Khanmohammadi* и сар., 2020). Мали бочни дејриди предстаљају кончасте структуре које су смештене између нервног прстена и споја црева и једњака. Основна карактеристика дејрида код *D. immitis* је да је њихова основа шира од врха и уздужно су конкавни (*Furtado* и сар., 2010; *Khanmohammadi* и сар., 2020).

Код мужјака, у спирално увијеном задњем делу тела налази се подручје вентралних ругоза са паралелно постављеним кутикуларним гребенима различите дужине. На задњем крају тела налази се отвор клоаке око кога се налазе парне или непарне преклоакалне јајасте папила, чији број се креће од једне до шест. Бочно од отвора клоаке налази се пар малих латералних папила, које се још називају и мала латерална крила. Каудално од клоаке налази се пет пари постклоакалних папила и то: један пар вентралних папила, један пар великих вендролатералних папила, два пара малих вендролатералних папила и један пар терминалних папила. Између последња два пара постклоакалних папила налази се пар вентралних фазмида који предстаљају једноћелијске жлездане структуре и имају сличну хеморецепторску функцију као и амфиде. Копулаторне органе мужјака чине две игличасте структуре различите дужине, које се називају спикеле. Велика шиљаста спикела лежи у каналу који гради мала затупљена спикела. Код *D. immitis* губернакулум недостаје за разлику од неких других врста нематода код којих предстаља кутикуларно задебљање на дорзалном зиду клоаке и има улогу да спикеле усмерава у вагину (*Furtado* и сар., 2010).

Код женки, у региону почетног дела црева, одмах иза места спајања једњака и црева, налази се вулва са попречно постављеним отвором елиптичног облика, који је ограничен финим уснама без папила. Задњи део тела је заобљен и на њему се налази закривљен анални отвор окренут каудално. Такође, на задњем делу тела налази се и пар латероventралних фазмида са кружним отворима (*Furtado* и сар., 2010).

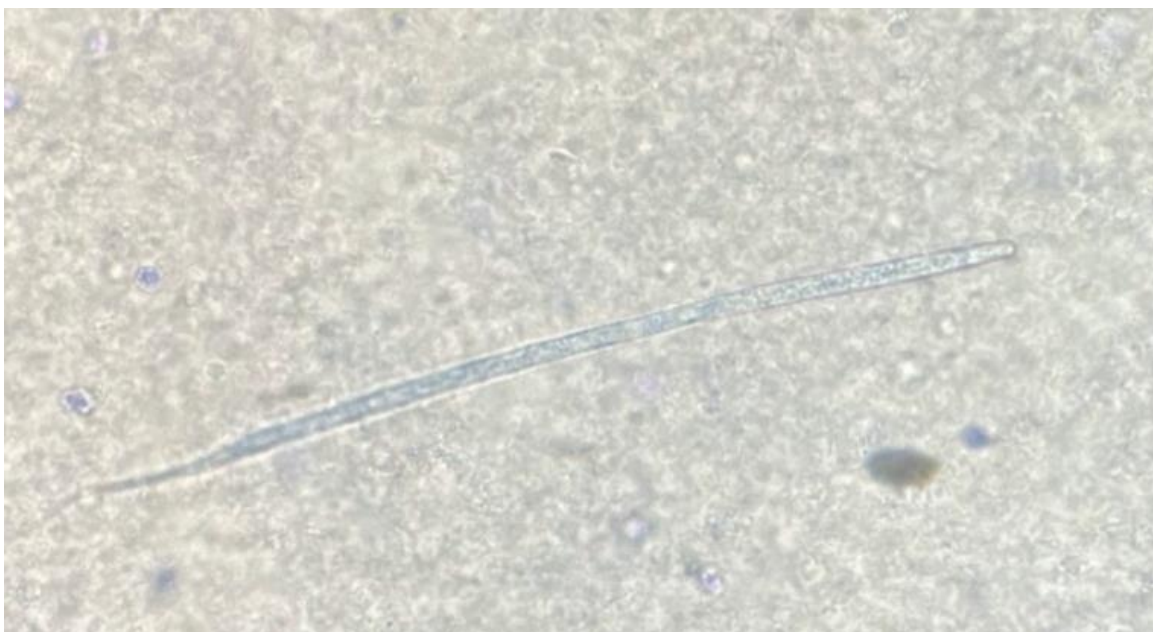


Слика 1. Адулти *Dirofilaria immitis*

2.2. Развојни циклус *Dirofilaria immitis*

Као и већина филарија, *D. immitis* је облигатни паразит који поседује сложен индиректан развојни циклус, који укључује више фаза развоја како код правих, тако и код прелазних домаћина – артроподних вектора. У развојном циклусу *D. immitis* поред адулта одвојених полова присутно је и пет стадијума ларвених облика (микрофиларија). Након парења женка *D. immitis* полаже ларве првог стадијума – L_1 (Слика 2). У тренутку узимања крвног оброка на инфицираној животињи, пријемчива женка комарца у свој дигестивни систем уноси ларве првог стадијума (L_1). Време потребно за развој од ларве првог стадијума L_1 (микрофиларија) до инфективног стадијума L_3 у дигестивном систему комарца зависи од температуре и релативне влажности ваздуха. На температури од 27 °C и при релативној влажности ваздуха од 80%, развој траје од 10–14 дана (*McCall*, 1981; *Fortin* и *Slocombe*, 1981; *Genchi* и сар., 2009). Након

уношења, ларве првог стадијума (L₁–микрофиларије) доспевају у средње црево комараца, где остају најдуже 24 сата, а затим мигрирају у ћелије Малпигијевих цевчица. Већ четвртог дана од момента уношења ларви у дигестивни тракт комарца, ларве постају чвршће и дужине су 220–240 μm и ширине 20–25 μm. Од петог дана развића код микрофиларија може се разликовати дигестивни систем који се састоји од усног отвора, једњака, црева и аналног отвора. Шестог до седмог дана од тренутка уношења ларви у тело комарца, ларве напуштају ћелије Малпигијевих цевчица, улазе у њихов лумен и у наредна два до три дана се пресвлаче у стадијум L₂. У том развојном стадијуму достижу дужину 500 μm и ширину 20 μm. Током следећа два до три дана ларве стадијума L₂ пресвлаче се у стадијум L₃. Један до два дана касније, ларва L₃ пробија зид Малпигијевих цевчица и мигрира преко хемоцела (телесне шупљине) до главе и усног апарата комарца, где постаје инфективна и у том тренутку дужине је 1100–1300 μm (Abraham, 1988; Cancrini и Kramer, 2001; Noack и сар., 2021). Инфективне ларве L₃ преносе се на правог домаћина када их инфицирана женка комарца, сисајући крв правог домаћина, преко свог усног апарата, избацује у кожу и поткожно ткиво (Venco и сар., 2011). Пресвлачење ларви од стадијума L₃ до L₄ почиње трећег, а најкасније до 12. дана од момента инфекције, док се пресвлачење ларве стадијума L₄ у адулта одвија 50–70. дана инфекције. Три дана након инфекције, већина ларви се налази у поткожном ткиву близу места убода. До 21. дана од почетка инфекције, ларве мигрирају у трбушну дупљу домаћина, а од 41. дана се могу наћи и у грудној дупљи (Manfredi и сар., 2007). Ларве у стадијуму L₃ и L₄ путују између мишића доспевајући до југуларних и других вена, када крећу ка плућним артеријама и срцу (Kume и Itagaki, 1955; Orihel, 1961; Kotani и Powers, 1982). У плућне артерије и срце стижу 70. дана од тренутка инфекције, а најкасније 120. дана. Први адулти у плућне артерије и срце доспевају 70–85. дана и дужине су 2–4 cm. Након што стигну до срца, женке повећавају своју дужину скоро десет пута, а полну зрелост достижу око 120. дана након инфекције. Препатентни период *D. immitis*, у поређењу са већином других паразитских нематода, је релативно дуг, те се прве микрофиларије код паса појављују у циркулацији најраније шест (McCall, 1981), али најчешће седам до девет месеци након инфекције (Manfredi и сар., 2007). Адултни стадијуми у правом домаћину могу да живе и преко седам година, док микрофиларије живе до две године (Venco и сар., 2011).



Слика 2. Микрофиларија (L₁) *Dirofilaria immitis* (модификовани Нотов тест, метиленско плаво)

2.3. Ендосимбиотска бактерија *Wolbachia pipientis*

Развој већине филарија, па тако и *D. immitis*, је у уској вези са присуством бактеријских ендосимбионата (Bandi и сар., 2001; McHaffie, 2012). За ембриогенезу, развој, пресвлачење и преживљавање *D. immitis* важну улогу има бактерија *Wolbachia pipientis* (Ferri и сар., 2011). *Wolbachia pipientis* је алфа протеобактерија која припада реду Rickettsiales и сматра се једином врстом у оквиру рода *Wolbachia*. На основу широке геномске разноликости различитих сојева ова врста је подељена у неколико супергрупа. Сојеви *W. pipientis* из супергрупа А, В, F и E до сада су пронађени код артропода, док се сојеви из супергрупа С и D углавном налазе код паразитских филарија (*Sanaei* и сар., 2021). Ове бактерије поседују способност да мењају физиолошке процесе својих домаћина кроз биосинтезу протеина, минерала и витамина неопходних за правилан развој својих домаћина. Резултати упоредне анализе генома филарија *Brugia malayi* и њихове ендосимбиотске бактерије *W. pipientis* показали су да је геном бактерије задужен за кодирање гена неопходних за биосинтезу пурина и пиримидина, као и хема и рибофлавина, док је у геному *Brugia malayi* одсутна већина ових гена (Ghedini и сар., 2007). Као и код филарије *Brugia malayi*, и у случају ендосимбиотског односа са *D. immitis* геном *W. pipientis* је задужена за кодирање ензима који недостају код *D. immitis*, а који су неопходни за анаболичке путеве као што је биосинтеза хема, пурина или пиримидина. У ендосимбиотском односу *W. pipientis* и *D. immitis* уочено је да бактерије носе гене за синтезу фолне киселине неопходне за правилан развој диофиларија (Godel и сар., 2012).

Поред важне улоге у развоју паразита, *W. pipientis* има важну улогу и у патогенези и имунском одговору организма на инфекцију са *D. immitis*. *Wolbachia pipientis* се у највећој концентрацији налази у јајницима женки *D. immitis* и у ембрионима у развоју. У организм домаћина се ове бактерије најчешће ослобађају када адултни или ларвени стадијуми паразита угину, било као резултат одбрамбене реакције домаћина или након примене адекватног антипаразитског протокола. Међутим, волбахије се могу постепено ослобађати из утеруса женки *D. immitis* током животног века женке у слободној форми, или су присутне у ларвама у тренутку њиховог ослобађања у циркулацију домаћина (Simón и сар., 2008). Присуство ове бактерије у циркулацији домаћина повезано је са регулацијом синтезе проинфламаторних цитокина, повећањем броја неутрофила у циркулацији и повећаним стварањем специфичних имуноглобулина (Kramer и сар., 2005). Утицај ове бактерије на развој *D. immitis*, као и на имунски одговор инфицираног домаћина навео је истраживаче да се посвете испитивањима нових лекова који делују против *Wolbachia*, а који би нашли примену како у терапији хуманих, тако и ветеринарских инфекција изазваних филаријама (Turner и сар., 2020).

2.4. Прелазни домаћини у развојном циклусу *Dirofilaria immitis*

Компетентност прелазних домаћина – комараца за *D. immitis* огледа се у њиховој способности да обезбеде успешан развој микрофиларија до инфективног ларвеног стадијума Л₃ и њихову каснију миграцију у усни апарат (*Ledesma* и *Harrington*, 2011), као и да их успешно пренесу на новог пријемчивог домаћина. Код више од 20 врста комараца доказано је присуство инфективних ларви стадијума Л₃ (*Bowman* и *Atkins*, 2009; *Ledesma* и *Harrington*, 2011), а претпоставља се да више од 70 врста комараца има развијену способност да омогући развој ларвених облика *D. immitis* до инфективног стадијума (*Morchón* и сар., 2012). Код девет врста комараца: *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. canadensis*, *Ae. sierrensis*, *Ae. trivitattus*, *Ae. vexans*, *Anopheles punctipennis*, *A. quadrimaculatus* и *Culex cuincuefasciatus*, комплетно је описан развојни циклус *D. immitis* и ове врсте су идентификоване као главни прелазни домаћини за овог паразита. У прилог томе говоре и израђене векторске и еколошке мапе које сугеришу да је

присуство комараца из родова *Culex*, *Aedes* и *Anopheles* повезано са већом преваленцијом *D. immitis* (Wang и сар., 2014). Фактори спољашње средине као што су влажност, вегетација и урбанизација, могу довести до веће бројности оних врста комараца које су компетентне за преношење овог паразита, а самим тим и веће преваленције ове паразитозе. Дакле, распрострањеност кардиопулмоналне диروفилариозе је у уској вези са биологијом и екологијом комараца. Као и многе филарије, *D. immitis* испољава циркадијални ритам који представља биолошки контролисан ритам у полагању ларви у оквиру једног дана. Ово знатно утиче на векторски капацитет, а самим тим и на распрострањеност овог паразита, јер се могућност за преношење повећава у периодима дана када је степен микрофиларијемije код домаћина највећи (Ionică и сар., 2017; Evans и сар., 2017).

У Европи код неколико врста комараца потврђено је присуство инфективних ларви *D. immitis*. *Culex pipiens* је доказан као вектор у Италији, Шпанији и Турској (Cancrini и сар., 2006; Morchón и сар., 2007; Yildirim и сар., 2011), док је врста *Culex theileri* потврђена као ефикасан вектор *D. immitis* на острву Мадеира у Португалији (Santa-Ana и сар., 2006) и на Канарским острвима у Шпанији (Morchón и сар., 2012). У Турској, поред врсте *C. pipiens*, векторски капацитет је потврђен и код комараца врсте *Aedes vexans* (Yildirim и сар., 2011), док је у Италији потврђено да *Ae. albopictus*, *Ae. caspius*, *Anopheles maculipennis* и *Coquillettidia richardii* могу подржати развој ларвених облика *D. immitis* (Cancrini и сар., 2003, 2006). Montarsi и сар. (2015) су идентификовали новог вектора за *D. immitis* и то комарца врсте *Aedes koreicus*. У Републици Србији као главни вектори за преношење *D. immitis* означени су *C. pipiens* и *Ae. vexans* (Kurucz и сар., 2016). Активност ових врста у Европи ограничена је на период пролећа и лета. Повећање појаве кардиопулмоналне диروفилариозе код паса и у областима које до скоро нису имале дијагностиковане случајеве ове паразитозе, вероватно је последица климатских промена погодних за опстанак и ширење компетентних вектора за *D. immitis* (Genchi и сар., 2011). У Азији најмање 16 врста комараца има улогу у преношењу паразита, међутим *C. pipiens pallens* и *C. tritaeniorhynchus* представљају главне векторе (Akaо, 2011). Поред ових врста, на Тајланду су у свом истраживању Tiawsirisup и Nithiuthai (2006) доказали присуство Л₃ ларви код комараца *Culex quinquefasciatus* и *Ae. aegypti*, чиме су потврдили њихов векторски капацитет за преношење *D. immitis*. Vinnie-Siow и сар. (2022) су експериментално доказали векторски потенцијал комарца врсте *Aedes togoi*.

У Јужној Америци доминантне врсте – вектори су *Aedes taeniorhynchus*, *Ae. scapularis* и *C. quinquefasciatus* (Wang и сар., 2014). Међутим, Labarthe и сар. (1998) као векторе наводе и врсте из рода *Ochlerotatus*. У истраживању Russell и Geary (1992) наводи се да у Аустралији векторски потенцијал за преношење узрочника кардиопулмоналне диروفилариозе има и комарац *Aedes notoscriptus*.

2.5. Епизоотиолошка ситуација у свету

Dirofilaria immitis је ендемска у свим југоисточним европским земљама као и у југоисточним деловима Азије, а све чешће се појављују случајеви у Африци (McCall и сар., 2008). На основу мета-анализе урађене од стране Anvari и сар. (2020), преваленција *D. immitis* код паса по континентима износи: 22,68% у Аустралији, 12,07% у Азији, 11,60% у Америци, 10,45% у Европи и 7,57% у Африци.

Повећана свест, како ветеринара, тако и власника о значају ове паразитозе и постојања све боље превентиве, у Европи су довели до смањења распрострањености овог узрочника у појединим регионима. На пример, у северној Италији преваленција кардиопулмоналне диروفилариозе код власничких паса се за три деценије смањила са више од 40% (Guerrero и сар., 1989) на око 8% паса (Genchi и сар., 2009), а већина ветеринара последњих година

пријављује од пет до 20 случајева годишње (*Genchi* и сар., 2019). На Канарским острвима у Шпанији установљено је смањење преваленције са 30% на 19% (*Montoya-Alonso* и сар., 2010). У Турској, укупна преваленција достиже 18% (*Köse* и *Erdoğan*, 2012). Нешто северније, у Пољској, спроведена истраживања показују да је преваленција *D. immitis* веома ниска, нешто мање од 1% (*Kramer* и сар., 2014). У Француској, подаци добијени из епизоотиолошког истраживања распрострањености *D. immitis* и других патогена које преносе вектори, спроведеног од стране *Pantchev* и сар. (2009), показују преваленцију *D. immitis* од 0,22% код здравих (асимптоматских) паса и 6,87% код паса са постављеном сумњом на кардиопулмоналну диروفилариозу.

Што се тиче регије Балканског полуострва, у Хрватској је утврђена такође ниска преваленција код паса која износи око 0,4% (*Jurković* и сар., 2019), док се у Грчкој креће између 0,7% и 25%, са чешћом појавом болести у северним областима (*Angelou* и сар., 2019; *Diakou* и сар., 2019). У Босни и Херцеговини преваленција *D. immitis* достиже скоро 2% (*Omeragić* и сар., 2021). Према најновијим истраживањима спроведеним од стране *Tasić-Otašević* и сар. (2022) у Северној Македонији установљена преваленција износи 8,75%. Епизоотиолошке студије у Румунији показују да се преваленција *D. immitis* код паса креће од 3,6 до 14% у зависности од подручја истраживања (*Mircean* и сар., 2012), док је код невластничких паса у југоисточном делу земље установљена преваленција од чак 42% (*Ciucă* и сар., 2016). Међутим, у Бугарској и поред постојања адекватних превентивних средстава преваленција ове паразитозе се са 15% у 2014. години (*Radev* и сар., 2016) повећала на 34% у 2017. години (*Iliev* и сар., 2017). Преваленција *D. immitis* код паса у Републици Србији навише је праћена у региону Војводине и у последњих десет година се кретала од 17% до 28% (*Tasić* и сар., 2012; *Gajić* и сар., 2016; *Marčić* и сар., 2020; *Potkonjak* и сар., 2020; *Savić* и сар., 2020). Као и у Бугарској, примећује се пораст преваленције и у Србији, имајући у виду да је према истраживању *Tasić* и сар. (2008) у поменутој регији преваленција *D. immitis* износила 7,2%. Тенденција раста раширености *D. immitis* је уочена и у Словачкој где је преваленција порасла на 64% у неким југозападним областима (*Mitegráková* и сар., 2018). У Русији, преваленција кардиопулмоналне диروفилариозе креће се од 3,6% у регији Москве, до 55% у јужним и централним областима, односно 43,6% на истоку земље (*Kartashev* и сар., 2011). Што се тиче Азије, у Ираку је пријављена ниска преваленција ове паразитозе од 1,3% (*Otranto* и сар., 2019), док у Ирану она износи од 5,4% до 24% у зависности од регије (*Khedri* и сар., 2014; *Vamorovat* и сар., 2017). У Кини се преваленција креће између 2% и 15% у североисточним областима земље, са евидентним трендом раста од 2009. године (*Liu* и сар., 2013). Са друге стране, епизоотиолошки подаци из Јапана показују да се преваленција смањила са 46%, колико је било на крају 20. века, на 23% у периоду од 2009. до 2011. године (*Oi* и сар., 2014). Сличну преваленцију пријављују и у истраживањима спроведеним у Јужној Кореји, где је у 2017. години износила 17% (*Suh* и сар., 2017). У Индији, преваленција ове болести се креће између 4,7% и 29,5% (*Borthakur* и сар., 2015), а на Тајланду код паса установљена је преваленција од 18% (*Boonyarakorn* и сар., 2008). Раширеност инфекције *D. immitis* на америчком континенту варира у зависности од регије. У областима са хладнијом климом, као што је Канада, преваленција је генерално знатно нижа, али може достићи и 8,4% као на пример у јужном Онтарију (*Klotins* и сар., 2000). У Сједињеним Америчким Државама, преваленција се углавном креће од 1% до 12%, али може достићи и преко 40% у високоендемским жариштима (*Lee* и сар., 2010). Од Мексика до Јужне Америке, преваленција је изузетно висока (*Dantas-Torres*, 2008; *Simón* и сар., 2012; *Bendas* и сар., 2017), као што је на пример 42% на обали Мексичког залива, 63,2% на Карибима и 74% у Аргентини (*Labarthe* и *Guerrero*, 2005; *Vezzani* и сар., 2006; *Simón* и сар., 2012). Информације о појави кардиопулмоналне диروفилариозе паса у Африци су оскудне, међутим, инфекције врстом *D. immitis* пријављене су у Тунису (*Rjeibi* и сар., 2017), Алжиру (*Tahir* и сар., 2017), Танзанији

(Mukendi и сар., 2016) и Мозамбику (Schwan и Durand, 2002) са преваленцијом у распону од 1,4% до 14,5%. На Мадагаскару ДНК *D. immitis*, као и микрофиларије пронађени су код дивљих лемура, мада у доступној литератури не постоје подаци за псе (Zohdy и сар., 2019). Један од главних фактора који је утицао на ширење инфекције изазване врстом *D. immitis* су климатске промене, које су изазвале повећање бројности популације комараца, скраћење екстринзичког развоја инфективних стадијума и продужење сезоне преношења. Други критични фактори су омогућавање лакшег и чешћег кретања кућних љубимаца широм Европске Уније (Trotz-Williams и Trees, 2003), ширење нових, инвазивних, компетентних врста комараца као што су *Ae. albopictus* и *Ae. koreicus* (Montarsi и сар., 2015), присуство невласничких паса са високом степеном инфизираности, као и недовољна примена превентивних мера код власничких паса.

2.6. Патогенеза кардиопулмоналне диروفилариозе паса

Главне патоморфолошке и патофизиолошке промене које настају током инфекције изазване врстом *D. immitis* углавном су последица присуства одраслих паразита у плућним артеријама. Међутим, не може се изоставити негативан утицај ларвених облика (микрофиларија) током кретања кроз васкуларни систем домаћина. Тежина испољене клиничке слике зависи од неколико фактора, укључујући број одраслих паразита, време трајања инфекције, индивидуалне особине и реакцију домаћина на присуство паразита. Контакт између паразита и зида плућних артерија је од суштинске важности, јер представља почетни корак у развоју васкуларних лезија (McCall и сар., 2008; Simón и сар., 2012).

Прве патоморфолошке промене почињу неколико дана након што незрели адулти доспеју у плућне артерије. Промене на зидовима крвних судова почињу отицањем ендотелних ћелија, проширењем међућелијских веза, што за собом повлачи повећање пропустљивости ендотела и настанак периаартеријских едема (Kaiser и сар. 1989; Venco и Vezzoni, 2001). Адулти *D. immitis* паразитирањем у плућним артеријама изазивају реактивне лезије на ендотелу, које затим стимулишу пролиферацију *tunica intima* слоја зида крвних судова, а што за последицу има смањење васкуларне усклађености и величине лумена крвних судова (Kaiser и сар. 1989; Venco и Vezzoni, 2001). Као резултат директног деловања адулта *D. immitis* настаје карактеристична пролиферација зида плућних артерија (Calvert и Rawlings, 1985). Различити трофички фактори стимулишу даљу миграцију и пролиферацију ћелија глатких мишића унутар слојева *tunica media* и *tunica intima* крвних судова (Cohen, 1979; Schafer и Handin, 1979; Goldberg и сар., 1980). Ове пролиферативне промене интима јављају се три до четири недеље након контакта васкуларног ендотела са адултима *D. immitis*, што узрокује сужење лумена мањих плућних артерија и даље оштећење ендотела крвних судова (Schaub и Rawlings, 1980). Ова оштећења ендотела поспешују тромбозу, као и реакцију периваскуларног ткива и периаартеријски едем. Међутим, због постојања екстензивне колатералне циркулације у плућима, инфаркт плућа се ретко јавља. Оштећена површина плућних артерија олакшава излазак албумина, плазме и крвних ћелија у периваскуларни простор. Хипоксична вазоконстрикција, такође, може да игра улогу у васкуларним променама које повећавају плућни васкуларни отпор и последично изазивају плућну хипертензију.

Хипоксија се може јавити у деловима плућа где плућни инфилтрати, или плућна тромбоемболија, узрокују неусклађеност вентилације односно перфузије. Вазоконстрикција плућа може бити погоршана повећаном производњом ендотелина-1 или вазоконстриктивним супстанцама које ослобађају адулти *D. immitis* (Uchida и Saida, 2005). Повећање запремине плућног крвотока узроковано повећаном физичком активношћу може погоршати патолошке процесе у циркулацији плућа. Поред промена на крвним судовима, као последица присуства адулта *D. immitis*, јављају се и промене у паренхиму плућа које настају након васкуларних

промена. Течност и протеини који дифундују преко оштећених васкуларних зидова изазивају едем и запаљење плућног паренхима (*Simón* и сар., 2012). Интерстицијални и алвеоларни инфилтрати могу постати видљиви на радиографији (*Brawner* и сар., 1998), док се код неких животиња развија делимична консолидација плућа.

Фрагменти угинулих адулта *D. immitis*, такође, могу да стимулишу појачани инфламаторни одговор домаћина и изазивају емболију и интензивнију инфламаторну реакцију, која на крају доводи до фиброзе плућног паренхима, а самим тим и погоршавања патолошких промена у плућима. Иако се сматра да је директно деловање паразита на организам домаћина од примарног значаја у патогенези, интеракција домаћин–паразит може бити важнија од броја адулта у развоју клиничких знакова. Међутим, велико оптерећење адултима генерално је повезано са тешком клиничком сликом кардиопулмоналне диروفилариозе (*Nelson*, 2021).

Интрацелуларна бактерија *Wolbachia pipientis*, као ендосимбионт *D. immitis*, такође може значајно утицати на патогенезу болести (*Ferri* и сар., 2011; *Taylor* и сар., 2013). Многи истраживачи су усмерили своје интересовања и истраживања ка утицају *W. pipientis* на инфламаторни одговор домаћина при инфекцији изазваној филаријама и доказали да оне могу изазвати проинфламаторне одговоре и у *in vitro* (*Bazzocchi* и сар., 2003; *Brattig* и сар., 2004) и у *in vivo* условима (*Saint Andre* и сар., 2002). Утицај на патогенезу болести укључује и имунски одговор домаћина на бактеријске ендотоксине и главни површински протеин *W. pipientis* (*Wolbachia Surface Protein – WSP*). Сматра се да овај протеин делује на имунски систем домаћина и доприноси запаљењу плућа и бубрега активацијом процеса инфилтрације полиморфонуклеарних ћелија у ткивима ових органа (*Bazzocchi* и сар., 2003).

Како и назив болести говори, поред плућа, битно место у патогенези овог обољења заузима и срце. Наиме, дилатација и концентрична хипертрофија десне коморе најчешће се развијају као одговор на хронично повећање систолног притиска, док дуготрајна плућна хипертензија може довести до слабљења миокарда десне коморе, повећаног дијастолног притиска и знакова конгестивне слабости десне стране срца (*Atkins* и сар., 1988; *Furlanello* и сар., 1998). Смањењем контрактилне способност десне коморе услед конгестивне инсуфицијенције опада и минутни волумен срца. Ово је веома битно у патогенези и клиничкој манифестацији болести, јер се и током мање физичке активности потреба за минутним волуменом повећава, што доводи до пораста отпора према контракцијама ионако ослабљеног миокарда, а последично резултира увећањем десне преткоморе и коморе (*McCall* и сар., 2008). Штавише, плућна тромбоемболија, било спонтана или настала као последица адултицидне терапије, може погоршати плућну хипертензију и знакове слабости десне стране срца. Аберантна системска миграција одраслих облика, која се повремено јавља, може узроковати појаву емболија крвних судова мозга и ока, али и других системских артерија (*Simón* и сар., 2012).

Спорадично су описани случајеви настали као последица тромбоемболије крвних судова задњих екстремитета праћени знаковима хромости, парестезије и исхемијске некрозе (*Antinoff*, 2001). *Dirofilaria immitis* изазива и тешку дисфункцију бубрега. Мембрански гломерулонефритис је описан као резултат промена у базалној мембрани гломерула током болести срчаног црва. Гломерулонефритис је повезан са формирањем имунских комплекса подстакнутих антигенима из микрофиларија и одраслих стадијума, али и механичким деловањем микрофиларија које погоршавају упално стање. Бубрежне лезије могу напредовати до тешке нефрозе изазване протеинуријом са бубрежном инсуфицијенцијом и азотемијом (*Paes-de-Almeida* и сар., 2003; *McCall* и сар., 2008).

2.7. Оксидативни стрес и оштећење молекула ДНК домаћина

Термин „оксидативни стрес“ односи се на поремећај равнотеже између производње оксиданаса и антиоксидативне одбране организма. Може бити резултат превелике синтезе реактивних врста кисеоника (*ROS*), смањења количине антиоксиданаса, или њихове комбинације. Реактивне врсте кисеоника се производе ендогено и егзогено током физиолошких метаболичких процеса биосинтезе, биоразградње и биотрансформације и имају бројне физиолошке улоге, као што су: учешће у ћелијској сигнализацији, одбрана од инфективних агенаса и регулација експресије гена (*Valko* и сар., 2007; *Gabriel* и сар., 2019). Како би се ограничила штета узрокована прекомерном синтезом реактивних врста кисеоника, развијени су антиоксидативни одбрамбени механизми аеробних организама (*Sies* и сар., 2017). У оквиру ових механизма учествују ензими као што су: супероксид дисмутаза (*SOD*), каталаза (*CAT*) и ензими глутатион редокс циклуса, као и неензимске супстанце: глутатион (*GSH*), витамин Ц и витамин Е.

У *ROS* спадају: супероксидни радикал ($O_2^{\bullet-}$), хидроксилни радикал (OH^{\bullet}) и азотмоноксид (NO^{\bullet}). Интересовање за *ROS* повећано је након открића важних улога које имају у развоју многих патолошких стања организма. Осим тога, једињења као што су пероксинитрит, синглетни кисеоник, водоник пероксид (H_2O_2), озон, и хипохлораста киселина могу бити врло реактивна. Сматра се да током различитих патолошких процеса, *ROS* играју важну улогу у оштећењу ткива (*Nohl* и сар., 1996). Такође, и паразитске инфекције могу бити извор оксидативног стреса, с обзиром на то да се *ROS* стварају као одговор на присуство било ког патогена (*Almeida* и сар., 2013). Значај оксидативног стреса огледа се и у утицају на динамику тока паразитских инфекција, заузимајући значајно место у одбрани домаћина од ових патогена (*Çenesiz*, 2020). Истовремено, паразит користи сложене одбрамбене механизме и развија отпорност на утицаје реактивних врста кисеоника (*ROS*), са циљем да одржи свој опстанак у организму домаћина (*Szewczyk-Golec* и сар., 2021). Неки паразити су развили софистициране стратегије за утицај на имунски одговор домаћина, укључујући и модулацију стварања оксидативног стреса (*Rossi* и *Fasel*, 2018). Паразити могу и сами синтетисати антиоксидативне ензиме који помажу да се заштите од деловања реактивних врста кисеоника синтетисаних од стране домаћина. Ова модулација може нарушити равнотежу у антиоксидативном одбрамбеном систему домаћина, промовишући оксидативни стрес и нарушавајући ефикасност имунског одговора (*Maldonado* и сар., 2020). Даље, оксидативни стрес настао током инфекције хелминтима може имати утицај на имунски одговор домаћина, што може довести до измењених функција имунских ћелија и утицати на равнотежу између проинфламаторних и антиинфламаторних сигнала. Ова модулација имунског одговора доприноси сложеној интеракцији између домаћина и хелминта, утичући на ток и исход инфекције (*Motran* и сар., 2018).

Штавише, паразитске инфекције активирају различите инфламаторне ћелије које изазивају активацију *ROS* у процесу борбе против интрацелуларних и екстрацелуларних паразита (*Pawłowska* и сар., 2023). Поред заштитне улоге, ови реактивни молекули не могу да разликују ћелије домаћина и патогена (*Sorci* и *Faivre*, 2009), те могу довести до структурних оштећења важних биомолекула као што су липиди, протеини, а на крају и молекули ДНК (*Trachootham* и сар., 2008). Пероксидација липида ћелијске мембране индукована прекомерном количином *ROS* доводи до њеног оштећења и губитка селективне пропустљивости. Оштећења протеина доводе до губитка њихове биохемијске функције, а оксидативна оштећења ДНК могу довести до појаве мутација, нестабилности геномске, а на крају и смрти ћелије (*Klaunig* и сар., 2010; *Gaschler* и *Stockwell*, 2017).

Када је реч о паразитским инфекцијама код паса, ниво оксидативног стреса је највише испитиван код протозоарних инфекција. *Leishmania infantum* је паразит који се преноси преко убода хематофагних артроподних вектора, а затим бива фагоцитован од стране макрофага. Када макрофаги фагоцитују паразите долази до потенцирања синтезе ROS као што су супероксидни анјон ($O_2^{\bullet-}$), водоник пероксид (H_2O_2), хидроксилни радикал (OH^{\bullet}) и азот оксид (NO^{\bullet}) који учествују одбрамбеним механизмима домаћина (*Serarslan* и сар., 2005). У прилог овом истраживању говоре и резултати *Almeida* и сар. (2013) који показују да се оксидативни стрес јавља у оба стадијума лишманиозе са разликама у интензитету и нивоима параметара запаљења. Такође, инфекција бактеријом *Erlichia canis* изазива оксидативни стрес који игра битну улогу у патофизиологији овог обољења (*Da Silva* и сар., 2013), а посебно током акутне фазе болести (*Bottari* и сар., 2016). Утврђено је да концентрација малондиалдехида, једног од маркера оксидативног стреса, расте како напредује инфекција узрокована протозоом *Trypanosoma brucei* (*Eze* и сар., 2008). *França* и сар. (2012) указују на то да пси експериментално инфицирани протозоом крви *Rangelia vitalii*, развијају стање неравнотеже у ситнези прооксиданаса и антиоксиданаса, као и да ове промене могу бити укључене у патофизиологији болести.

Имајући у виду да су хелминти током свог развоја у правом домаћину непрестано изложени ендогеним оксидативним процесима изазваним имунским системом, може се закључити да постоји веза између хелминтских инфекција и оксидативног стреса, што су *Pugliese* и сар. (2022) у свом истраживању и потврдили. Постоји неколико студија које указују на значајне промене у равнотежи оксиданаса и антиоксиданаса током инфекције врстом *D. immitis* (*Dimri* и сар., 2012; *Rath* и сар., 2014). Међутим, не постоје подаци како се крећу нивои параметара антиоксидативне заштите током инфекције и током примене антипаразитске терапије.

Упркос термичкој стабилности, ДНК домаћина спонтано реагује како на ендогене тако и на егзогене агенсе и веома је подложна оштећењу (*Chatterjee* и *Walker*, 2017). Оксидативни стрес је један од главних фактора који је одговоран за оштећења ДНК када може доћи до настанка мутација, грешака приликом репликација, нестабилности генома и ћелијске смрти (*Radaković* и сар., 2013). Међутим, током инфекције, поред изазивања оксидативног стреса, паразити непрестано излучују различите екскреторно-секреторне метаболичке продукте у међућелијски простор домаћина, који играју кључну улогу у интеракцијама паразита и домаћина. Ови продукти могу бити веома имуногени и токсични, а њихови ефекти се још више појачавају кроз интеракције са другим молекулима, као што су на пример ROS. Познато је да екскреторно-секреторни продукти хелмината потенцирају пролиферацију и сузбијају апоптозу малигних или абнормалних ћелија, и индукују промене ДНК у целом геному (*Sripa* и сар., 2012; *Chelomina*, 2018; *Sagonas* и сар., 2020). Сазревање паразита, као и његово кретање кроз циркулацију и ткива домаћина, изазива ослобађање ових продуката који између осталих укључују и протеазе, чија улога није само у потенцирању вируленције паразита, већ учествују и у оштећењу ткива домаћина (*Robinson* и сар., 2009). Такође, у свом животном циклусу паразити пролазе кроз различите развојне стадијуме који доводе до појаве упале и фиброзе ендотела крвних судова, а могу чак довести до различитих трансформација ћелија. Верује се да инфламаторна подручја окружена ћелијама урођеног имунског система, као и реактивним врстама кисеоника имају мутагене ефекте који могу довести до структурних оштећења молекула ДНК (*Rajković* и сар., 2023). Имајући у виду дужину трајања инфекција изазваних хелминтима, хронична инфламација је итекако честа појава, а познато је да хронична изложеност инфективним агенсима или токсичним супстанцама готово сигурно доводи до оштећења ДНК у ћелијама домаћина (*Mycroft* и *Hiatt*, 1990; *Awara* и сар., 1998; *Holzmueller* и сар., 2002). Са друге стране, одржавање генског интегритета од суштинског је значаја за правилно функционисање ћелија, а такође, је од виталног значаја за успешан пренос генских

информација током ћелијске деобе. Еукариотске ћелије су развиле урођен одговор на оштећења ДНК који укључује различите путеве поправке који се покрећу зависно од типа лезија на молекулу ДНК (*Carusillo* и *Mussolino*, 2020). Уклањање прекомерно створених слободних радикала представља један од механизма одбране и одвија се покретањем одбрамбеног система који укључује синтезу антиоксиданаса (*Dröge*, 2002; *Carusillo* и *Mussolino*, 2020). Поред тога, постоји више путева поправки аномалија ДНК. Најважнији механизам поправке оштећења ДНК узроковане оксидативним стресом код еукариота је систем поправке исецањем нуклеотида, који је еволутивно очуван процес и има главну функцију у одржавању интегритета гена (*Mandavilli* и сар., 2002; *Hegde* и сар., 2008).

Иако генотоксични потенцијал *D. immitis* није истражен до сада, постоје многе студије о генотоксичном дејству других паразита. На пример, у студији *Kocyigit* и сар. (2005), оксидативни стрес индукује оштећење молекула ДНК код људи са кожном формом лишманиозе. Поред тога, доказано је и да инфекција узрокована протозоом *Trypanosoma evansi* код пацова може повећати ниво оштећења ДНК у леукоцитима, као и у ћелијама јетре, срца и слезине (*Baldissera* и сар., 2016). Слично томе, да паразитске инфекције могу изазвати оштећење ДНК молекула потврђују и резултати добијени од стране *Atwa* и сар. (2020) који су показали да инфекција изазвана кокцидијом *Cryptosporidium parvum* изазива веће оштећење ДНК у леукоцитима имунокомпромитованих мишева у поређењу са леукоцитима здравих мишева. Такође, *Chelomina* и сар. (2021) су доказали да инфекција метиљем *Paragonimus heterotremus* има генотоксични потенцијал код лабораторијских пацова, највероватније настао као последица оксидативног стреса и инфламаторног одговора домаћина који резултира оксидативним оштећењем молекула ДНК.

Имајући у виду све побројане ефекте паразита на индукцију оштећења ДНК, многе студије су испитивале значај примењене терапије на редукцију оштећења ДНК, али и других запаљенских маркера услед постепене елиминације паразита. Употреба празиквантела антихелминтика широког спектра у лечењу инфекције узроковане метиљем *Opisthorchis viverrini* код хрчака, смањила је запаљење жучних путева, а самим тим и степен оксидативног оштећења ДНК измереног након примењене терапије (*Pinlaor* и сар., 2006). У истраживањима које су спровели *Dechakhamphu* и сар. (2008) и *Thanan* и сар. (2008), након два месеца лечења празиквантелом, оштећење ДНК у леукоцитима и инфламаторни индикатори у плазми су се смањили на нормалне нивое код људи инфицираних метиљима врсте *Opisthorchis viverrini*. *El-Sayed* и *Eman* (2014) су открили да је терапија токсоплазмозе мишева сулфадиазином и пириметаминим, резултирала смањењем свих измерених параметара комет теста у организмима домаћина. Резултати поправке ДНК у студији *Florentino* и сар. (2021), у којој су истраживани одговори ћелија домаћина на нивоу генома током инфекције изазване протозоом *Trypanosoma cruzi* на *HeLa* ћелијама и *AC16* ћелијској линији миокарда људи, открили су многа места осетљива на оксидоване базе ДНК у генском материјалу ћелије домаћина у раним стадијумима инфекције. Штавише, примећено је значајно смањење момента репа комета (*tail moment*, *TM*) након почетног оштећења ДНК, што сугерише да је покренут процес поправке ДНК. Што се тиче кардиопулмоналне диروفилариозе, у студији *Méndez* и сар. (2015), примећено је значајно смањење нивоа *CRP* након третмана доксициклином и ивермектином, вероватно због смањења васкуларне инфламације изазване елиминацијом бактерије *W. pipientis* ендосимбионта *D. immitis*. *Yoon* и сар. (2017) су открили да је терапија „slow kill“ методом (ивермектин и доксициклин) на крају студије смањила нивое инфламаторних биомаркера у серуму код свих испитиваних паса. Све горе наведене студије сугеришу да су имунски одговор домаћина и оксидативни стрес главни узроци оштећења ДНК током паразитских инфекција. Током инфламаторног стања, координација и равнотежа механизма поправке ДНК је од суштинског значаја како би се обезбедила ефикасна и тачна поправка мутагених оштећења (*Kau* и сар.,

2019). Током било које врсте запаљенске реакције ослобађају се релативно високе концентрације H_2O_2 , што доводи до смањене активности антиоксидативних ензима. У том стању настаје низ штетних ефеката на ДНК услед акумулације H_2O_2 (Đelić и сар., 2022; Rajković и сар., 2023). Међутим, познато је да је запаљенска реакција организма самоограничавајућа и обично јењава након уклањања патогена и завршетка поправке ткива (Palmai-Pallag и Bachrati, 2014). Отпорност ћелија на индуковано оштећење ДНК, такође, зависи од ефикасности свих путева поправке ДНК, односно механизма да се заобиђу места непоправљеног оштећења ДНК (Walmacq и сар., 2012). Jaiswal и сар. (2000) су показали да инфламаторни цитокини могу утицати на активност поправке ДНК. Thamm и сар. (2013) су доказали да лимфоцити златних ретривера са лимфомом имају већу осетљивост на *ex vivo* оштећења ДНК у односу на лимфоците здравих паса. Такође, Đelić и сар. (2019) су доказали да ћелије периферне крви преддијабетичара и дијабетичара реагују знатно јаче на мутаген од оних из контролне групе сачињене од здравих људи, док и сама гојазност може повећати ризик од оштећења ДНК.

2.8. Клиничка слика кардиопулмоналне диروفилариозе паса

У клиничкој пракси код паса није установљена посебна повезаност узраста, или расе паса са степеном обољења од кардиоваскуларне диروفилариозе (Rajamanickam и сар., 1985). Иако већина инфицираних паса спада у категорију старости између четири и девет година, болест се дијагностикује и код паса млађих од једне године, али старијих од шест месеци, као и код геријатријских животиња. Пси великих раса и они који живе углавном на отвореном изложени су много већем ризику од инфекције него пси малих раса и пси који живе у затвореном простору (Knight, 2004; Vieira и сар., 2014). Већина инфицираних паса месецима или годинама не испољава никакве симптоме болести (Simón и сар., 2012). Клиничка слика може се кретати од асимптоматске до изразито тешке која се неретко може завршити и смртним исходом. Пси са израженом клиничком сликом болести испољавају симптоме обољења респираторног и кариоваскуларног система. У историји болести уочавају се замор и при мањој физичкој активности, респираторне потешкоће, кашаљ, синкопа, мршављење и асцитес (McCall и сар., 2008; Bowman и Atkins, 2009). У клиничкој слици паса током ране фазе болести често су присутни повремени кашаљ, замор, и благи губитак телесне масе. Међутим, тешка клиничка слика је повезана са лошим физичким стањем, тахипнејом или диспнејом, дистензијом и пулсацијом југуларне вене, асцитесом или другим знаковима слабости десне стране срца (Atkins, 2010). Најчешћи знаци пнеумонитиса су кашаљ и појачани шумови плућа. Аускултацијом плућа могу се регистровати абнормални респираторни звукови као што су ронхи и крепитације. Крепитације код пацијената оболелих од кардиопулмоналне диروفилариозе (без знакова обољења леве стране срца) су последица еозинофилне инфламације или фиброзе плућног паренхима. Хемоптиза се обично уочава код повреда алвеоларних капилара или евентуално парабронхијалних артерија, које могу бити последица оштећења при контакту са интимом крвног суда, или услед постојања плућне хипертензије. Интерстицијски инфилтрат у плућима код паса инфицираних срчаним црвима који имају кашаљ или диспнеју потврђује дијагнозу пнеумонитиса (Ames и Atkins, 2020). Код тешког облика кардиопулмоналне диروفилариозе са плућном хипертензијом, клиничким прегледом могу се открити поцепани S2 срчани тон, шум на десној страни срца услед трикуспидалне инсуфицијенције, ејекциони шум на бази срца и срчани галоп (Atkins, 1991). Дистензија југуларне вене, увећање јетре и слезине, као и асцитес могу бити присутни код пацијената са конгестивном инсуфицијенцијом десне стране срца. Електрокардиографски се ретко могу уочити срчане аритмије и поремећаји у проводљивости срчаних импулса код паса без симптома или са лакоом клиничком сликом, док се у тешким случајевима могу јавити превремени атријални и вентрикуларни комплекси.

Радиографски се уочавају промене које укључују повећање десне коморе срца, повећани васкуларни образац сегмената главне плућне артерије, као и других плућних артерија (*Losonsky* и сар., 1983; *Sevimli* и сар., 2007; *Maerz*, 2020). Типични радиографски налази кардиопулмоналне диروفилариозе су увећане, вијугаве и често скраћене периферне гране плућних артерија, посебно у дијафрагматским режњевима (*Guerrero* и сар., 2004; *Litster* и сар., 2005).

У паренхиму плућа, радиографски се могу уочити инфилтрати који могу бити интерстицијални или алвеоларни, а најизраженији су у каудалним плућним режњевима, затим чворићи, најчешће као последица еозинофилне грануломатозе плућа, увећани лимфни чворови и плеурални излив (*Atkins*, 2005). Лабораторијски, инфекција нематодом *D. immitis* може се манифестовати благом нерегенеративном анемијом, неутрофилијом, еозинофилијом, базофилијом и тромбоцитопенијом (*Calvert* и *Rawlings*, 1988; *Niwetpathomwat* и сар., 2007). Повишене вредности ензима јетре, азотемија и хипербилирубинемија могу се приметити код пацијената са тешким обликом болести. Анализом урина, може се приметити протеинурија и то најчешће албуминурија (*Niwetpathomwat* и сар., 2007). Зависно од степена испољених симптома према Америчком удружењу за борбу против болести срчаног црва (*American Heartworm Society – AHS Guidelines* 2020), кардиопулмонална диروفилариоза се класификује у четири стадијума. У први стадијум кардиопулмоналне диروفилариозе класификују се пси позитивни на једном од дијагностичких тестова, који клинички не испољавају знаке болести. У други стадијум убрајају се пси код којих се од клиничких знакова уочавају кашаљ, нетолеранција на појачану физичку активност, као и постојање патолошког налаза при аускултацији плућа. Пси који поред клиничких знакова описаних у другом стадијуму кардиопулмоналне диروفилариозе имају и хепатомегалију, синкопу, аускултационо промењене срчане тонове, као и асцитес, класификују се у трећи стадијум ове болести. У четврти стадијум се класификују пси који испољавају знакове синдрома вене кафе.

2.9. Методе које се користе у дијагностици и прогнози кардиопулмоналне диروفилариозе

Имајући у виду наведену етиопатогенезу овог обољења код паса значај у постављању дијагнозе има правилно узета анамнеза од власника животиње као и познавање епизоотиолошке ситуације на датом подручју. Протокол дијагностике кардиопулмоналне диروفилариозе код паса подразумева употребу различитих метода за испитивање присуства антигена утеруса женке и микрофиларија у крви, промена параметара биохемије, црвене и беле крвне лозе, тромбоцита (*Niwetpathomwat* и сар., 2007; *Boswood*, 2009), као и морфолошких промена захваћених органа употребом рендгенске и ултразвучне дијагностике (*Tudor* и сар., 2014; *Yevstafieva* и сар., 2022).

2.9.1. Методе детекције *Dirofilaria immitis* код паса

За доказивање присуства различитих развојних стадијума овог паразита у организму домаћина постоји више тестова који се више или мање користе у свакодневној клиничкој пракси (*Little* и сар., 2018). Америчко удружење за борбу против болести срчаног црва препоручује да се сви пси, укључујући и оне код којих се примењује превентивна терапија, тестирају једном годишње и то на присуство микрофиларија и антигена утеруса женке *D. immitis* (*Nelson* и сар., 2018; *AHS guidelines*, 2020).

2.9.1.1. Имунохроматографски тестови

За детектовање антигена женке *D. immitis* доступно је неколико серолошких тестова као што су имуноензимски и имунохроматографски тестови са осетљивошћу од 98% до 100% (Carmichael и сар., 2017; Henry и сар., 2018; Little и сар., 2018). Међутим, ови тестови имају и ограничења заснована на сложеном животном циклусу паразита, имунским реакцијама домаћина, као и индивидуалним варијацијама у осетљивости и специфичности теста (Starkey и сар., 2020). Такође, иако је теоретски потребна најмање једна зрела женка *D. immitis*, постоји могућност да инфекције са веома малим бројем паразита остану неоткривене овим тестовима, што је повезано са слабом осетљивошћу тестова. Сложени развојни циклус паразита, у коме је потребно најмање шест месеци да женке сазру, представља ограничавајући фактор за детекцију антигена у првим месецима инфекције (McCall и сар., 2008). Такође, код неких паса лажно негативни резултати се могу јавити и због блокирања антигена услед формирања антиген–антитело комплекса (Little и сар., 2018). Како би се избегла појава лажно негативних резултата и постигла задовољавајућа осетљивост теста, понекад је потребно узорке пре тестирања адекватно обрадити. Штавише, показало се да се загревањем узорка побољшава детекција антигена и код експериментално и код природно инфицираних паса нематодом *D. immitis* и то ослобађањем антигена утеруса женке претходно блокираног везаним антителима домаћина у комплекс антиген–антитело (Beall и сар., 2017).

2.9.1.2. Паразитолошке методе

Ларвени стадијуми односно микрофиларије могу се детектовати различитим паразитолошким методама, али у свакодневној клиничкој пракси најчешће се користе директни крвни размаз и модификовани Нотов тест. Директни крвни размаз је лака и брза метода код које се кап крви нанесе на предметно стакло, затим прекрије покровним стаклом и приступи се микроскопирању. Недостатак ове методе је што се код узорака са малим бројем микрофиларија, исте могу пропустити приликом микроскопирања и веома је тешко спровести морфометријску идентификацију, па се методе концентрације преферирају због њихове веће осетљивости (Evans и сар., 2019). Модификовани Нотов тест је метода која је лака и јефтина за употребу и погодна за концентрисање, детекцију, и морфометријску идентификацију циркулишућих микрофиларија различитих врста паразита (Knott, 1939, Genchi и сар., 2021). Техника се базира на разблаживању венске крви са додатком антикоагуланса са различитим реагенсима као што су формалдехид, сирћетна киселина, глацијална киселина, сапонини, али и у дестилованој води. Genchi и сар. (2021) су показали да се коришћењем дестиловане воде у модификованом Нотовом тесту се очувају морфолошке карактеристике и димензије микрофиларија *D. immitis*, што је случај и са формалином, док су дужине и ширине микрофиларија значајно смањене коришћењем осталих киселина, највероватније због израженије дехидратације. Предност коришћења дестиловане воде је и у томе што је доказано да формалин поседује мутагена и генотоксична својства (Bernardini et al., 2020), те га је и Међународна агенција за истраживање рака (International Agency for Research on Cancer – IARC) 2012. године класификовала као канцероген (IARC, 2012; Genchi и сар., 2021).

У диференцијалној дијагнози од изузетног значаја је морфолошка идентификација филарија из родова *Dirofilaria* и *Acanthocheilonema* (Magnis и сар., 2013), посебно на епизотиолошким подручјима где се јављају обе инфекције код паса. Идентификација микрофиларија је важна и због потенцијалних мешовитих инфекција, као и могуће унакрсне антигена *D. immitis* са другим филаријама као што су *D. repens*, *Angiostrongylus vasorum* и

Spirocerca lupi (Schnyder и Deplazes, 2012; Aroch и сар., 2015; Panarese и сар., 2020) која се може јавити у хроматографским тестовима. Постојање циркадијалног ритма микрофиларија *D. immitis* може утицати на дијагностичку поузданост модификованог Нотовог теста и директног крвног размаза. Истрживања спроведена од стране Ionică и сар. (2017) показала су да микрофиларемија достиже врхунац током ноћи. Из тог разлога, могућност појаве лажно негативних резултата добијених овим методама није занемарљива и директно је условљена степеном микрофиларијемije у крви домаћина. Такође, микроскопска идентификација врста микрофиларија у мешовитим инфекцијама може бити отежана и захтева искусно и квалификовано особље за постављање тачне дијагнозе (Gioia и сар., 2010).

2.9.1.3. Молекуларне методе

Даљи развој лабораторијских техника за доказивање присуства инфекција са *D. immitis* резултирао је развојем молекуларних метода за детекцију молекула ДНК паразита у крви домаћина (Rojas и сар., 2015; Oi и сар., 2015; Davitkov и сар., 2016). Технике молекуларне детекције су дизајниране да детектују различите секвенце ДНК специфичне за одређене фамилије, родове и врсте паразитских филарија. Молекуларне технике имају добру осетљивост у детекцији ДНК патогена, али недостатак тих анализа је релативно висока цена и време потребно за извођење анализе. Ланчана реакција полимеразе се тренутно препоручује као тест специфичан за диференцијалну дијагностику различитих врста из рода *Dirofilaria* (Moreira и сар., 2019). За детекцију ДНК *D. immitis* може се користити метода конвенционалне ланчане реакције полимеразе (*polymerase chain reaction – PCR*), PCR у два корака (*nested PCR*), као и квантитативни, *real time – qPCR* (Watts и сар., 1999; Oi и сар., 2015; Laidoudi и сар., 2020). Више протокола је нашло примену у детекцији гена специфичних за *D. immitis*, као што су специфични регион *16S rRNA* величине 440 парова база (Watts и сар., 1999; Şuleşco и сар., 2016), фрагмент *cox1* гена *D. immitis* величине 203 парова база (Nguyen и сар., 2016; Alobaidii и Ali, 2024.), затим *ribosomal internal transcribed spacer1* величине 595 парова база и *ribosomal internal transcribed spacer2* величине 542 пара база (Ferreira и сар., 2017). Међутим, оно што може да представља проблем је окултна диофилариоза односно стање када нема микрофиларија у крви домаћина, јер тада помоћу PCR методе не може да се детектује ДНК *D. immitis*. ДНК која циркулише у крви домаћина је пореклом од микрофиларија, а не од адултних облика (Becker и сар., 2022). Поред конвенционалне PCR методе, последњих година све се више ради на развоју и имплементацији квантитативних – *qPCR* метода у дијагностици кардиопулмоналне диофилариозе (Laidoudi и сар., 2020; Negron и сар., 2022).

2.9.2. Биомаркери

Код појаве кардиопулмоналних обољења, како у хуманој тако и у ветеринарској медицини, неколико биомаркера је нашло примену у дијагностици и прогнози болести. Биомаркери су параметри који се могу објективно мерити и користити у процени функционисања физиолошких и патофизиолошких процеса, као и фармакодинамских и фармакокинетичких одговора на примењену терапију (Oyama и Singletary, 2010). Током последњих 50 година, биомаркери су постали готово незаобилана помоћна средства у постављању тачне дијагнозе и прогнозе разних обољења, а потогову кардиолошких. Најчешће се користе за примарну и секундарну превенцију, дијагнозу и лечење акутног инфаркта миокарда, као и за дијагностику и процену ризика од настанка срчане слабости. Можемо рећи да се данас биомаркери користе и у сврху адекватне оптимизације терапијских протокола пацијената са срчаним обољењима. Први радиоимунолошки тестови за праћење концентрације

биомаркера развијени су седамдесетих година 20. века и још тада су представљали револуционарни напредак у медицинској лабораторијској дијагностици, а међу првима развијени су тестови за детекцију и одређивање концентрације миоглобина и креатин киназе (Stone и сар., 1975; Roberts и сар., 1976).

Може се рећи да су девесете године 20. века представљале златну еру развоја срчаних биомаркера. Главни фокус је тада био на маркерима за детекцију формирања и дестабилизације коронарног плака, маркерима формирања интракоронарног тромба, као и на маркерима за откривање исхемије миокарда. У сваком случају, за клиничку праксу, битно је да један поуздан биомаркер поседује основне критеријуме: да се лако мери брзим, доступним методама, са оптималном ценом коштања; да донесе нове и вредне информације у процесу дијагностике и процене ефикасности примењене терапије; да помогне и олакша медицинским радницима у менаџменту терапије пацијента (Morrow и de Lemos, 2007).

У ветеринарској медицини, најпотпунија истраживања примене биомаркера су спроведена на малим животињама, и то углавном на псима и мачкама. Тренутно, у ветеринарској клиничкој пракси биомаркери са највећом предвидљивошћу за срчана обољења су Н-терминални про-Б-тип натриуретски пептид (*NT-proBNP*) и срчани тропонини – *cTnI* (*cardiac troponin I*) и *cTnT* (*cardiac troponin T*); а ређе се користе атријални натриуретски пептид, ендотелин и фактор некрозе тумора α (Shaw и сар., 2004; Gu и сар., 2006; van Kimmenade и Januzzi, 2009; Fonfara и сар., 2010; Carretón и сар., 2014).

2.9.2.1. Н-терминални про-Б-тип натриуретски пептид (*NT-proBNP*)

Натриуретски пептид типа Б (*BNP*) припада породици натриуретских пептида и има функцију у регулацији хомеостазе течности у организму. Описан је 1988. године, након што је изолован из мозга свиње и назван је „мождани натриуретски пептид“ (Sudoh и сар., 1988; Fuster, 2006). Синтетише се у срчаном мишићном ткиву (Mukoyama и сар., 1990, 1991) и ослобађа се као одговор организма на различите стимулусе, укључујући хипертрофију, хипоксију и преоптерећење крвним волуменом. Индукција синтезе *BNP*-а је углавном последица повећаног стреса у зиду коморе, повећаног систолног и дијастолног притиска на зид коморе, као и локалне и циркулишуће индукције ендотелина-1 (Ikeda и сар., 1997; Wiese и сар., 2000). Такође, *BNP* се може лучити заједно са другим неурохормоналним пептидима, као што су норепинефрин и ангиотензин II (Potter и сар., 2009).

Натриуретски пептид Б типа има структуру изграђену од 32 аминокиселине, са цикличним ланцем који се формира везивањем 17 аминокиселина дисулфидним мостом између два молекула цистеина (Cappellin и сар., 2001). Синтетише се као препрохормон *preproBNP*, који се потом разлаже – прво у прохормон *proBNP*, а затим у активни хормон *BNP*, одвајајући се од *N*-терминалног краја прохормона који се назива *NT-proBNP* (Hall, 2004). Специфичне серумске и миокардијалне протеазе разлажу *proBNP* на активни карбокси-терминални фрагмент (*C-BNP*) и неактивни нуспродукт *N*-терминалног краја (*NT-proBNP*).

Своју биолошку активност *BNP* остварује везујући се за три главна рецептора – *A*, *B* и *C*, од којих се рецептори *A* и *B* претежно налазе у бубрезима, плућима, крвним судовима и надбубрежним жлездама (Mair и сар., 2008). Активација рецептора *A* и *B* изазива натриурезу и вазодилатацију, што резултира антихипертрофичним и антифибротичним ефектима. Рецептор *C* служи за уклањање једног дела ових пептида из циркулације процесом ендоцитозе и лизозомалне разградње након везивања пептида за поменути рецептор, а остатак пептида се уклања деловањем различитих ендопротеаза (Weber и Hamm, 2006). Дакле, натриуретски систем се супротставља вазоконстриктивним ефектима система ренин-ангиотензин-алдостерон који задржавају натријум. Равнотежа ова два система доприноси развоју конгестивне срчане

инсуфицијенције (*Potter* и сар., 2009). Како болест срца прогредира, активности оба система се повећавају, што фаворизује вазоконстрикцију, као и задржавање течности и натријума, јер је ефикасност система натриуретских пептида смањена у каснијим стадијумима срчаних обољења.

У циљу постављања дијагнозе у хуманој медицини, атријални натриуретски пептиди (*ANP*) и *BNP* се користе као маркери основне срчане функције и анализирају се у сврху постављања дијагнозе конгестивне срчане инсуфицијенције, као и за разликовање етиологије респираторних знакова и пружање информација у вези са ризиком од морбидитета и морталитета (*Tang* и сар., 2007; *Rehman* и сар., 2008). Код паса, у дијагностици се користе имуноензимски тестови (*Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA*) за детекцију *NT-proBNP-a*. Тестови у којима се користе било *NT-proBNP* или *BNP* имају исту специфичност и осетљивост, али *NT-proBNP* има предност у практичној примени због дужег биолошког полуживота (*Fox* и сар., 2009). Индикација за анализу *NT-proBNP-a* је најчешће код пацијената са респираторним знацима непознатог порекла (*DeFrancesco* и сар., 2007; *Prosek* и сар., 2007; *Fine* и сар., 2008; *Oyama* и сар., 2009). Често, подаци прикупљени из анамнезе, клиничке слике и конвенционалне дијагностике не указују јасно на примарну респираторну болест или на конгестивну слабост срца. Истовремене болести респираторног система и митралних залистака су честе код геријатријских пацијената, а присуство шумава на срцу може маскирати препознавање респираторне болести као примарног узрока клиничких знакова.

Две студије посебно подржавају употребу *NT-proBNP* биомаркера за доказивање или искључивање присуства конгестивне срчане инсуфицијенције код паса са респираторним знацима. *Fine* и сар. (2008) су испитивали 46 паса са респираторним дистресом, или кашљем и открили да је средња концентрација *NT-proBNP* била значајно већа код паса са срчаном инсуфицијенцијом него код паса са респираторним болестима као што су хронични бронхитис, инфекција или неоплазије плућа. Код свих паса са респираторном болешћу, концентрација *NT-proBNP* је била мања од 800 pmol/l, док је код 92% паса са срчаном инсуфицијенцијом концентрација *NT-proBNP* била већа од 1400 pmol/l. У другој студији, концентрација *NTproBNP* већа од 1158 pmol/l уочена је код паса са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом (*Oyama* и сар., 2009). Такође, *Lee* и сар. (2018) су потврдили значај анализе *NT-proBNP* као срчаног биомаркера код паса са испољеном тешком клиничком сликом кардиопулмоналне диофилариозе. Међутим, не постоје подаци како се концентрација овог биомаркера мења кроз време током терапије, што може бити од изузетне важности у прогнози овог обољења.

2.9.2.2. *D-dimer*

Други веома значајан биомаркер који може наћи потенцијал у праћењу тока болести срчаног црва и прогнози исхода терапије је *D-dimer*. Молекули *D-dimera* настају разградњом умреженог фибрина током процеса фибринолизе. Генерисање *D-dimera* захтева активност три ензима: тромбина, активаног фактора XIII и плазмина (*Francis* и сар., 1980). Процес почиње када тромбин, који се ствара током процеса коагулације конвертује растворљиви фибриноген у фибринске мономере. Ови мономери затим формирају фибринске полимере, кроз нековалентне интеракције засноване на алостерним променама унутар протеина, настале као резултат тромбинског цепања фибринопептида са *N*-терминалног домена. Фибрин је ојачан кроз интеракције са фактором XIII, који, након активације тромбином, унакрсно повезује *D*-домене суседних фибринских мономера. Растварање плазмина у фибринском угрушку резултира стварањем молекула *D-dimera* (*Francis* и сар., 1980). Присуство молекула *D-dimera* указује на интраваскуларну коагулацију, јер се може створити само након формирања тромбина и накнадне деградације умреженог фибрина (*Olson*, 2015). Мерење концентрације *D-dimera* служи као свеобухватни маркер активације коагулационог и фибринолитичког система,

односно има функцију индиректног маркера активности тромбоцита и накнадне тромболитичке активности фибринолитичких система (Olson, 2015). Постоји више индикација за употребу анализе концентрације молекула *D-dimera* у различитим патолошким стањима. Анализа концентрације овог молекула незаобилазна је у савременој тријажи и дијагностици дубоке венске тромбозе (Wells и сар., 2003; Wells, 2007; Di Nisio и сар., 2007), плућне тромбоемболије (Geersing и сар., 2008; Raja и сар., 2015; Buntine и сар., 2019) и дисеминоване интраваскуларне коагулације (Taylor и сар., 2001; Lehman и сар., 2004; Toh и Downey, 2005; Wada и сар., 2014). У неколико студија је доказано повећање концентрације *D-dimera* у плазми паса са тромбоемболијом и дисеминованом интраваскуларном коагулацијом (Nelson и Andreasen, 2003; Stokol, 2003; Dewhurst и сар., 2008). У истраживањима Carretón и сар. (2011, 2013а) објављено је да значајан број паса, природно инфицираних филаријом *D. immitis*, показује повећање концентрације *D-dimera* у плазми. Међутим, за прогнозу кардиопулмоналне диофилариозе од изузетне важности су подаци о кретању концентрација овог биомаркера током терапијског циклуса, како би се у право време могло реаговати применом одређених лекова.

2.10. Терапија кардиопулмоналне диофилариозе

Лечење кардиопулмоналне диофилариозе код паса је сложено и често ризично због нежељених ефеката насталих као последица масовног уништавања постојећих паразита. Због тога је неопходно одабрати одговарајућу терапијску стратегију. Терапија паса са потврђеном инфекцијом врстом *D. immitis* своди се на дуготрајну употребу лекова, ограничење физичке активности паса, а у ретким ситуацијама и хируршку интервенцију (Noack и сар., 2021).

У неким државама, попут САД, регистрован је једини лек који делује против адулта *D. immitis* – меларсомин дихидрохлорид (Wolf и сар., 2021). Меларсомин дихидрохлорид је органски хемотерапеутски агенс на бази арсена. Иако се сматра да је терапија меларсомин дихидрохлоридом безбедна, неопходно је истаћи да је арсен иританс, који може изазвати директно оштећење слузокоже гастроинтестиналног система и бубрежних тубула. Због свог изразито корозивног дејства, овај лек треба давати дубоком интрамускуларном ињекцијом у епаксијалну мускулатуру лумбалне регије. Додатно, метаболити арсена су моћни цитотоксини. Инхибицијом оксидоредуктазе, потенцирањем оксидативног стреса и испољавањем генотоксичности, арсен може ометати многе метаболичке путеве и прекинути производњу ћелијске енергије, што доводи до оштећења ћелија, повећане пропустљивости крвних судова и хемолize (Thomas и сар., 2001; Roy и Saha, 2002). Акутни нежељени ефекти након интрамускуларне ињекције меларсомин хидрохлорида су ретки, али могу укључивати кашаљ, повраћање и хиперсаливацију. Међутим, услед брзог угинућа адулта веома често као последица адултицидне терапије јавља се запаљење плућног паренхима, едем плућа и плућна хипертензија (Ames и Atkins, 2020).

Тренутно, у Републици Србији терапија кардиопулмоналне диофилариозе се спроводи применом такозваног „*slow kill*“ терапијског протокола, који подразумева употребу антибиотика доксицилина (група тетрациклина) у дози од 5–10 mg/kg т.м. два пута дневно, током 30 дана и ивермектина (група макроцикличних лактона) у дози од 6–12 µg/kg т.м. на 14 дана, током шест месеци. Након завршеног шестомесечног циклуса терапије врши се тестирање на присуство паразита у циљу провере ефикасности спроведене терапије. Терапија се прекида у случају два негативна теста у размаку од месец дана, док се у случају позитивног теста циклус терапије понавља. Ивермектин је у ветеринарску клиничку праксу уведен као антипаразитски лек још 1981. године (Campbell, 1985). Откриће микрофиларицидног ефекта ивермектина против многих филарија, довело је до значајног напретка у лечењу инфекција изазваних овом групом паразита. Иницијалне студије у којима је коришћен ивермектин код људи инфицираних

поткожном филаријом *Onchocerca volvulus* спроведене су 1982. године (Aziz и сар., 1982a, 1982b). У фармакодинамском смислу, ивермектин је позитивни алостерични модулатор који селективно отвара инхибиторне канале за хлоридне јоне зависне од гутамата у мембранама фарингеалних мишића, моторних нерава, женских репродуктивних органа и екскреторно-секреторних пора нематода, што указује на директно дејство на њихову покретљивост, исхрану и репродукцију (Vercruyse и сар., 2002). Такође, познато је да нематодe могу да мењају имунски одговор домаћина ослобађањем сложене групе имуномодулаторних једињења и на тај начин омогућавају преживљавање у домаћину (Maizels, 2013; King и Li, 2018). Moreno и сар. (2010) су у свом истраживању потврдили да ивермектин у *in vivo* условима доводи до елиминације микрофиларија *Brugia malayi* из крви домаћина. У истој студији доказано је и да ивермектин доводи до мање секреције протеина из екскреторно-секреторног апарата нематода, што за собом повлачи и смањење способности паразита да избегава одговор имунског система домаћина. Ови супротни ефекти ивермектина објашњени су локализацијом канала за јоне зависних од гутамата имајући у виду да су исти смештени у мускулатури која окружује екскреторно-секреторне везикуле паразита. У истраживањима вршеним на *D. immitis* доказан је губитак способности модулације имунског одговора домаћина, а додатно је доказано и да ивермектин поспешује везивање ћелија моноцитно-макрофагног система за присутне паразите (Vatta и сар., 2014), што доводи до њиховог бржег убијања. Сматра се да ивермектин нема задовољавајући ефекат против одраслих стадијума *D. immitis*, за разлику од ефекта на адулте других врста нематода. Разлог за наведену тврдњу је нејасан, али постоји мишљење да су микрофиларицидне дозе ивермектина које се широко примењују у превенцији диофилариозе јако мале и недовољне да испоље адултицидни ефекат (Campbell, 2016; Martin и сар., 2021). Међутим, још 2005. године McCall доказује да стопа елиминације ларвених и адултних облика *D. immitis* током „slow kill“ третмана зависи од старости паразита у моменту започињања терапије, при чему наводе да је ларвама старим три месеца потребно до једне године, а зрелим адултима и до две и по године да би се обезбедила ефикасност елиминације од најмање 95% (McCall, 2005). Нешто касније и Grandi и сар. (2010) доказују да ивермектин у комбинацији са доксициклином успешно елиминише како микрофиларије тако и адулте са успешношћу од 85%. У новијим истраживањима McCall и сар. (2023a) доказана је ефикасност комбинације ивермектина и доксициклина у елиминацији микрофиларија из крви инфицираних паса, али и утицај на смањено преживљавање адулта, поготову женки. Такође, у свом другом истраживању, McCall и сар. (2023b) дошли су до резултата који говоре да код микрофиларемичних паса третман комбинацијом ивермектина и доксициклина утиче на даљи физиолошки раст и развој ларви и да након преношења у другог правог домаћина не долази до развоја адулта у крвним судовима плућа. Предност за примену ивермектина је у његовој безбедности приликом употребе код паса, јер је познато да поседује такозвану селективну токсичност, која произилази из тога што ивермектин тешко пролази крвно-мождану баријеру сисара, а самим тим не доводи до испољавања неуротоксичног ефекта (Trailović, 2001). Међутим, када се примене високе дозе, ивермектин може да прође крвно-мождану баријеру, када испољава депресивне ефекте на централни нервни систем (Geyer и Janko, 2012). Поред тога, ивермектин и у малим дозама може проћи крвно-мождану баријеру када постоје мутације на кодирајућем гену за синтезу *p*-гликопротеина, а који представља ефлукс пумпу у поменутој баријери. Поменута мутација представља делецију четири пара база у гену *MDR1* (*Multidrug resistance mutation*) код одређених раса паса, као што су шкотски и аустралијски овчар, а резултира експресијом нефункционалног *p*-гликопротеина и повезано је са појавом неуротоксичности услед накупљања високе концентрације ивермектина у можданом ткиву (Geyer и Janko, 2012). Из тог разлога, употреба ивермектина код ових раса паса није препоручљива.

Доксициклин је антибиотик који припада групи тетрациклина и у клиничкој пракси се користи више од 40 година. Ефикасан је против веома широког спектра грам-позитивних и грам-негативних бактерија, као и неких протозоа (*Holmes* и *Charles*, 2009). Доксициклин делује бактериостатски, тако што инхибира бактеријску синтезу протеина реверзибилним везивањем за 30S подјединицу рибозома и спречава везивање аминоксил-тРНК са бактеријским рибозомом. Даља инхибиција синтезе протеина се дешава у митохондријама везивањем за 70S подјединицу рибозома. Доксициклин улази у ћелију преко хидрофилних пора у спољашњој, ћелијској мембрани и преко система активног транспорта зависног од *pH* у унутрашњој, цитоплазматској мембрани (*Chopra* и *Roberts*, 2001). Поред класичне антибактеријске употребе, доксициклин се користи у профилакси маларије (*Tan* и сар., 2011) или за лечење филариоза људи (*Taylor* и сар., 2010) и диروفилариозе паса (*Simón* и сар., 2012; *Carretón* и сар., 2014). Такође, инхибира подјединице рибозома код паразита *Plasmodium falciparum*, изазивајући поремећаје у синтези масних киселина као и биосинтези хема (*Dahl* и сар., 2006; *Battu* и сар., 2007).

Што се тиче инфекције изазване врстом *D. immitis*, показало се да доксициклин, примењен са или без лека из групе макроцикличних лактона, негативно утиче на сваку фазу развојног циклуса и то: на циркулишуће микрофиларије (*McCall* и сар., 2011; *Chandrashekar* и сар., 2014; *McCall* и сар., 2014; *Savadelis* и сар., 2017, 2018) и адултне облике *D. immitis* (*McCall* и сар., 2011; *Chandrashekar* и сар., 2014; *McCall* и сар., 2014; *Savadelis* и сар., 2017, 2018; *McCall* и сар., 2023а). Додатно, постоје и истраживања која доказују да пси оболели од кардиопулмоналне диروفилариозе имају слабије изражене симптоме изазване тромбозом и запаљењем крвних судова различитих органа, уколико су пре адултицидне терапије третирани доксициклином. Стога је примена доксициклина важан корак током адултицидног лечења и препоручује се у свим званичним протоколима (*McCall* и сар., 2014; *Nelson* и сар., 2017). На крају, тачан механизам синергистичког деловања ивермектина и доксициклина није утврђен, али се претпоставља да је добијени ефекат вероватно последица комбинације елиминације бактерије *W. pipientis* доксициклином и соматске дегенерације паразита услед дејства ивермектина (*Grandi* и сар., 2010).

Поред каузалне терапије, као део терапијског протокола се по потреби препоручује и потпорна терапија. Ова врста терапије је индикована за псе са знацима средње и тешке клиничке слике кардиопулмоналне диروفилариозе, односно као предтретман паса пре апликације адултицидних препарата или хируршког уклањања адулта (*Simón* и сар., 2012). Употреба кортикостероида је оправдана јер, на пример, преднизолон у дози од 1 mg/kg т.м. дневно током 4-5 дана, може смањити учесталост појављивања упале плућа и тромбоемболије. Да би се ублажили кардиопулмонални знаци као помоћна терапија могу се користити еналаприл и дигоксин. Еналаприл, инхибитор ангиотензин-конвертујућег ензима (ACE инхибитори), индикован је за лечење конгестивне срчане инсуфицијенције и хипертензије. Овај лек, који пси добро подносе, своје дејство испољава модулацијом система ренин-ангиотензин кроз спречавање стварања ангиотензина 2 који је потентни вазоконстриктор. (*Campbell*, 1995). Дигоксин, кардиотонички гликозид је лек који делује на повећање контрактилности миокарда са повећаним минутним волуменом срца, што такође помаже смањењу клиничких знакова слабости десног срца (*Adebayo* и сар., 2020). Такође, у циљу побољшања клиничке слике и диуретици се могу користити за смањење плућног едема и плеуралног излива, поготову када је присутна конгестивна срчана инсуфицијенција. Код изузетно тешких облика кардиопулмоналне диروفилариозе индикована је и терапија кисеоником. Хируршка терапија се изводи на псима са дијагностикованим кавалним синдромом (AHS стадијум 4) помоћу специјалних флексибилних катетера уведених у срце преко југуларне вене.

2.11. Мере профилаксе

Имајући у виду тежину патоморфолошких и патофизиолошких промена као и клиничког испољавања болести које могу изазвати адулти и микрофиларије, главни циљ у очувању здравља и добробити паса је спречавање настанка инфекције изазване врстом *D. immitis*. Превенција кардиопулмоналне диروفилариозе паса заснива се на примени лекова који припадају групи макроцикличних лактона. Основа превентивне терапије заснива се на уништавању ларви (Л₃) и оних које се развијају у домаћину – ларви раног четвртог стадијума (Л₄).

Историјски посматрано, први лек који је нашао место у превенцији кардиопулмоналне диروفилариозе био је дериват пиперазина и то диетилкарбамазин, који је 1977. године регистрован за употребу. Недуго након тога *Campbell* и *Blair* (1978) објављују прве резултате у којима авермектини показују добру ефикасност против микрофиларија *D. immitis*. Механизам деловања диетилкарбамазин остварује тако што негативно утиче на процес пресвлачења микрофиларија из стадијума Л₃ у стадијум Л₄, због чега је била неопходна његова свакодневна апликација. Поред свакодневне примене која је представљала велики практични недостатак, диетилкарбамазин испољава и тешке системске нежељене ефекте код микрофиларијемичних паса (*Vitale* и сар., 1994; *Calvert* и *Thomason*, 2008). Увођењем ивермектина у клиничку праксу 1987. године, који је тада окарактерисан као безбедан по домаћина и ефикасан против ларвених облика *D. immitis*, појавила се одлична алтернатива диетилкарбамазину. Комбинација времена потребног да се микрофиларије Л₃ развију у Л₄, и екстремна осетљивост раних Л₄ микрофиларија на макроцикличне лактоне са једне стране, и релативно дуг полуживот лекова из групе макроцикличних лактона који се користе за профилаксу кардиопулмоналне диروفилариозе са друге стране, омогућило је апликацију ових лекова у интервалима од месец дана (*Prichard*, 2021).

Данас се у склопу превенције кардиопулмоналне диروفилариозе примењује више лекова који припадају групи макроцикличних лактона. Активне супстанце регистроване за ову сврху су ивермектин, селамектин, еприномектин и абамектин, сви из групе авермектина, као и милбемицин оксим и моксидектин, из групе милбемицина. Представници макроцикличних лактона представљају продукте ферментације актиномицета из рода *Streptomyces*. Механизам дејства ових једињења подразумева директно отварање канала за јоне хлора или појачавање ефекта агониста канала зависних од глутамата, узрокујући већи пролазак јона хлора кроз постсинаптичке мембране, изазивајући хиперполаризацију мембране ћелија, која смањује ексцитабилност ћелија, доводећи до отпуштање мишића и атоничне парализе паразита. Настала парализа доводи до гладовања, а последично и смрти паразита (*Wolstenholme* и *Rogers*, 2005; *Puttachary* и сар., 2013; *Holden-Dye* и *Walker*, 2014).

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су:

- испитивање присуства *D. immitis* код паса познатих власника, применом молекуларних и паразитолошких метода;
- праћење клиничке слике кроз анализу нивоа параметара оксидативног стреса, степена оштећења ДНК, хематолошких и биохемијских параметара и концентрације биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer*;
- процена утицаја паразита на домаћина и ефикасности примењене терапије код паса природно инфицираних нематодом *D. immitis*, пре, током и након примене терапијског протокола.

За остваривање постављених циљева дефинисани су задаци истраживања:

- Формирање репрезентативног узорка паса (минимално 30) код којих је методама модификованог Нотовог теста, применом брзих серолошких тестова и PCR методе, потврђено присуство *D. immitis*.
- Пре почетка примене терапије – узорковање крви и извођење паразитолошких (модификовани Нотов тест, брзи серолошки тест) и молекуларних метода (*PCR*, *real-time PCR*); одређивање основних хематолошких и биохемијских параметара, анализа нивоа биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина.
- У току примене терапије (тј. трећег месеца од почетка терапије) – узорковање крви и извођење паразитолошких (модификовани Нотов тест, брзи серолошки тест) и молекуларних метода (*PCR*, *real-time PCR*); одређивање основних хематолошких и биохемијских параметара, анализа нивоа биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина.
- На крају примене терапије (шест месеци од почетка терапије) – узорковање крви и извођење паразитолошких (модификовани Нотов тест, брзи серолошки тест) и молекуларних метода (*PCR*, *real time PCR*); одређивање основних хематолошких и биохемијских параметара, анализирање нивоа биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimer* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина.
- Статистичка обрада, анализа и презентација добијених резултата.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

4.1. Материјал

4.1.1. Животиње укључене у истраживање

Истраживање је обављено у периоду од октобра 2021. до јануара 2023. године. За истраживање је коришћен узорак крви паса, преостао након обављања осталих анализа у оквиру стандардне клиничке дијагностике, код којих је потврђено присуство циркулишућег антигена женки *D. immitis* (*Anigen Rapid Heartworm Ag 2.0 Test Kit, Bionote*, Минесота, САД). Истраживањем су обухваћена 34 природно инфицирана пса и то 19 мужјака и 15 женки, који су били позитивни на циркулишући антиген женке *D. immitis*. Поред овога, за потребе испитивања осетљивости и специфичности *qPCR* методе, узети су и узорци крви шест паса код којих није утврђено присуство *D. immitis*, а од којих је крв узимана приликом редовних годишњих тестирања по захтеву власника. Ови пси нису укључени даље у експеримент, у том тренутку нису били ничим терапирани нити је праћено њихово даље стање у оквиру овог истраживања.

Код свих животиња укључених у истраживање извршен је клинички преглед и подвргнуте су терапији која је укључивала доксициклин у дози од 10 mg/kg два пута дневно током 30 дана и ивермектин у дози од 6–12 µg/kg сваке две недеље током шест месеци (стандардни терапијски протокол за ово обољење). Клинички преглед и спровођење терапије животиња вршено је од стране надлежног лиценцираног ветеринара у оквиру амбуланти, уз поштовање свих стандарда добре ветеринарске праксе и начела добробити и заштите животиња.

Пси укључени у истраживање су били подвргнути редовним дијагностичким процедурама, а вишак крви је коришћен за анализе у оквиру ове дисертације. Сви власници чији су пси били укључени у ово истраживање дали су писмену сагласност да њихови пси могу учествовати (сагласност је добијена и од власника шест паса који су били негативни, а чија је крв искоришћена само за валидацију *qPCR* методе). Истраживање је одобрила Етичка комисија за добробит огледних животиња Универзитета у Београду – Факултета ветеринарске медицине (Мишљење бр. 25/21 од 20. 10. 2021. године).

4.2. Методе

4.2.1. Клинички преглед животиња

Сваки пас укључен у истраживање клинички је прегледан од стране надлежног ветеринара пре почетка терапије и на основу установљених клиничких симптома сврстан у стадијуме од један до четири, према препорукама Америчког удружењу за болест срчаног црва (*American Heartworm Society – AHS*). Од власника је најпре узета анамнеза која је укључивала податке који се односе на пол, старост, расу, затим на услове држања животиње, односно да ли се пас држи у затвореном простору, на отвореном или комбиновано. Након постављања сумње на кардиопулмоналну диофилиариозу узоркована је крв и спроведено је тестирање на присуство антигена утеруса женке „брзим“ имунохроматографским тестом (*Anigen Rapid Heartworm Ag 2.0 Test Kit, Bionote*, Минесота, САД). У случају позитивног теста, пси су подвргнути даљем клиничком прегледу. Клинички преглед позитивних паса подразумевао је општи физички преглед применом основних метода клиничког прегледа различитих регија тела.

Преглед видљивих слузокожа рађен је у циљу процене боја мукозних мембрана, где су бледе слузокоже указивале на могућу појаву анемија или слабу перфузију, док је у случају модрих односно цијанотичних слузокожа постављана сумња на постојање неадекватне

оксигенације крви, што може да укаже на везу са кардиоваскуларним обољењима и тешким едемом плућа. На врату је посматрано могуће постојање дистензије *v. jugularis*. Проширење југуларне вене са појавом пулсација може указати на постојање повећаног централног венског притиска и постојања конгестивне слабости срца.

Пси су током прегледа посматрани и палпирани на присуство периферних едема који се обично јављају код паса са узнатредовалом кардиоваскуларном патологијом. Палпацијом је такође прегледано постојање *ictus cordis*, палпаторног шума срца (*fremitus cordialis*), промена пулса, као и постојање увећане јетре и асцитеса. Метода аускултације је била битна за клиничку процену стања плућа и срца. Посебна пажња је усмерена на крепитације на крају инспиријума, које могу указивати на постојање плућног едема. Аускултацијом срца вршена је процена квалитета срчаних тонова, затим ритам срца, а уколико су постојали, процењивани су и срчани шумови. На основу клиничког прегледа, пси су класификовани према тежини испољене клиничке слике у три групе према Америчком удружењу за борбу против срчаног црва. Пси са дијагностикованим кавалним синдромом, који се сврставају у стадијум 4, нису били укључени у студију. Прву групу (*AHS* стадијум 1) чинили су пси без икаквих клиничких знакова, другу (*AHS* стадијум 2) пси са присутним клиничким симптомима који укључују повремени кашаљ, умор и абнормалне респираторне шумове, а у трећу групу (*AHS* стадијум 3) сврстани су пси са перзистентним умором, упорним кашљем, диспнејом, срчаном кахексијом, знацима слабости десног срца и хепатомегалијом.

Пси укључени у ово истраживање нису имали знакове других системских болести и поремећаја, осим оних који су последица инфекције са *D. immitis*. Током терапијског протокола у трајању од шест месеци, поред редовних клиничких прегледа, који су саставни део терапијског протокола, све животиње су након постављања дијагнозе, односно на презентацији (D_0), детаљно прегледане, као и 90. дана (D_{90}) и 180. дана (D_{180}) од почетка терапије и праћен је клинички опоравак сваког пса посебно.

4.2.2. Узорковање крви

Током редовног годишњег тестирања на присуство *D. immitis* или након постављања сумње на кардиопулмоналну диروفилариозу, од паса је узоркована крв, уз поштовање правила асепсе и антисепсе, пункцијом *vena cephalica antebrachii* или *v. saphena*, вишак крви (преостао након обављања анализа у оквиру стандардне клиничке дијагностике) распоређиван је у стерилне вакутајнере и то:

- вакутајнере са додатком антикоагуланса дикалијум етилендиаминотетрасирћетне киселине (*K₂EDTA*) и таква крв је коришћена за анализу хематолошких параметра, модификовани Нотов тест, имунохроматографски тест, молекуларне анализе и комет тест;
- вакутајнере за брзо издвајање серума, који је коришћен за одређивање биохемијских параметара и биомаркера *NT-proBNP*;
- вакутајнере са додатком литијум-хепарина и такви узорци су коришћени за испитивање параметара оксидативног стреса и концентрације *D-dimera*.

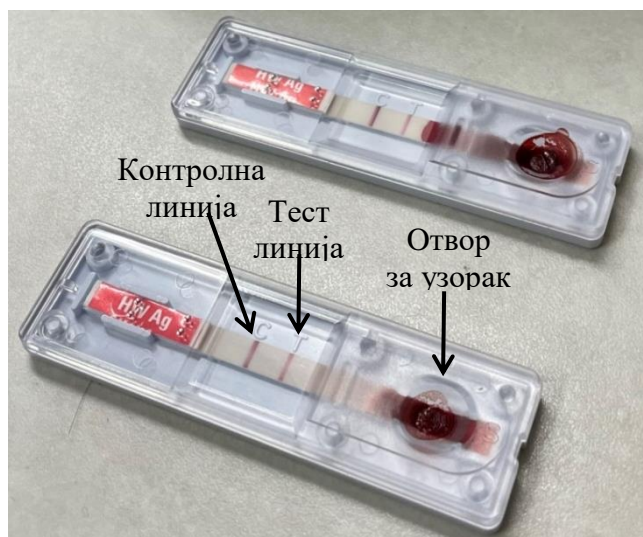
Све епрувете са крви сакупљеном од паса су прописно обележене и истог дана, у ручном фрижидеру (4 °C), допремљене на Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, где су вршена даља испитивања.

4.2.3. Доказивање присуства и бројање микрофиларија у крви паса применом модификованог Нотовог теста

Присуство ларвених облика *D. immitis* (микрофиларија) у крви паса доказивано је применом методе модификованог Нотовог теста (Genchi и сар., 2021). Модификовани Нотов тест се заснива на концентрисању, детекцији и морфометријској идентификацији циркулишућих микрофиларија. Техника подразумева разблаживање 1 ml крви са антикоагулансом са 9 ml дестиловане воде, окретање епрувете затворене запушачем неколико пута, како би се изазвала хемолиза и затим центрифуговање 15 минута на $500 \times g$. Одбацивањем супернатанта добија се талог у коме се евентуално налазе микрофиларије. Посматрање и бројање микрофиларија извршено је у 50 μ l талоба, под светлосним микроскопом (*Olympus*, CX23) при увеличањима 40 и 100 пута, уз додатак метиленовог плавог. Сваки узорак прегледан је у трипликату, а добијени резултати су приказивани као средња вредност трипликата.

4.2.4. Доказивање антигена женке *Dirofilaria immitis* у крви паса помоћу „брзог“ имунохроматографског теста

За доказивање антигена утеруса женке *D. immitis* у крви паса коришћен је комерцијални „брзи“ имунохроматографски тест (*Anigen Rapid Heartworm Ag 2.0 Test Kit*, Bionote Inc, Јужна Кореја), а реакције су изведене и прочитане према упутству произвођача. За испитивање је коришћена пуна крв испитиваних паса. Две капи пуне крви са антикоагулансом (око 80 μ l) укапају су у отвор за узорак на апарату за тестирање (Слика 3). Када се покрене реакција, уочава се љубичаста боја која се покреће кроз прозор за читавање резултата. Обојена линија означена са латиничним словом „C“, представља контролну линију, која се појављује у левом делу прозора за читавање резултата и показује да је тест исправан. У десном делу прозора за читавање резултата назначено је место линије која показује резултате теста која се означава латиничним словом „T“. У случају позитивног теста, на том месту се уочава љубичасто обојена линија, која представља тест линију. Очитавање резултата је извршено након десет минута, према упутству произвођача.



Слика 3. „Брзи“ имунохроматографски тест за детекцију антигена утеруса женке *Dirofilaria immitis* (*Anigen Rapid Heartworm Ag 2.0 Test Kit*, Bionote Inc, Јужна Кореја)

4.2.5. Доказивање присуства ДНК микрофиларија *Dirofilaria immitis* помоћу конвекционалне PCR методе

4.2.5.1. Екстракција ДНК из прикупљене крви

Екстракција ДНК је обављена помоћу комерцијалног сета „Kapa express extract kit“ (*Sigma-Aldrich*, САД) према упутству произвођача. Укратко, адекватно обележена стерилна микроепрувета укупне запремине 1,5 ml коришћена је за екстракцију ДНК из сваког узорка. У исте микроепрувете пипетирано је:

- 10 μ l 10 \times KAPA Express Extract пуфера;
- 80 μ l H₂O₂;
- 8 μ l некоагулисане крви са K2EDTA антикоагулансом;
- 2 μ l Express Extract ензима.

Припремљена смеша је најпре стављена на мешалицу и затим су микроепрувете постављане у водено купатило на 75 °C у трајању од 20 минута. Након двадесетог минута подизана је температура на 95 °C на којој су узорци инкубирани у трајању пет минута. Микроепрувете су затим центрифуговане на апарату *Gyrozen Mini Microcentrifuge* (*Gimpo*, Јужна Кореја) при максималној брзини од 12.300 gcf током 60 секунди. Супернатант (са екстрактом ДНК) у количини од 50 μ l пребациван је у нове стерилне микроепрувете запремине 1,5 ml и помешан са 1 \times TE пуфером (*Tris EDTA*). Екстрахована ДНК је потом квантификована на спектрофотометру ради провере количине и квалитета, а затим одложена на температуру од -20 °C до даљих анализа.

4.2.5.2. Провера квалитета екстраховане ДНК

Како бисмо били сигурни да је поступак екстракције ДНК био успешан, добијени узорак је провераван мерењем количине и чистоће ДНК коришћењем *UV-VIS* наноспектрофотометра (*BioSpec-nano*, *Shimadzu Scientific Instruments*, САД). Оптимална концентрација ДНК у узорку и однос оптичке густине (*optical density – OD*) од 260 nm/280 nm, квалификовала је дати узорак за даље молекуларне анализе.

4.2.5.3. PCR амплификација циљаних секвенци

In vitro амплификација жељеног фрагмента ДНК *D. immitis* извршена је применом конвенционалног PCR теста у апарату *Gradient PCR-T100TM Thermal Cycler* (*Bio-Rad*, *Hercules*, САД) приказаном на Слици 4. За потребе детекције специфичног региона *16S rRNA* карактеристичног за филарију *D. immitis* коришћени су прајмери који умножавају сегмент ДНК величине 440 парова база (*Watts* и сар., 1999) и то:

- ROR91 F: 5' GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC 3'
- ROR92 R: 5' CAA AGG CGT ATT TAC CGC CAC 3'.

Реакциона PCR мешавина у укупној запремини од 25 μl садржала је 1 \times *KAPA2G Robust HotStart ReadyMix* (*Sigma-Aldrich*, САД), 1 μM сваког прајмера и 10 μl екстраховане ДНК (Табела 1). Као позитивна контрола коришћен је архивски узорак Лабораторије за генетику животиња Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у коме је PCR методом раније детектована секвенца специфична за *D. immitis* (Davitkov и сар., 2016) и додатно потврђена секвенцирањем. У негативној контроли уместо узорка ДНК, додавана је стерилна вода у количини од 5 μl .

Табела 1. Концентрације и запремине реагенса коришћених за припрему PCR мешавине

Реагенс	Stock концентрација	Финална концентрација	Запремина (25 μl)
H_2O	/	/	2,5 μl
2 \times <i>KAPA2G Robust HotStart ReadyMix</i>	2 \times	1 \times	10 μl
Прајмер 1 – <i>ROR91</i>	10 μM	1,0 μM	1,25 μl
Прајмер 2 – <i>ROR92</i>	10 μM	1,0 μM	1,25 μl
Узорак ДНК	/	/	10 μl

Према протоколу добијеном од стране произвођача *Kapa Biosystems Inc.* (*Wilmington, MA*, САД), а додатно адаптираног у Лабораторији за генетику животиња Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, режим амплификације ДНК *D. immitis* обухватао је иницијалну денатурацију на температури од 95 $^{\circ}\text{C}$ у трајању три минута. Након тога денатурација на температури од 95 $^{\circ}\text{C}$ у трајању од по 15 секунди, хибридизација на температури 63 $^{\circ}\text{C}$ у трајању од 15 секунди (температура установљена у процесу оптимизације стандардног протокола у нашој лабораторији*) и елонгација на 72 $^{\circ}\text{C}$ током 15 секунди, понављани су у 45 циклуса. Коначна елонгација ДНК је изведена на 72 $^{\circ}\text{C}$ у трајању од осам минута (Табела 2).

Табела 2. Протокол температуре за PCR реакцију

	Назив корака	Температура	Трајање
	Почетна денатурација	95 $^{\circ}\text{C}$	3 минута
45 циклуса	Денатурација	95 $^{\circ}\text{C}$	15 секунди
	Хибридизација	63 $^{\circ}\text{C}$	15 секунди*
	Елонгација	72 $^{\circ}\text{C}$	15 секунди
	Коначна елонгација	72 $^{\circ}\text{C}$	8 минута

*температура установљена у процесу оптимизације стандардног протокола у Лабораторији за генетику животиња, Катедре за биологију, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду.



Слика 4. PCR уређај коришћен за умножавање региона *16S rRNA* специфичног за филарију *Dirofilaria immitis*

4.2.5.4. Електрофореза умножених PCR продуката

Електрофореза на 2% агарозном гелу коришћена је за раздвајање PCR продуката. Висококвалитетна агароза (*Sigma-Aldrich*, САД) коришћена је за припремање гела растварањем 0,7 g агарозе у 35 ml 1 × *TBE* пуфера. Хомогенизација раствора агарозе вршена је загревањем у микроталасној пећници, а затим хлађена на магнетној мешалици. Када се раствор агарозе охладио до адекватне температуре, агароза је разливана у калуп за формирање гела у коме се налази чешаљ за формирање базенчића у гелу. Након 15 минута хлађења на собној температури гел очврсне и долази до стварња порозне желатинозне структуре. Чешаљ је пажљиво уклањан, а калуп за наливање гела постављан у кадицу за електрофорезу која је претходно напуњена 1 × *TBE* пуфером. PCR продукти у количини од 4 µl мешани су са 1,5 µl боје *Run Safe* (*Thermo Scientific*, САД), а затим микропипетом убацивани у базенчиће у гелу. Електрофореза је изведена помоћу уређаја *Mupid-One* (*Advance*, Јапан) при јачини 50 mA и напону 50 V у трајању 45 минута. Након завршетка електрофорезе, гел је анализиран под ултраљубичастим светлом трансилуминатора (*ETX-20-C*, *Vilber Lourmat*, Француска).

4.2.6. Релативна квантификација ДНК *Dirofilaria immitis* помоћу qPCR методе

Комерцијални сет *FastGene IC Green qPCR Master Mix Universal* (*NIPPON Genetics EUROPE GmbH*, Немачка) коришћен је за све qPCR анализе квантификације ДНК *D. immitis* уз употребу пара прајмера специфичног за фрагмент *cox1* гена *D. immitis* величине 203 парова база (*Nguyen* и сар., 2016):

- Прајмер *S0582 F*: 5` AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA 3`
- Прајмер *S0583 R*: 5` ACA GGC ACT GAC AAT ACC AAT 3`

У свим изолатима за нормализацију добијених вредности за ДНК *D. immitis* као ендогена контрола коришћене су вредности добијене за ген β актин код паса употребом специфичних прајмера који амплификују секвенцу величине 276 парова база (Nguyen и сар., 2016):

- Прајмер *S0588 Actin F2*: 5` ACC ACT GGT ATT GTC ATG GAC TCT G 3`
- Прајмер *S0589 Actin R2*: 5` GCT CTT CTC CAG GGA GGA CGA 3`.

Реакциона *qPCR* мешавина са укупном запремином од 20 μ l садржала је 10 μ l 1 \times *FastGene IC Green qPCR Master Mix* (NIPPON Genetics EUROPE GmbH), 1 μ l сваког прајмера и 8 μ l екстраховане ДНК (Табела 3).

Табела 3. Концентрације и запремине реагенса коришћених за припрему *qPCR* мешавине

Реагенс	Stock концентрација	Финална концентрација	20 μ l реакција
<i>FastGene IC Green qPCR Master Mix</i>	2 \times	1 \times	10 μ l
Прајмер 1	10 μ M	0,5 μ M	1 μ l
Прајмер 2	10 μ M	0,5 μ M	1 μ l
Узорак ДНК	/	/	8 μ l

Све *qPCR* амплификације изведене су на апарату, *Rotor-Gene Q 5plex* (Qiagen, Valencia, CA, САД) приказаном на Слици 5, према протоколу описаном од стране Nguyen и сар. (2016) и прилагођеном** у Лабораторији за генетику животиња Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Протокол је обухватао иницијалну денатурацију на температури 95 $^{\circ}$ C у трајању три минута, након тога денатурација, хибридизација и елонгација су понављане у 40 циклуса (Табела 4). Количина *D. immitis* одређивана је употребом компаративне ΔC_t методе (Livak и Schmittgen, 2001). Укратко, просечна количина *D. immitis* у сваком узорку ($C_{tD.immitis}$) оптимизована је вредностима *housekeeping* гена ($C_{t\beta actin}$) према формули: $\Delta C_t = C_{tD.immitis} - C_{t\beta actin}$.

Табела 4. Протокол температуре извођења *qPCR*

	Назив корака	Температура	Трајање
	Почетна денатурација	95 $^{\circ}$ C	3 минута
40 циклуса	Денатурација	95 $^{\circ}$ C	5 секунди
	Хибридизација	63 $^{\circ}$ C	25 секунди**
	Елонгација	63 $^{\circ}$ C	25 секунди**

*температура установљена у процесу оптимизације стандардног протокола у Лабораторији за генетику животиња, Катедре за биологију, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду.



Слика 5. RT-PCR уређај коришћен за умножавање специфичног фрагмента *cox1* гена *Diroflaria immitis*

Пре анализирања узорака пореклом од паса укључених у експеримент (позитивни на антигенском тесту) извршена је валидација методе проценом њене осетљивости и специфичности, на шест узорака паса који су били негативни на брзом антигенском тесту, модификованом Нотовом тесту и конвенционалном PCR тесту и на шест узорака пореклом од паса који су били позитивни на брзом антигенском тесту, модификованом Нотовом тесту и конвенционалном PCR тесту, *qPCR* метода је потврдила присуство ДНК *D. immitis*.

Сензитивност (*SE*) представља меру способности методе да класификује узорак који садржи ДНК патогена као позитиван узорак и израчунава се према следећој формули:

$$SE = 100\% \times TP / (TP + FN)$$

где је *TP* – сигурно позитиван узорак, а *FN* – лажно негативан узорак.

Специфичност (*SP*) представља меру способности методе да класификује узорак који не садржи ДНК патогена као негативан узорак и израчунава се према следећој формули:

$$SP = 100\% \times TN / (TN + FP)$$

где је *TN* – сигурно негативан узорак, а *FP* – лажно позитиван узорак.

4.2.7. Хематолошке и биохемијске анализе

За хематолошке анализе коришћен је узорак пуне крви са *K2EDTA* као антикоагулансом. Основне хематолошке анализе извршене су на аутоматском хематолошком анализатору *Phoenix NCC-30 VET (NeoMedica bioscience technology, Србија)*. Анализирани су:

- **параметри беле крвне лозе** – број белих крвних зрнаца (*WBC*), број лимфоцита (*LYM*), укупан број моноцита, базофила и еозинофила (*MID*), број гранулоцита (*GRA*);
- **параметри црвене крвне лозе** – број црвених крвних зрнаца (*RBC*), концентрација хемоглобина (*HGB*), вредност хематокрита (*HCT*), затим еритроцитни индекси, просечни ћелијски волумен (*MCV*), средња вредност концентрације хемоглобина по еритроцити (*MCH*), средња вредност концентрације хемоглобина по запремини еритроцита (*MCHC*);
- **параметри крвих плочица** – број тромбоцита (*PLT*).

За одређивање основних биохемијских параметара коришћени су серуми из узорака крви који су изоловани центрифуговањем пуне крви у епрувети са гелом за изолацију серума на $1000\text{--}2000 \times g$ током десет минута. Изоловани серум је пребациван у стерилне епруветице и допреман у Лабораторију за клиничку хематологију и биохемију Катедре за болести папकारа Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, а вишак серума чуван на температури од $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ за друге анализе. Основне биохемијске анализе крви извршене су на аутоматском биохемијском анализатору *A15 – Random access automatic analyzer (Biosystems reagents and instruments inc., Шпанија)*. Праћени су следећи биохемијски параметри:

- укупни протеини (*TP*),
- албумини (*ALB*),
- уреа (*UREA*),
- креатинин (*CREA*),
- укупни билирубин (*TBIL*),
- триглицериди (*TRIG*),
- аспартат аминотрансфераза (*AST*),
- аланин аминотрансфераза (*ALT*),
- алкална фосфатаза (*AP*),
- гама глутамил трансфераза (*GGT*),
- лактат дехидрогеназа (*LDH*),
- креатин киназа (*CK*).

4.2.8. Одређивање концентрације биомаркера *NT-proBNP*

За одређивање концентрације *NT-proBNP* коришћен је серум из узорка крви који је изолован центрифуговањем пуне крви у епрувети са гелом за изолацију серума на 3000 до 5000 g током десет минута. Одређивање концентрације *NT-proBNP* изведено је на флуоресцентном имуноесеј анализатору (*Vcheck V200, Bionote, Јужна Кореја* – Слика 6) коришћењем уређаја за тестирање *Vcheck canine NT-proBNP (Vcheck canine NT-proBNP, Bionote, Јужна Кореја* – Слика 7) према упутству произвођача. *Vcheck canine NT-proBNP* тест је флуоресцентни имунски тест који се користи за квантитативно мерење концентрације биомаркера *NT-proBNP*. Овај тест се заснива на везивању антитела усмерених против имуноглобулина паса за специфична антитела против псећег *NT-proBNP* која су обележена коњугованом бојом.



Слика 6. Флуоресцентни имуноесеј анализатор (*Vcheck V200*, *Bionote*, Јужна Кореја)

Узорак серума пса у количини од 100 μl мешан је са 100 μl разблаживача добијеног од стране произвођача у микроепрувети. Затим је разблажени серум у количини од 100 μl додаван у отвор за узорак на уређају за тестирање који је убациван у анализатор. Након отпочињања реакције, антитела против псећег *NT-proBNP* коњугована флуоресцентном бојом везују се за *NT-proBNP* из псећег серума и формирају комплексе. Смеша са формираним комплексима мигрира дуж нитроцелулозне мембране и на њој се везује за анти-антитела против псећих имуноглобулина, што ствара сигнал у виду тест линије. Густина тест линије одражава концентрацију *NT-proBNP* у серуму паса. Анализатор *Vcheck V200* очитава густину тест линије и израчунава концентрацију *NT-proBNP* на основу података добијених у односу на калибрациону криву. Контролна линија је референтна линија која показује да је тест исправан. На основу истраживања *Harr* и *сар. (2022)* референтне вредности *NT-proBNP* за здраве псе су постављене на $< 900 \text{ pmol/l}$, док концентрација већа од 1800 pmol/l представља индикацију за присуство срчаног обољења, а већа од 2700 pmol/l указује на присуство хроничне срчане инсуфицијенције (*de Lima* и *Ferreira, 2017*).



Слика 7. Уређај за тестирање *Vcheck canine NT-proBNP* (*Vcheck canine NT-proBNP*, *Bionote*, Јужна Кореја)

4.2.9. Одређивање концентрације биомаркера *D-dimer*

За одређивање концентрације *D-dimera* коришћена је плазма из узорака крви која је изолована центрифуговањем пуне крви у епрувети са литијум-хепарином као антикоагулансом на $1000-2000 \times g$ током десет минута. Одређивање концентрације *D-dimera* изведено је на флуоресцентном имуноесеј анализатору (*Vcheck V200*, *Bionote*, Јужна Кореја – Слика 6) коришћењем уређаја за тестирање *Vcheck canine D-dimer* (*Vcheck canine D-dimer*, *Bionote*, Јужна Кореја – Слика 8) према упутству произвођача. *Vcheck D-dimer* тест (*Vcheck canine D-dimer*, *Bionote*, Јужна Кореја) је флуоресцентни имунски тест који се користи за квантитативно мерење концентрације *D-dimera* код паса. *Vcheck D-dimer* тест користи специфична антитела против псећег *D-dimera* коњугована флуоресцентном бојом, акоја се везују за *D-dimer* из узорка плазме. На нитроцелулозној мембрани уређаја за тестирање везана су специфична антитела против псећих имуноглобулина – анти-антитела. Процедура испитивања укључује растварање флуоресцентних микрочестица коњугованих са овим специфичним антителима против *D-dimera* у разблаживачу за анализу, а која се везују за псећи *D-dimer* у узорку. Узорак крвне плазме у количини од $5 \mu\text{l}$ помеша се са $95 \mu\text{l}$ разблаживача и добијени раствор се у количини од $100 \mu\text{l}$ нанесе у отвор за узорак на уређају за тестирање, при чему настају комплекси обележених антитела против *D-dimera* и псећег *D-dimera* у узорку. Ови комплекси мигрирају дуж нитроцелулозне мембране и долази до специфичног везивања обележених специфичних антитела (против *D-dimera*) и анти-антитела на нитроцелулозној мембрани, формирају се имунски комплекси и настаје сигнал у виду тест линије. Као резултат, густина тест линије одражава концентрацију *D-dimera* у узорку. Анализатор *Vcheck V200* читава густину ове тест линије и израчунава концентрацију *D-dimer*-а на основу података добијених у односу на калибрациону криву. Контролна линија је референтна линија која показује да је тест исправан. Референтне вредности за *D-dimer* код здравих паса утврђене су на основу претходне студије *Carretón* и сар. (2013а), као мање од $0,2 \mu\text{g/ml}$.



Слика 8. Уређај за тестирање *Vcheck canine D-dimer* (*Vcheck canine D-dimer*, *Bionote*, Јужна Кореја)

4.3. Одређивање параметара оксидативног стреса

Одређивање активности антиоксидативних ензима супероксид дисмутаза (*SOD*), каталаза (*CAT*) и глутатион С-трансфераза (*GST*), као и концентрације малондиалдехида (*MDA*) обављено је спектрофотометријски на апарату *UV/VIS Spectrophotometer BK-S390 (BIOBASE, Кина)*. За одређивање параметара оксидативног стреса коришћена је плазма из узорка крви која је изолована центрифуговањем пуне крви у епрувети са литијум-хепарином као антикоагулансом на 3000-5000 rpm током десет минута. Аликвоти добијене плазме коришћени су за даље анализе.

4.3.1. Одређивање активности ензима супероксид дисмутаза (*SOD*)

Активност ензима супероксид дисмутаза (*SOD*) у плазми паса анализирана је адреналинском методом према *Misra и Fridovich (1972)*, која се базира на способности *SOD* да у алкалној средини (*pH* 10,2) спречи аутооксидацију адреналина у адренохром. Супероксид дисмутаза катализује реакцију дисмутације супероксидних радикала ($O_2^{\bullet-}$) при чему настаје водоник пероксид. Реакциона смеша се састоји од 0,2 ml узорка, 1,6 ml карбонатног пуфера (карбонатни пуфер и *EDTA* растворени у дејонизованој води; *pH* 10,2) и 0,2 ml адреналина (*Sigma-Aldrich, САД*). Мерење промена апсорбанције рађено је сваких 60 секунди у току три минута на 480 nm, при амбијенталној температури од 25 °C.

Активност ензима *SOD* у релативним јединицама се израчунава преко следеће пропорције:

$$0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A_{\text{анализе/мин}})] : X$$

Да би се добила активност *SOD* у 1 ml плазме вредност добијена преко поменуте пропорције се множи са разблажењем узорка (V_{uk} / V_{uz}).

$$\text{Специфична активност (U/ml)} = X \times \frac{V_{rs}}{V_{uz}}$$

где је *X* – тражена вредност ; V_{uz} – запремина узорка; V_{rs} – запремина реакционе смеше.

Релативна јединица активности ензима *SOD* је дефинисана као она активност која под одређеним условима инхибише аутооксидацију адреналина за 50%. Резултати активности *SOD* у плазми паса добијени у описаној реакцији изражавају се у интернационалним јединицама по милилитру плазме (U/ml).

4.3.2. Одређивање активности ензима каталаза (*CAT*)

Одређивање активност ензима каталаза (*CAT*) вршено је помоћу супстрата водоник пероксида у узорцима плазме инфузираних паса методом по *Aebi (1984)*. Принцип методе се заснива на спектрофотометријском праћењу разградње H_2O_2 на таласној дужини 240 nm, јер функција ензима каталаза је катализација реакције разградње водоник пероксида до кисеоника и молекула воде. Раствор H_2O_2 у количини од 3 ml пипетиран је у кивету, и након тога додато је 10–60 μ l узорка, односно она количина плазме која доводи до промене средње вредности апсорбанце у опсегу од 0,03 до 0,06. Након тога разградња H_2O_2 при таласној дужини 240 nm праћена је спектрофотометријски на сваких 30 секунди током три минута, на температури 25 °C. Јединица активности ензима каталаза изражена у интернационалној јединици по милилитру крвне плазме (U/ml), описује се као активност која је потребна за разградњу 1 M водоник

пероксида у трајању 60 секунди у неутралној средини (pH 7,0) на температури 25 °C. Активност каталазе је израчуната помоћу формуле:

$$\text{Специфична активност (U/ml)} = \frac{\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}}{43,6 \times V_{uz}/V_{rs}}$$

где је ΔA_{uz} – промена апсорбанце у минути за узорак; ΔA_{sp} – промена апсорбанце у минути за слепу пробу; V_{uz} – запремина узорка; V_{rs} – запремина реакционе смеше; 43,6 – моларни екстинкциони коефицијент за водоник пероксид на таласној дужини 240 nm.

4.3.3. Одређивање активности ензима глутатион С-трансферазе (GST)

Активност ензима глутатион С-трансферазе (GST) је одређена по методи према Habig и сар. (1974) са супстратом 1-хлоро-2,4-динитробензеном (*chlorodinitrobenzen* – CDNB). Метода се базира на стварању комплекса глутатиона и CDNB катализовањем реакције од стране глутатион С-трансферазе. На спектрофотометру се прати време стварања комплекса на таласној дужини 340 nm. Мешавина сачињена из 1 ml дестиловане воде, 300 μ l фосфатног пуфера (0,5 M, pH 6,5), 150 μ l 20 mM глутатиона, 50 μ l CDNB и 25 μ l плазме је пипетирана у кварцну кивету и затим постављена на мешалицу. Тако припремљена мешавина стављена је у одговарајуће лежиште у спектрофотометру и очитавана је апсорбанца на таласној дужини 340 nm сваких 30 секунди током три минута на 25 °C. Активност GST се изражава интернационалним јединицама на милилитар плазме која се добија израчунавањем помоћу моларног екстинкционог коефицијента за CDNB који износи 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

$$\text{Специфична активност (U/ml)} = \frac{\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}}{9,6 \times V_{uz}/V_{rs}}$$

где је ΔA_{uz} – промена апсорбанце у минути за узорак; ΔA_{sp} – промена апсорбанце у минути за слепу пробу; V_{uz} – запремина узорка; V_{rs} – запремина реакционе смеше; 9,6 – моларни екстинкциони коефицијент за CDNB.

4.3.4. Одређивање концентрације биомаркера малондиалдехида (MDA)

Концентрација малондиалдехида (MDA) у плазми спектрофотометријски је одређивана на таласној дужини 535 nm по методи по Girotti и сар. (1991). Принципи методе заснива се на апсорпционом максимуму комплекса малондиалдехида и тиобарбитурне киселине на таласној дужини 535 nm у киселој средини. У плазми током реакције MDA и тиобарбитурне киселине настају једињења жуте боје, чија се количина одређује спектрофотометријски. У реакциону смешу додавано је 300 μ l узорка и 600 μ l TBA реагенса. У воденом купатилу смеша је инкубирана на температури 95 °C током 15 минута, а након тога охлађена на леду у трајању пет минута. Раствор је затим центрифугован на 3000 rpm током десет минута и одређивана је апсорпција насталог производа реакције на таласној дужини 535 nm. Моларни коефицијенти екстинције за комплекс MDA-тиобарбитурна киселина који износи 1,56 $\times 10^5$ / mol \times cm коришћен је за израчунавање концентрације малондиалдехида која је изражена у nmol/ml плазме.

$$\text{Концентрација (nmol/ml)} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs}}{1,56 \times V_{uz}}$$

где је ΔA_{uz} – промена апсорбанце у минути за узорак; ΔA_{sp} – промена апсорбанце у минути за слепу пробу; V_{uz} – запремина узорка; V_{rs} – запремина реакционе смеше; 1,56 – моларни екстинкциони коефицијент за комплекс MDA-тиобарбитурна киселина.

4.4. Одређивање степена оштећења ДНК у леукоцитима паса помоћу комет теста

4.4.1. Припрема предметног стакла

Степен оштећења ДНК домаћина процењиван је применом базног комет теста. За извођење ове методе коришћено је предметно стакло са једним матираним делом. Стакла су опрана у раствору детерџента, како би се максимално уклонила евентуална масноћа, а затим испирани у дестилованој води. Након испирања предметна стакла су потапана у 96% алкохол у трајању од 12–24 сата. По истеку поменутог периода, стакла су стерилисана на пламенику и одмах утапана у 1% раствор агарозе нормалне тачке топљења (*normal melting point agarose* – *NMPA*, *Sigma*, САД). Доња страна предметног стакла је обрисана папирним убрусом и потом су хоризонтално постављана у кутије са поклопцем, адекватно обележена графитном оловком и остављана најмање 48 сати на собној температури (20–23 °С) како би агарозни гел очврсно. Тако припремљена предметна стакла чувана су у кутијама заштићеним од прашине и других нечистоћа до даље употребе.

4.4.2.1. Припрема и третман леукоцита паса за извођење *in vivo* комет теста

Процена степена оштећења ДНК паса вршена је на ћелијама из пуне крви. По узорковању и допремању крви са литијум-хепарином као антикоагулансом у лабораторију, 6 μl пуне крви је мешано са 100 μl 0,67% агарозе ниске тачке топљења (*low melting point agarose* – *LMPA*, *Sigma*, САД). Затим је 90 μl добијене суспензије наносено на претходно обележена и припремљена предметна стакла са првим слојем агарозе, а суспензија је прекривана покровним стаклом. Како би други слој агарозе са ћелијама очврсно, предметна стакла су одлагана у фрижидер на +4 °С у трајању пет минута. Након тога, покровна стакла су уклањана, при чему се водило рачуна да не дође до оштећења формираног слоја агарозе са ћелијама, а затим је додавана 0,5% агароза ниске тачке топљења у количини од 90 μl , прекривана је покровним стаклом и одлагана у фрижидер на +4 °С у трајању пет минута како би и последњи (трећи) слој агарозе очврсно.

4.4.2.2. Припрема и третман леукоцита паса за извођење *ex vivo* комет теста

За потребе испитивања отпорности ДНК из леукоцита паса на дејство познатог мутагена (H_2O_2) извођен је *ex vivo* комет тест. Ова метода подразумева модификацију стандардне припреме ћелија, где је у кораку прављења другог агарозног слоја (из претходно описане методе у потпоглављу 4.6.2.1.), поред агарозе и ћелија додавано и 100 μm водоник пероксида (доказани мутаген), након чега су предметна стакла остављена у инкубатору на температури +38 °С у трајању 30 минута. Након третмана познатим мутагеном (H_2O_2), предметна стакла су испрана у раствору $1 \times \text{PBS}$, и последњи (трећи) слој агарозе је формиран као што је претходно описано код *in vivo* методе.

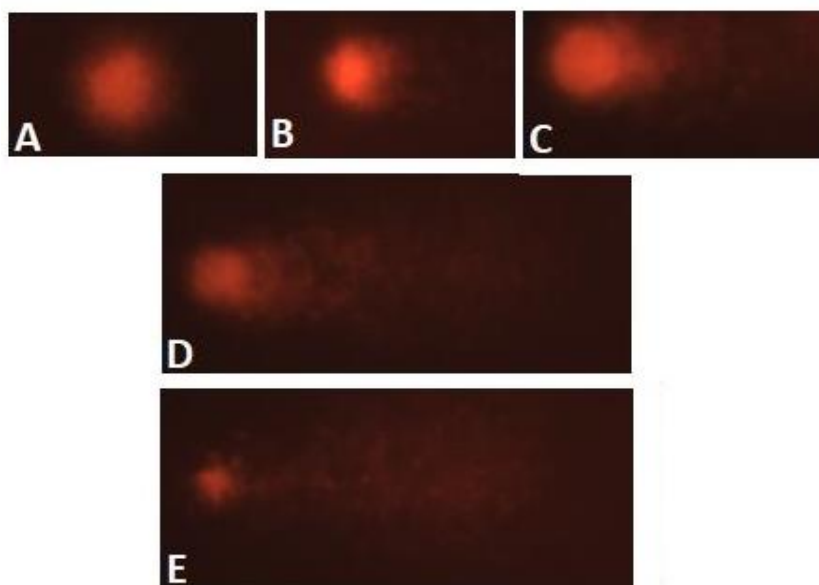
4.4.3. Извођење комет теста

Према протоколима описаним у истраживањима изведеним од стране *Singh* и сар. (1988), као и *Tice* и сар. (2000) изведена је метода комет теста. Претходно припремљена предметна стакла, како у оквиру *in vivo* тако и *ex vivo* методе, утапана су у свеже припремљен и охлађен лизирајући раствор вредности *pH* 10 (лизирајући раствор је садржао 2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris *pH* 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO) и остављана 12 сати у фрижидеру на

температури +4 °C. Након процеса лизе ћелија, стакла су постављена у кадицу за хоризонталну гел електрофорезу и преливана хладним пуфером за електрофорезу (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). Одмотавање ДНК ланца одиграва се у истом раствору (pH > 13) који се у даљем току анализе користи за електрофорезу. Како би се омогућило одмотавање ДНК ланца предметна стакла су остављена у раствору током 30 минута. Након тога, електрофореза је извођена при температури +4°C, јачини струје 300 mA и напону 25V (1,1 V/cm) у трајању 30 минута. Како би се избегло додатно оштећење ДНК ултраљубичастим зрацима, сви поменути поступци су рађени у замраченој просторији. Након извршене електрофорезе, предметна стакла су испрана неутрализујућим пуфером (0,4M Tris HCl, pH 7,5) три пута по пет минута. Након процеса неутрализације, стакла су потапана у хладну дестиловану воду у трајању 15–20 минута, а затим бојена етидијум бромидом (20 µg/ml). За анализу добијених комета коришћен је флуоресцентни микроскоп (*Axiolmager Z1, Carl Zeiss*, Немачка; ексцитациони филтер 515–560 nm; емисиони филтер 590 nm). Од сваког узорка анализирано је по 100 насумично одабраних ћелија. Анализу је радила увек иста особа коришћењем визуелне методе, без знања о ком се узорку ради. За квалитативну процену комета коришћена је метода према *Anderson и сар. (1994)* и исте су сврставне у пет класа зависно од степена оштећења, а резултати су представљени као укупни скор комета (*total comet score – TCS*) према *Collins (2004)*. Пет класа комета (Слика 9) зависно од оштећења је означено на следећи начин:

- А – без оштећења, односно мање од 5%;
- Б – оштећења ниског степена, 5 до 20%;
- Ц – оштећења средњег степена, 20 до 40%;
- Д – оштећења високог степена, 40 до 95%;
- Е – тотално оштећење ДНК, односно преко 95%,

а вредности *TCS* су израчунаване према формули: $TCS = 1 \times Б + 2 \times Ц + 3 \times Д + 4 \times Е$, где Б до Е представља број ћелија са различитим нивоима оштећења ДНК.



Слика 9. Класификација комета зависно од степена оштећења. А – без оштећења односно мање од 5%; В – оштећења ниског степена од 5 до 20%; С – оштећења средњег степена, 20 до 40%; Д – оштећења високог степена, 40 до 95%; Е – тотално оштећење ДНК односно преко 95%.

4.5. Место и време истраживања

Све анализе су изведене у лабораторијама Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду у периоду од октобра 2021. до јануара 2023. године. У Лабораторији за генетику животиња Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду спроведене су анализе: PCR, qPCR, одређивање параметара оксидативног стреса, процена степена оштећења ДНК паса, концентрације биомаркера *NTproBNP* и *D-dimera*. У Лабораторији за хематолошку дијагностику Катедре за паразитологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду рађен је модификовани Нотов тест, док су у Лабораторији за клиничку хематологију и биохемију Катедре за болести папкара Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду извршене хематолошке и биохемијске анализе.

4.6. Статистичка обрада података

Подаци за старост, телесну масу, PCR, qPCR, Нотов тест, *in vivo TCS*, *ex vivo TCS*, параметре оксидативног стреса (*SOD*, *CAT*, *GST*, *MDA*), хематолошке и биохемијске параметре, *NTproBNP* и *D-dimer* су тестирани на нормалност користећи *Shapiro-Wilk's* тест. С обзиром на то да подаци за *TCS* нису били нормално дистрибуирани (*Shapiro-Wilk's*, $p < 0,05$), примењена је \log_{10} трансформација. За старост, телесну масу, PCR, qPCR, Нотов тест, *in vivo TCS*, *ex vivo TCS* и параметре оксидативног стреса (*SOD*, *CAT*, *GST*, *MDA*) групе су поређене користећи двосмерну ANOVA са поновљеним мерењима у једном фактору, праћену *Tukey* тестом. За хематолошке и биохемијске параметре, *NTproBNP* и *D-dimer* подаци нису били нормално дистрибуирани (*Shapiro-Wilk's* тест, $p > 0,05$) те су поређени између група током времена користећи *Kruskal-Wallis* тест, праћен *Dunn* тестом, а унутар групе током времена користећи *Friedman* тест, праћен *Dunn* тестом. Значајна разлика је пронађена на нивоима значајности $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$. Статистичка анализа експерименталних резултата обављена је користећи статистички софтвер *GraphPad Prism 7.0* (*GraphPad, San Diego, CA, САД*).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Старост паса

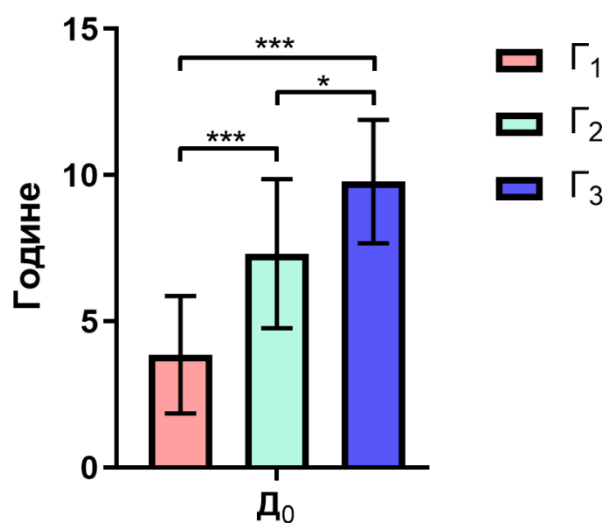
Старост паса укључених у ово истраживање била је у распону од 1–13 година, са просечном старашћу од $6,85 \pm 3,21$ година. Старост у групи Γ_1 била је у распону од 1–8 година, у групи Γ_2 од 4–11,5 година, а у групи Γ_3 од 7–13 година. Просечна старост асимптоматских паса, паса са средњом и паса са тешком клиничком сликом, била је $3,86 \pm 2,01$; $7,32 \pm 2,55$ и $9,78 \pm 2,11$ година, редом (Табела 5).

Табела 5. Старост паса укључених у истраживање (средња вредност \pm SD) приказана по експерименталним групама и периодима терапије.

Групе	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	$3,86 \pm 2,01$	$4,16 \pm 2,01$	$4,36 \pm 2,01$
Γ_2	14	$7,32 \pm 2,55$	$7,62 \pm 2,55$	$7,82 \pm 2,55$
Γ_3	9	$9,78 \pm 2,11$	$10,08 \pm 2,11$	$10,28 \pm 2,11$

Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Поређењем старости паса међу експерименталним групама установљено је постојање статистички значајних разлика (Графикон 1). Пси са тешком клиничком сликом (Γ_3) били су значајно старији у односу на псе са испољеном средњом клиничком сликом односно групу Γ_2 ($p < 0,05$), као и у односу на групу Γ_1 коју су чинили пси без испољених симптома болести ($p < 0,001$). Када се упореде пси са средњом клиничком сликом (Γ_2) и асимптоматски пси (Γ_1) може се видети да су пси са средњом клиничком сликом били значајно старији у односу на асимптоматске псе ($p < 0,001$).



Графикон 1. Старост паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* по испитиваним групама на презентацији. D_0 – пре терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.2. Телесна маса паса

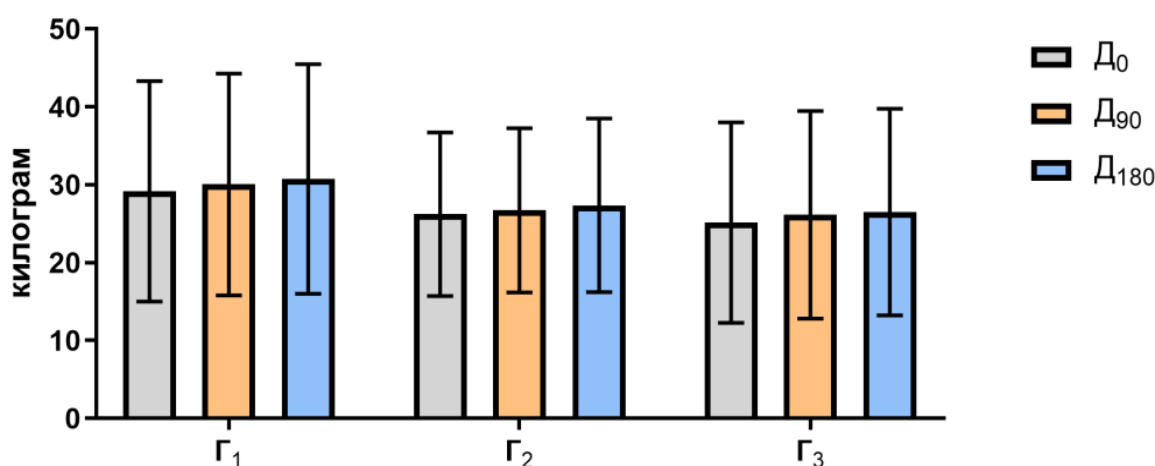
Анализом података о телесној маси паса укључених у ово истраживање на презентацији установљено је да се кретала у распону од 2–50 kg, са просечном телесном масом од $26,88 \pm 12,12$ kg. Телесна маса паса у групи Γ_1 била је у распону од 2–48,4 kg, у групи Γ_2 од 14–45 kg, а у групи Γ_3 од 6,3–50 kg. Просечна телесна маса асимптоматских паса, паса са средњом и паса са тешком клиничком сликом, била је $29,15 \pm 14,15$ kg; $26,22 \pm 10,49$ kg и $25,13 \pm 12,88$ kg, редом (Табела 6).

Табела 6. Телесна маса паса у килограмима (средња вредност \pm SD) приказана по експерименталним групама и периодима терапије.

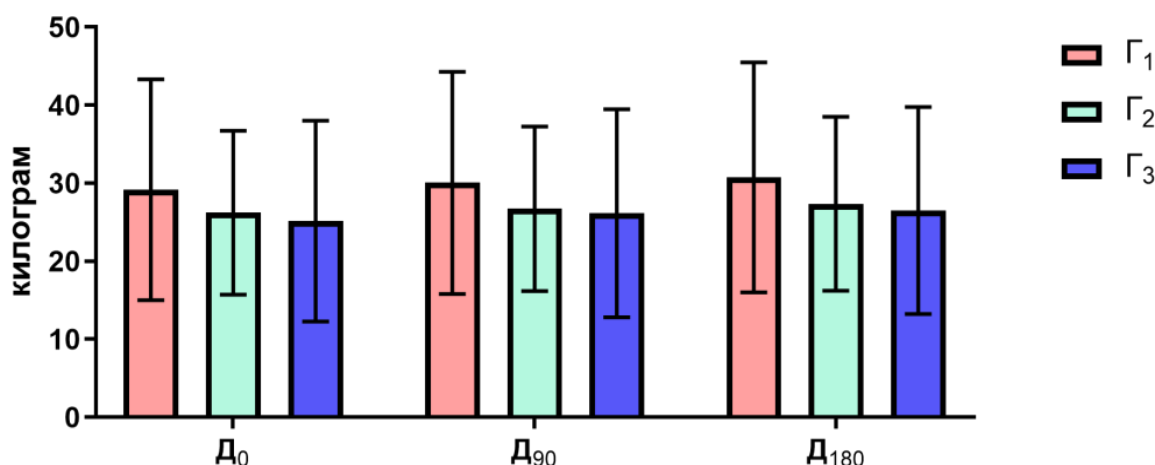
Групе	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	$29,15 \pm 14,15$	$30,06 \pm 14,23$	$30,73 \pm 14,73$
Γ_2	14	$26,22 \pm 10,49$	$26,74 \pm 10,54$	$27,37 \pm 11,13$
Γ_3	9	$25,13 \pm 12,88$	$26,13 \pm 13,33$	$26,49 \pm 13,27$

Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Поређењем просечне телесне масе паса укључених у истраживање двосмерна ANOVA са поновљеним мерењем у једном фактору, праћена Tukey тестом није показала значајне разлике ($p > 0,05$), нити између периода терапије у појединачним групама (Графикон 2), нити међу групама у различитим периодима терапије (Графикон 3).



Графикон 2. Просечна телесна маса паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређена по различитим периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом.



Графикон 3. Просечна телесна маса паса природно инфицираних са *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређена по експерименталним групама. Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом.

5.4. Праћење броја микрофиларија применом модификованог Нотовог теста

Резултати модификованог Нотовог теста у овој студији показали су да је 73,5% (25/34) природно инфицираних паса (код којих је доказано присуство антигена) имало присутне микрофиларије у циркулацији на презентацији (Д₀), са просечним бројем од 6285,29 ± 4637,81 микрофиларија по милилитру крви. Деведесетог дана (Д₉₀), 35,29% (12/34) паса је остало позитивно у Нотовом тесту, са просечним бројем од 518,82 ± 879,46 микрофиларија по милилитру крви. На крају терапије (Д₁₈₀) ниједан пас (0%) није био позитиван на присуство циркулишућих микрофиларија (негативан Нотов тест код свих паса). Посматрано по групама, број позитивних на присуство циркулишућих микрофиларија пре (Д₀), на средини (Д₉₀) и након терапије (Д₁₈₀) приказан је у Табели 7.

Табела 7. Број и процент паса позитивних на присуство микрофиларија у крви у свим експерименталним групама и периодима терапије.

Група	n	Стање	Д ₀ n (%)	Д ₉₀ n (%)	Д ₁₈₀ n (%)
Г ₁	11	+	6 (54,55)	3 (27,27)	0 (0,00)
		-	5 (45,45)	8 (72,73)	11 (100,00)
Г ₂	14	+	10 (71,43)	7 (50,00)	0 (0,00)
		-	4 (28,57)	7 (50,00)	14 (100,00)
Г ₃	9	+	9 (100,00)	2 (22,22)	0 (0,00)
		-	0 (0,00)	7 (77,78)	9 (100,00)

Легенда: Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи, + – позитиван, - – негативан.

Код паса у групи Γ_1 , значајно већи број паса позитивних на присуство микрофиларија уочен је пре терапије (D_0) у поређењу са D_{180} ($p < 0,05$), док значајних разлика није било у поређењу са D_{90} ($p > 0,05$), као и када се упореде D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). У групи Γ_2 , био је присутан значајно већи број паса позитивних на присуство микрофиларија пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$), као и деведесетог дана терапије (D_{90}) у поређењу са D_{180} ($p < 0,01$). У овој групи значајних разлика у броју паса позитивних на присуство микрофиларија није било између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$). Код паса који су испољавали симптоме тешке клиничке слике (Γ_3) значајно већи број паса позитивних на присуство микрофиларија установљен је пре терапије (D_0) у односу на средину терапије – D_{90} ($p < 0,01$), као у периоду D_0 у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи број паса позитивних на присуство микрофиларија испитиван 90. (D_{90}) и 180. дана терапије (D_{180}) није се значајно разликовао ($p > 0,05$).

Табела 8. Просечан броја микрофиларија у милилитру крви паса у свим испитиваним периодима терапије и експерименталним групама.

Група	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	5276,36 ± 5768,23	663,64 ± 1200,83	0,00
Γ_2	14	5701,43 ± 4359,40	610,00 ± 800,14	0,00
Γ_3	9	8426,67 ± 3016,32	200,00 ± 435,77	0,00

Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Поређењем просечног броја микрофиларија (Табела 8) у милилитру крви међу групама (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3), двосмерни ANOVA тест са поновљеним мерењима у једном фактору, праћен Tukey тестом, показао је да су значајно више микрофиларија имали пси у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 пре терапије (D_0). У истом моменту терапије нису уочене значајне разлике у броју микрофиларија између паса из група Γ_1 и Γ_2 , као и између паса из група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$). Ова статистичка анализа је показала да нема значајних разлика у броју микрофиларија међу групама, ни на средини (D_{90}), ни на крају терапије – D_{180} ($p > 0,05$).

Када је упоређен просечан број циркулишућих микрофиларија код паса у групи Γ_1 , значајно већи број микрофиларија уочен је пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,001$), као и у односу на D_{180} ($p < 0,001$). Број микрофиларија код ових паса није се значајно разликовао између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). Пси у групи Γ_2 имали су значајно већи број циркулишућих микрофиларија пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,001$), као и у односу на D_{180} ($p < 0,001$). Број микрофиларија ни код ових паса се није значајно разликовао између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). Пси у групи Γ_3 имали су значајно већи број циркулишућих микрофиларија пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,001$), као и у односу на D_{180} ($p < 0,001$). Значајних разлика у броју микрофиларија код паса са тешком клиничком сликом није било између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$).

5.5. Резултати PCR анализе

Резултати PCR анализе (Слика 10) у овој студији су показали да је 92% (31/34) природно инфицираних паса било позитивно на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis* на презентацији (D_0), док је 90. дана терапије (D_{90}) 32,35% (11/34) паса остало позитивно. На крају терапијског циклуса (D_{180}) сви пси укључени у ово истраживање били су негативни на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis*.

Резултати конвенционалне PCR анализе у групама Γ_1 , Γ_2 и Γ_3 , показали су да је пре терапије (D_0) 81,82% (9/11), 92,86% (13/14) и 100% (9/9) паса било позитивно на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis*, редом (Табела 9). Деведесетог дана терапије (D_{90}), 36,36% (4/11), 35,71% (5/14) и 22,22% (2/9) паса било је позитивно на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis* у групама Γ_1 , Γ_2 и Γ_3 , редом. На крају терапије (D_{180}), сви пси у свим групама су били негативни на присуство циркулишуће ДНК микрофиларија *D. immitis* (Табела 9).

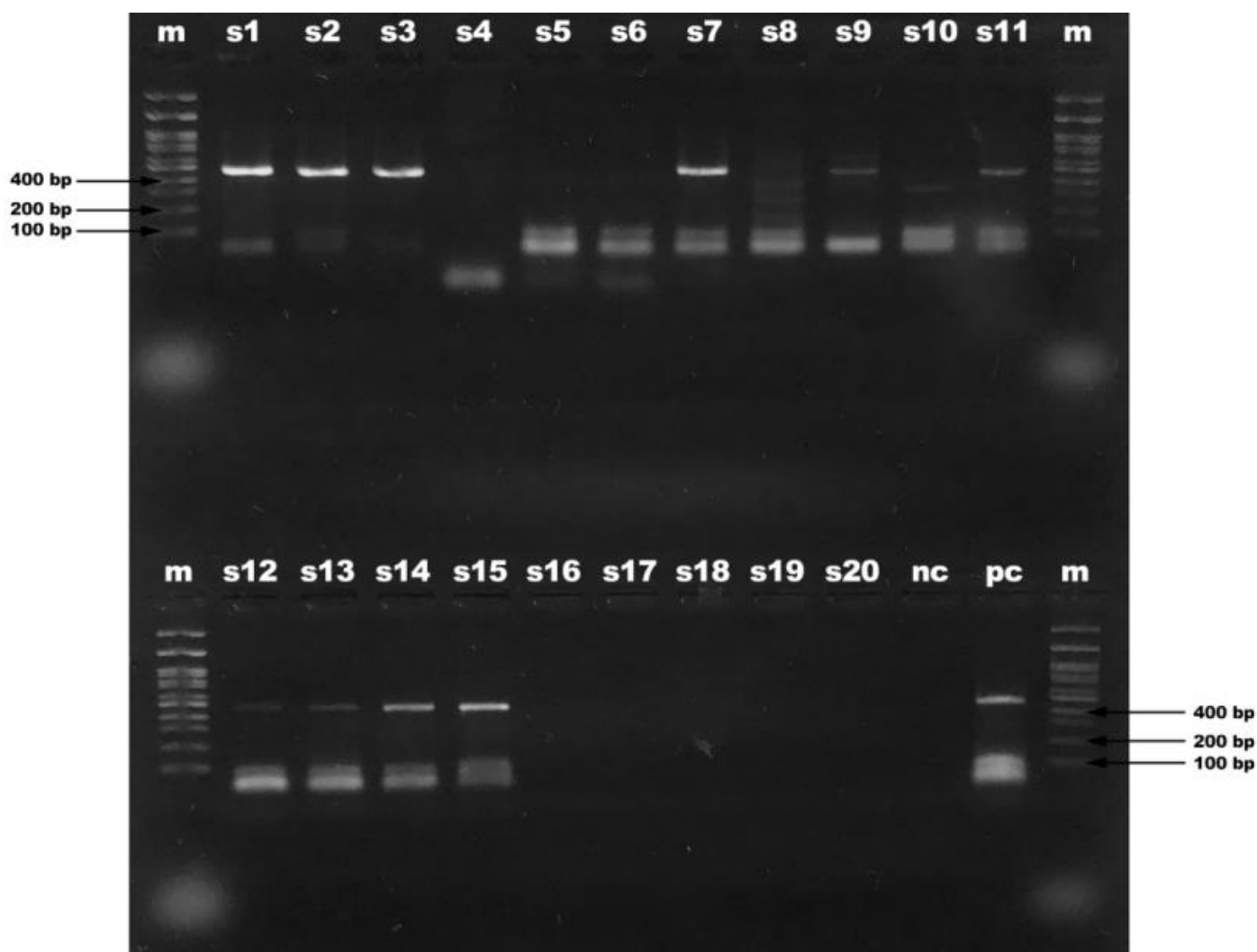
Табела 9. Резултати присуства ДНК микрофиларија у крви у свим испитиваним периодима терапије приказани по експерименталним групама.

Група	n	Стање	D_0 n (%)	D_{90} n (%)	D_{180} n (%)
Γ_1	11	+	9 (81,82)	4 (36,36)	0 (0,00)
		-	2 (18,18)	7 (63,64)	11 (100,00)
Γ_2	14	+	13 (92,86)	5 (35,71)	0 (0,00)
		-	1 (7,14)	9 (64,29)	14 (100,00)
Γ_3	9	+	9 (100,00)	2 (22,22)	0 (0,00)
		-	0 (0,00)	7 (77,78)	9 (100,00)

Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

У групи Γ_1 , коју су чинили пси без клинички испољених симптома кардиопулмоналне диофилариозе, двосмерни ANOVA тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен Tukey тестом, показао је значајно већи број позитивних узорака на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis* у узорцима пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи није било значајних разлика у броју позитивних узорака на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis* између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$), као ни између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$).

У групи Γ_2 , значајно већи број позитивних паса је откривен у D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,01$), као и у поређењу са D_{180} ($p < 0,001$), али и у узорцима узетим D_{90} у поређењу са оним узоркованим D_{180} ($p < 0,05$). Код паса у групи Γ_3 утврђен је значајно већи број PCR позитивних паса у D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,01$), и D_{180} ($p < 0,001$). Код паса у групи Γ_3 , поређењем узорака добијених на средини (D_{90}) и на крају терапије (D_{180}) нису уочене значајне разлике у броју позитивних паса ($p > 0,05$). Поређењем резултата присуства ДНК *D. immitis* у крви паса међу експерименталним групама у истом периоду лечења нису пронађене значајне разлике ни у једном од периода ($p > 0,05$).



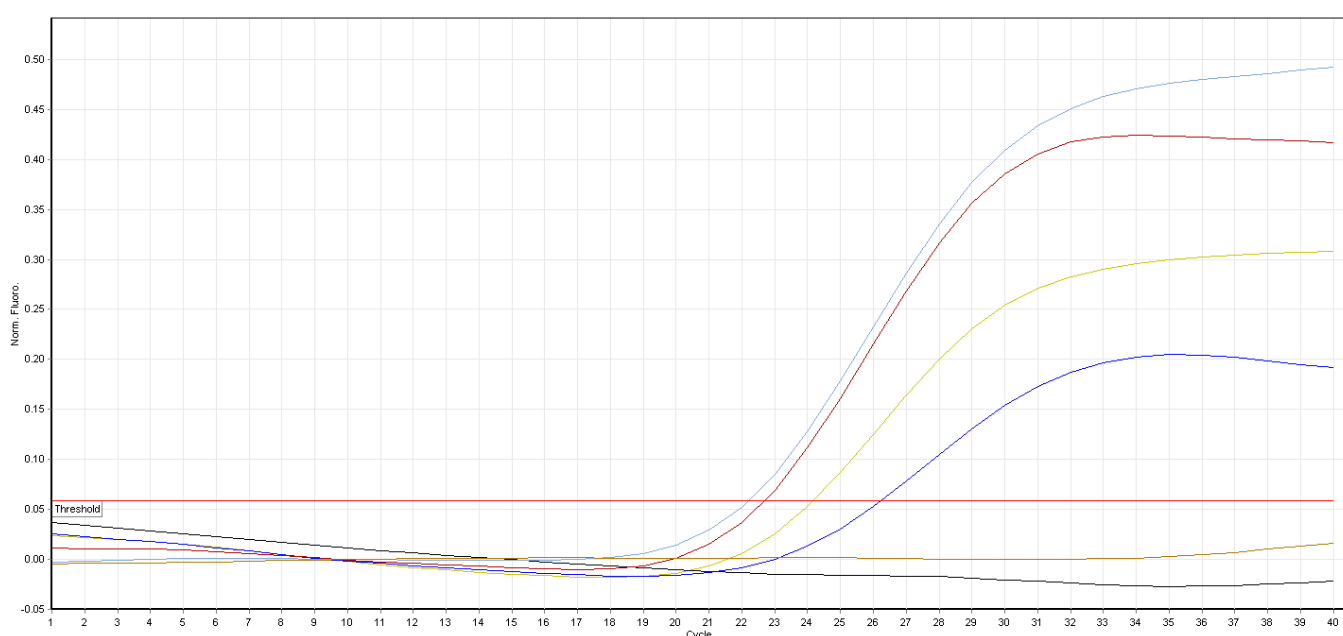
Слика 10. Електрофореограм PCR продукта региона *16S* rRNA специфичног за филарију *Dirofilaria immitis* на 2% агарозном гелу. m – ДНК маркер (100 бп); pc – позитивна контрола; nc – негативна контрола; s1–s3, s7, s9, s11–s15 – узорци позитивни на присуство ДНК *D. immitis* (440 бп); s4–s6, s8, s10, s16–s20 – узорци негативни на присуство ДНК *D. immitis* (део резултата дисертације који је публикован у часопису *Veterinary Parasitology: Rajković и sar.*, 2023).

5.6. Резултати qPCR анализе

Метода qPCR проверена је анализирањем шест узорака паса који су били негативни на брзом антигенском тесту, модификованом Нотовом тесту и конвенционалном PCR тесту, и у сваком узорку резултат qPCR теста био је негативан. Такође, на шест узорака који су били позитивни на „брзом“ имунохроматографском тесту, модификованом Нотовом тесту и конвенционалном PCR тесту, qPCR метода је потврдила присуство ДНК микрофиларија *D. immitis*. Дакле, у резултатима qPCR није било лажно позитивних нити лажно негативних налаза, па је након примене одговарајућих формула добијена осетљивост и специфичност методе 100%.

Методом qPCR (Слика 11) испитани су узорци крви свих паса укључених у ово истраживање. Налаз је био позитиван код 31/34 (92%) пса на презентацији (D_0). Сви пси са позитивним налазом конвенционалног PCR теста ($n=31$) били су позитивни и на qPCR. Деведесетог дана терапије (D_{90}), број паса код којих је квантификована ДНК микрофиларија *D. immitis* био је 11 (32%). На крају терапије (D_{180}) сви пси укључени у ово истраживање били су негативни на присуство ДНК микрофиларија *D. immitis*.

Двосмерни *ANOVA* тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен *Tukey* тестом показао је да су пси у групи Γ_1 имали значајно већу концентрација циркулишуће ДНК микрофиларија *D. immitis* у узорцима пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,05$), као и у односу на D_{180} ($p < 0,05$). У овој групи нису уочене значајне разлике у концентрацији ДНК микрофиларија *D. immitis* у крви паса узоркованој на средини терапије (D_{90}) у односу на крај терапије – D_{180} ($p > 0,05$). У групи Γ_2 , значајно већа концентрација ДНК микрофиларија *D. immitis* је откривена у периоду D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,01$), као и у поређењу са D_{180} ($p < 0,01$), док се концентрација ДНК микрофиларија *D. immitis* није значајно разликовала између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). Код паса у групи Γ_3 утврђена је значајно већа концентрација ДНК микрофиларија *D. immitis* у периоду D_0 у поређењу са D_{90} и D_{180} ($p < 0.001$). Као и у другим групама и код ових паса нису уочене значајне разлике у концентрацији амплификоване ДНК ($p > 0,05$). Поређењем резултата количине ДНК микрофиларија *D. immitis* у крви паса међу експерименталним групама у истом периоду лечења нису установљене значајне разлике ни у једном од периода ($p > 0,05$).



Слика 11. Репрезентативни приказ *qPCR* амплификационих крива ДНК *Dirofilaria immitis* екстраховане из крви паса.

5.7. Резултати основних параметара црвене крвне лозе

Резултати основних параметара црвене крвне лозе код паса укључених у истраживање, анализирани су *Kruskal-Wallis* тестом, праћени *Dunn* тестом (Табела 10). Нису уочене значајне разлике међу групама ни у једном од момената узорковања (D_0 , D_{90} , D_{180}), када су у питању број еритроцита, хематокрит, просечан садржај хемоглобина (*MCH*) и просечна концентрација хемоглобина у еритроциту – *MCHC* ($p < 0,05$). Осим тога у D_0 моменту нису установљене значајне разлике међу групама ($p > 0,05$) ни за концентрацију хемоглобина, као ни за *MCV*. Међутим, *Kruskal-Wallis* тест, праћен *Dunn* тестом, показао је значајно нижу концентрацију хемоглобина на средини терапије (D_{90}) код паса у групи Γ_3 , у односу на псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$), док између паса у групама Γ_1 и Γ_2 , као и између паса у групама Γ_2 и Γ_3 није било значајних разлика у концентрацији овог параметра ($p > 0,05$).

Значајно нижа запремина еритроцита (*MCV*) уочена је, такође, на средини терапије (D_{90}) у групи Γ_2 , у односу на псе у групи Γ_3 ($p < 0,05$), док између паса у групама Γ_1 и Γ_2 , као и између паса у групама Γ_1 и Γ_3 није било значајних разлика у концентрацији овог параметра ($p > 0,05$). На крају терапије (D_{180}) није било значајних разлика међу групама ни у једном од испитиваних параметара црвене крвне лозе ($p < 0,05$).

Табела 10. Вредности параметара црвене крвне лозе код испитаних паса у сваком периоду терапије приказане по експерименталним групама (средња вредност \pm SD).

Параметар (јединица)	Референтни опсег	Период терапије	Γ_1	Γ_2	Γ_3
Еритроцити ($10^{12}/l$)	5,5–8,5	D_0	$5,92 \pm 0,96^{Aa}$	$5,39 \pm 1,68^{Aa}$	$5,09 \pm 1,24^{Aa}$
		D_{90}	$6,41 \pm 0,65^{Aa}$	$6,03 \pm 1,03^{Aa}$	$5,71 \pm 1,34^{Aa}$
		D_{180}	$6,83 \pm 0,88^{Aa}$	$6,81 \pm 0,79^{Aa}$	$6,62 \pm 1,17^{Aa}$
Хемоглобин (g/dl)	11,00–19,00	D_0	$14,24 \pm 1,81^{Aa}$	$14,01 \pm 4,19^{Aa}$	$11,63 \pm 2,77^{Aa}$
		D_{90}	$16,04 \pm 1,47^{Aa}$	$14,41 \pm 2,01^{AaB}$	$13,44 \pm 3,41^{Ab}$
		D_{180}	$15,93 \pm 1,92^{Aa}$	$15,49 \pm 1,91^{Aa}$	$15,38 \pm 2,70^{Aa}$
Хематокрит (%)	39,0 – 56,0	D_0	$43,35 \pm 4,58^{Aa}$	$44,12 \pm 10,41^{Aa}$	$33,92 \pm 8,86^{Aa}$
		D_{90}	$46,21 \pm 5,81^{AbA}$	$43,41 \pm 4,10^{Aa}$	$39,83 \pm 8,48^{AbA}$
		D_{180}	$47,96 \pm 5,81^{Ba}$	$46,68 \pm 5,70^{Aa}$	$46,36 \pm 7,37^{Ba}$
<i>MCV</i> (fl)	62,0–72,0	D_0	$68,81 \pm 2,82^{Aa}$	$69,69 \pm 2,57^{Aa}$	$67,41 \pm 3,51^{Aa}$
		D_{90}	$69,57 \pm 3,84^{AaB}$	$68,06 \pm 2,46^{Aa}$	$71,33 \pm 3,54^{Bb}$
		D_{180}	$69,13 \pm 3,52^{Aa}$	$68,73 \pm 2,52^{Aa}$	$69,43 \pm 1,41^{AbA}$
<i>MCH</i>	20,0–25,0	D_0	$24,32 \pm 3,55^{AbA}$	$23,52 \pm 1,19^{Aa}$	$22,89 \pm 1,23^{Aa}$
		D_{90}	$24,14 \pm 0,71^{Aa}$	$24,32 \pm 3,29^{Aa}$	$23,82 \pm 1,24^{Aa}$
		D_{180}	$23,05 \pm 0,77^{Ba}$	$23,07 \pm 0,97^{Aa}$	$23,17 \pm 0,46^{Aa}$
<i>MCHC</i> (g/dl)	30,0–38,0	D_0	$35,41 \pm 4,88^{Aa}$	$33,84 \pm 1,85^{Aa}$	$34,01 \pm 0,88^{Aa}$
		D_{90}	$34,45 \pm 1,45^{Aa}$	$35,57 \pm 4,65^{Aa}$	$33,89 \pm 2,32^{Aa}$
		D_{180}	$33,78 \pm 1,86^{Aa}$	$33,81 \pm 1,24^{Aa}$	$34,39 \pm 1,61^{Aa}$

Скраћенице: *MCV* – просечна запремина еритроцита (енг. *mean corpuscular volume*); *MCH* – просечан садржај хемоглобина (енг. *mean corpuscular hemoglobin*); *MCHC* – просечна концентрација хемоглобина у еритроциту (енг. *hemoglobin concentration per red blood cell*); D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; *SD* – стандардна девијација. Велика слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих момената (D_0 , D_{90} и D_{180}) у оквиру истих група. Мала слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих група (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3) у истом моменту узорковања. Присуство истих слова говори о одсуству статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Присуство различитих слова говори о постојању статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

Када су упоређени резултати добијени унутар сваке групе (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3), а у различитим моментима (D_0 , D_{90} и D_{180}) *Friedman* тест праћен *Dunn* тестом показао је да нема значајних разлика између испитиваних периода терапије за број еритроцита, хемоглобин и *MCHC* ($p > 0,05$). Хематокрит се такође није разликовао између испитиваних периода терапије код паса у групи Γ_2 , међутим пси у групи Γ_1 имали су значајно више вредности хематокрита у периоду D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,05$), као и они у групи Γ_3 који су имали значајно веће вредности хематокрита у периоду D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,05$). Што се тиче просечне запремине еритроцита (*mean corpuscular volume* – *MCV*) значајне разлике између испитиваних периода терапије уочене су само код паса у групи Γ_3 , и ту су већу запремину еритроцита имали 90. дана терапије у односу на моменат пре почетка терапије – D_0 ($p < 0,05$). Статистички значајан пораст просечног садржаја хемоглобина (*mean corpuscular hemoglobin* – *MCH*) уочен је у D_{90} моменту (90. дана терапије) у односу на D_0 ($p < 0,05$) код паса у групи Γ_1 .

5.8. Резултати основних параметара беле крвне лозе

Резултати основних параметара беле крвне лозе код паса укључених у истраживање добијени у сваком испитиваном периоду терапије анализирани су *Kruskal-Wallis* тестом, праћеним *Dunn* тестом (Табела 11). Нису уочене значајне разлике међу групама за број лимфоцита, број *MID* ћелија и број тромбоцита ($p > 0,05$). Осим тога, значајних разлика међу групама није било ни за број леукоцита пре терапије – D_0 ($p > 0,05$). Међутим, статистички значајно већи број леукоцита уочен је 90. дана терапије (D_{90}) код паса у групи Γ_3 који су испољавали тешку клиничку слику у односу на асимптоматске псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$), као и у односу на псе у групи Γ_2 ($p < 0,05$). На крају терапије (D_{180}), значајно већи број леукоцита уочен је код паса у групи Γ_3 у односу на псе са средњом клиничком сликом – Γ_2 ($p < 0,05$). Број гранулоцита пре терапије (D_0) није се значајно разликовао међу групама ($p > 0,05$). На средини терапије (D_{90}) значајно већи број гранулоцита уочен је код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групи Γ_1 и Γ_2 ($p < 0,05$). На крају терапије број гранулоцита се није разликовао међу групама ($p > 0,05$).

Табела 11. Вредности параметара беле крвне лозе код испитаних паса у свим испитиваним периодима терапије (средња вредност \pm SD) приказани по експерименталним групама.

Параметар (јединица)	Референтни опсег	Период терапије	Γ_1	Γ_2	Γ_3
Леукоцити ($10^9/l$)	6,00–17,00	D_0	$10,73 \pm 6,66^{Aa}$	$11,12 \pm 5,22^{Aa}$	$16,21 \pm 9,98^{Aa}$
		D_{90}	$9,89 \pm 1,65^{Aa}$	$9,47 \pm 2,41^{AaB}$	$17,61 \pm 8,75^{Ab}$
		D_{180}	$11,35 \pm 2,67^{AaB}$	$9,26 \pm 3,12^{Aa}$	$12,63 \pm 3,07^{Ab}$
Гранулоцити ($10^9/l$)	4,00–12,60	D_0	$4,91 \pm 2,27^{Aa}$	$6,00 \pm 4,20^{Aa}$	$7,38 \pm 9,13^{Aa}$
		D_{90}	$5,43 \pm 2,63^{Aa}$	$4,19 \pm 2,32^{Aa}$	$9,36 \pm 5,05^{Ab}$
		D_{180}	$7,12 \pm 3,17^{Aa}$	$5,24 \pm 3,02^{Aa}$	$8,00 \pm 3,72^{Aa}$
Лимфоцити ($10^9/l$)	0,8–5,1	D_0	$3,45 \pm 2,79^{Aa}$	$3,06 \pm 1,70^{Aa}$	$3,98 \pm 1,96^{Aa}$
		D_{90}	$2,82 \pm 1,00^{Aa}$	$3,06 \pm 1,27^{Aa}$	$3,47 \pm 2,00^{Aa}$
		D_{180}	$2,76 \pm 1,09^{Aa}$	$2,38 \pm 0,64^{Aa}$	$2,64 \pm 1,05^{Aa}$
<i>MID</i> ($10^9/l$)	0,0–1,8	D_0	$2,37 \pm 2,50^{Aa}$	$2,14 \pm 1,16^{ABa}$	$4,40 \pm 3,36^{Aa}$
		D_{90}	$1,64 \pm 0,76^{Aa}$	$2,21 \pm 0,71^{Aa}$	$4,91 \pm 5,02^{Aa}$
		D_{180}	$1,48 \pm 0,77^{Aa}$	$1,64 \pm 0,65^{Ba}$	$1,99 \pm 0,60^{Aa}$
Тромбоцити ($10^9/l$)	117,0–460,0	D_0	$164,91 \pm 49,54^{Aa}$	$185,50 \pm 65,46^{Aa}$	$162,11 \pm 61,30^{Aa}$
		D_{90}	$216,09 \pm 67,83^{Aa}$	$181,43 \pm 75,22^{Aa}$	$183,67 \pm 55,43^{Aa}$
		D_{180}	$180,00 \pm 74,79^{Aa}$	$205,93 \pm 76,19^{Aa}$	$190,33 \pm 62,17^{Aa}$

Скраћенице: *MID* – ћелије средње величине (моноцити и део еозинофила); D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација. Велика слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих момената (D_0 , D_{90} и D_{180}) у оквиру истих група. Мала слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих група (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3) у истом моменту узорковања. Присуство истих слова говори о одсуству статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Присуство различитих слова говори о постојању статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

Када су упоређени резултати добијени унутар сваке групе, *Friedman* тест праћен *Dunn* тестом показао је да нема значајних разлика између испитиваних периода терапије за број леукоцита, гранулоцита и лимфоцита ($p > 0,05$). Број *MID* ћелија се, такође, није разликовао између испитиваних периода терапије код паса у групама Γ_1 и Γ_3 . Међутим, пси у групи Γ_2 имали су значајно већи број *MID* ћелија у D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$). Што се тиче броја тромбоцита, није било разлика између испитиваних периода терапије у свакој групи ($p < 0,05$).

5.9. Резултати основних биохемијских параметара

Резултати основних биохемијских параметара код паса укључених у истраживање добијени у сваком испитиваном периоду терапије анализирани су *Kruskal-Wallis* тестом, праћен *Dunn* тестом (Табели 12). Резултати су показали да нема значајних разлика међу групама када је реч о концентрацији креатинина, укупним протеинима, триглицеридима, активности аспартат аминотрансферазе (*AST*), аланин аминотрансферазе (*ALT*), гама-глутамил трансферазе (*GGT*) и креатинин киназе – *СК* ($p > 0,05$). Значајних разлика међу групама није било ни у концентрацији урее пре терапије ($p > 0,05$). Међутим, значајно већа концентрација урее уочена је 90. дана терапије (D_{90}) код паса са тешком клиничком сликом (Γ_3) у односу на псе са средњом клиничком сликом – група Γ_2 ($p < 0,05$), док на крају терапије није било значајних разлика у концентрацији овог параметра међу свим групама ($p > 0,05$). Концентрација албумина пре терапије (D_0) није се значајно разликовала међу групама ($p < 0,05$), међутим 90. дана терапије уочена је значајно већа концентрација код паса у групи Γ_1 у односу на псе у групи Γ_3 ($p < 0,05$). На крају терапије (D_{180}) значајно већа концентрација албумина уочена је код паса у групи Γ_2 у односу на псе у групи Γ_3 ($p < 0,05$). Пре терапије међу групама није било значајних разлика у концентрацији холестерола ($p > 0,05$). Међутим, значајно већа концентрација холестерола уочена је 90. дана терапије код паса са тешком клиничком сликом (Γ_3) у односу на псе са средњом клиничком сликом – Γ_2 ($p < 0,05$), као и у односу на асимптоматске псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$), док на крају терапије (D_{180}) није било значајних разлика у концентрацији овог параметра међу групама ($p > 0,05$). Пре терапије међу групама значајних разлика није било ни у активности алкалне фосфатазе ($p > 0,05$). Међутим, значајно већа активност алкалне фосфатазе уочена је 90. дана терапије (D_{90}) код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групама Γ_1 и Γ_2 ($p < 0,05$), док на крају терапије (D_{180}) није било значајних разлика у концентрацији овог параметра међу групама ($p > 0,05$). Пре терапије (D_0) значајно већу активност лактат дехидрогеназе имали су пси из групе Γ_2 у односу на псе из групе Γ_1 ($p < 0,05$). У осталим периодима терапије није било значајних разлика у активности лактат дехидрогеназе међу групама ($p > 0,05$).

Када су упоређени резултати добијени унутар сваке групе, *Friedman* тест праћен *Dunn* тестом показао је да нема значајних разлика између испитиваних периода терапије за концентрацију урее, креатинина, триглицерида, затим активности *ALP*, *GGT*, *LDH* и *СК* ($p > 0,05$). Концентрација укупних протеина се такође није разликовала између испитиваних периода терапије код паса у групама Γ_2 и Γ_3 , међутим пси у групи Γ_1 имали су значајно већу концентрацију укупних протеина у моменту D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$). Концентрација албумина није се разликовала између испитиваних периода терапије код паса у групама Γ_2 и Γ_3 . Међутим, пси у групи Γ_1 имали су значајно већу концентрацију албумина у моменту D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$). Што се тиче холестерола, концентрација се није разликовала између свих испитиваних периода терапије код паса у групама Γ_1 и Γ_2 . Међутим, код паса у групи Γ_3 уочено је значајно смањење концентрације холестерола на крају терапије (D_{180}) у односу на концентрацију измерену на средини терапије – D_{90} ($p < 0,05$). Код паса у групи Γ_1 уочен је значајан пад у активности *AST* на средини терапије (D_{90}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p < 0,05$), као и на крају терапије (D_{180}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p < 0,05$). Код паса у групама Γ_2 и Γ_3 није било значајних разлика у активности овог ензима између свих испитиваних периода терапије ($p < 0,05$). Код паса у групи Γ_3 уочен је значајан пад у активности *AST* на крају терапије (D_{180}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p < 0,05$). Код паса у групама Γ_1 и Γ_2 није било значајних разлика у активности овог ензима између свих испитиваних периода терапије ($p < 0,05$).

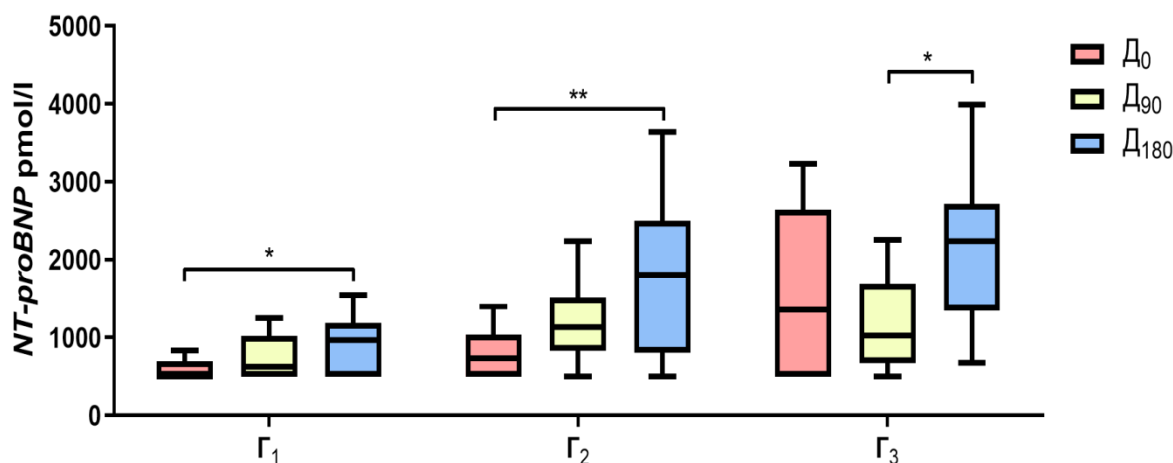
Табела 12. Вредности основних биохемијских параметара испитаних паса у свим испитиваним периодима терапије (средња вредност \pm SD) приказани по експерименталним групама

Параметар (јединица)	Референтни опсег	Дан	Γ_1	Γ_2	Γ_3
Уреа (mmol/l)	3,30–9,20	Д ₀	6,52 \pm 2,68 ^{Aa}	7,37 \pm 5,77 ^{Aa}	9,30 \pm 7,71 ^{Aa}
		Д ₉₀	6,57 \pm 1,48 ^{Aab}	6,14 \pm 2,32 ^{Aa}	8,45 \pm 2,45 ^{Ab}
		Д ₁₈₀	5,87 \pm 1,47 ^{Aa}	6,18 \pm 0,97 ^{Aa}	6,90 \pm 2,34 ^{Aa}
Креатинин (μ mol/l)	50,0–169,0	Д ₀	91,70 \pm 21,83 ^{Aa}	104,52 \pm 47,60 ^{Aa}	103,46 \pm 45,47 ^{Aa}
		Д ₉₀	97,31 \pm 22,61 ^{Aa}	102,61 \pm 29,90 ^{Aa}	115,23 \pm 35,68 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	99,68 \pm 26,85 ^{Aa}	106,76 \pm 20,28 ^{Aa}	116,53 \pm 33,83 ^{Aa}
Укупни протеини (g/l)	39,0–56,0	Д ₀	70,76 \pm 8,23 ^{ABa}	76,48 \pm 19,29 ^{Aa}	65,47 \pm 14,83 ^{Aa}
		Д ₉₀	75,97 \pm 5,56 ^{Aa}	70,85 \pm 6,74 ^{Aa}	74,37 \pm 22,23 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	68,30 \pm 8,48 ^{Ba}	71,41 \pm 4,98 ^{Aa}	65,23 \pm 12,38 ^{Aa}
Албумини (g/l)	28,0–40,0	Д ₀	39,09 \pm 8,63 ^{ABa}	39,47 \pm 8,63 ^{Aa}	31,37 \pm 10,75 ^{Aa}
		Д ₉₀	42,19 \pm 5,67 ^{Aa}	38,09 \pm 5,59 ^{Aab}	33,93 \pm 9,00 ^{Ab}
		Д ₁₈₀	37,35 \pm 5,54 ^{Bab}	40,39 \pm 6,31 ^{Aa}	32,10 \pm 7,72 ^{Ab}
Холестерол (mmol/l)	2,5–6,5	Д ₀	5,51 \pm 1,99 ^{Aa}	5,61 \pm 2,18 ^{Aa}	7,26 \pm 1,83 ^{ABa}
		Д ₉₀	5,07 \pm 1,36 ^{Aa}	4,77 \pm 0,96 ^{Aa}	7,69 \pm 3,60 ^{Ab}
		Д ₁₈₀	4,74 \pm 1,51 ^{Aa}	5,41 \pm 1,35 ^{Aa}	3,53 \pm 2,28 ^{Ba}
Триглицериди (mmol/l)	0,6–1,3	Д ₀	0,70 \pm 0,28 ^{Aa}	1,34 \pm 1,87 ^{Aa}	1,13 \pm 0,81 ^{Aa}
		Д ₉₀	0,96 \pm 0,47 ^{Aa}	1,06 \pm 0,43 ^{Aa}	1,90 \pm 2,20 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	0,88 \pm 0,20 ^{Aa}	0,80 \pm 0,31 ^{Aa}	1,17 \pm 0,35 ^{Aa}
AST (U/l)	10,0–58,0	Д ₀	85,33 \pm 50,93 ^{Aa}	121,61 \pm 212,78 ^{Aa}	94,23 \pm 58,33 ^{Aa}
		Д ₉₀	38,69 \pm 19,11 ^{Ba}	40,81 \pm 21,63 ^{Aa}	49,37 \pm 17,03 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	35,36 \pm 14,68 ^{Ba}	43,89 \pm 26,91 ^{Aa}	41,10 \pm 21,30 ^{Aa}
ALT (U/l)	10,0–50,0	Д ₀	58,71 \pm 25,82 ^{Aa}	131,81 \pm 145,08 ^{Aa}	150,60 \pm 181,11 ^{Aa}
		Д ₉₀	41,44 \pm 17,62 ^{Aa}	56,77 \pm 52,36 ^{Aa}	79,01 \pm 70,94 ^{ABa}
		Д ₁₈₀	45,50 \pm 20,80 ^{Aa}	47,68 \pm 32,88 ^{Aa}	39,61 \pm 17,49 ^{Ba}
ALP (U/l)	0,0–190,0	Д ₀	76,16 \pm 103,60 ^{Aa}	83,11 \pm 90,13 ^{Aa}	164,24 \pm 177,44 ^{Aa}
		Д ₉₀	33,14 \pm 18,61 ^{Aa}	58,31 \pm 59,50 ^{Aa}	81,31 \pm 22,00 ^{Ab}
		Д ₁₈₀	52,25 \pm 44,32 ^{Aa}	46,56 \pm 20,10 ^{Aa}	59,90 \pm 44,96 ^{Aa}
GGT (U/l)	0,0–6,0	Д ₀	2,72 \pm 1,81 ^{Aa}	7,79 \pm 8,65 ^{Aa}	9,10 \pm 18,05 ^{Aa}
		Д ₉₀	2,98 \pm 0,87 ^{Aa}	3,06 \pm 2,35 ^{Aa}	4,28 \pm 2,13 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	2,95 \pm 1,57 ^{Aa}	4,06 \pm 2,51 ^{Aa}	2,93 \pm 2,18 ^{Aa}
LDH	0,0–70,0	Д ₀	769,82 \pm 1042,99 ^{Aa}	1100,94 \pm 754,28 ^{Ab}	686,00 \pm 400,55 ^{Aab}
		Д ₉₀	1133,34 \pm 1078,06 ^{Aa}	1070,94 \pm 696,61 ^{Aa}	1180,22 \pm 649,47 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	1261,88 \pm 842,95 ^{Aa}	1112,15 \pm 592,46 ^{Aa}	1180,54 \pm 645,88 ^{Aa}
СК	40,0–254,0	Д ₀	437,82 \pm 345,65 ^{Aa}	462,40 \pm 198,02 ^{Aa}	275,77 \pm 148,12 ^{Aa}
		Д ₉₀	350,48 \pm 253,05 ^{Aa}	342,71 \pm 227,73 ^{Aa}	379,09 \pm 250,32 ^{Aa}
		Д ₁₈₀	317,72 \pm 143,34 ^{Aa}	339,93 \pm 218,32 ^{Aa}	331,73 \pm 192,90 ^{Aa}

Скраћенице: *AST* – аспартат аминотрансфераза; *ALT* – аланин аминотрансфераза; *ALP* – алкална фосфатаза; *GGT* – гама-глутамил трансфераза; *LDH* – лактат дехидрогеназа; Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација. Велика слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих момената (Д₀, Д₉₀ и Д₁₈₀) у оквиру истих група. Мала слова у суперскрипту указују на резултате поређења различитих група (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3) у истом моменту узорковања. Присуство истих слова говори о одсуству статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Присуство различитих слова говори о постојању статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

5.10. Резултати концентрације биомаркера *NT-proBNP*

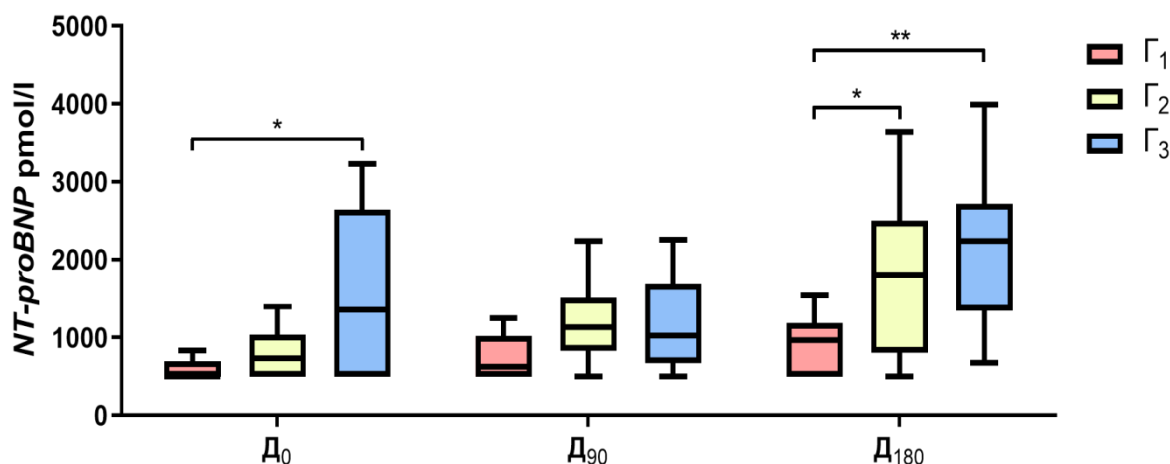
Анализом резултата концентрације *NT-proBNP* пре терапије (D_0) у крви паса из група Γ_1 и Γ_2 установљено је да су се концентрације овог биомаркера кретале у оквиру утврђених референтних вредности за здраве псе ($< 900,00$ pmol/l, *Harr* и сар., 2022) и то: $500,00$ pmol/l ($500,00$ – $692,60$) у групи Γ_1 , док је у групи Γ_2 концентрација била $736,70$ pmol/l ($500,00$ – $1038,38$). Пси са тешком клиничком сликом (Γ_3) су пре терапије имали концентрације *NT-proBNP* више од горње границе референтног опсега и то $1354,20$ pmol/l ($500,00$ – $2641,70$). Деведесетог дана терапије (D_{90}) установљено је повећање концентрације *NT-proBNP* у свим групама, али се у групи Γ_1 концентрација кретала унутар референтног опсега и износила је $622,90$ pmol/l ($500,00$ – $1019,60$). Пси у групи Γ_2 достигли су патолошке нивое *NT-proBNP* са концентрацијом од $1132,05$ pmol/l ($832,48$ – $1514,98$), док су се код паса у групи Γ_3 патолошке концентрације *NT-proBNP* задржале $1027,40$ pmol/l ($673,20$ – $1688,90$), али су биле нешто ниже него пре третмана (D_0). На крају терапије (D_{180}) све групе достигле су патолошке нивое концентрација *NT-proBNP* тако да је код паса у Γ_1 концентрација била $966,90$ pmol/l ($500,00$ – $1190,40$), код паса у Γ_2 $1807,00$ pmol/l ($802,53$ – $2497,03$), док је код паса у Γ_3 установљена концентрација од $2241,30$ pmol/l ($1346,40$ – $2716,85$). Према резултатима *Friedman* теста праћеног *Dunn* тестом (Графикон 4) пси у групи Γ_1 имали су значајно већу ($p < 0,05$) концентрацију *NT-proBNP* на крају терапије (D_{180}) у поређењу са почетком терапије – D_0 , док поређењем резултата између момената D_0 и D_{90} ($p > 0,05$), као и D_{90} и D_{180} нису уочене значајне разлике у концентрацији овог биомаркера ($p > 0,05$). Анализом резултата концентрације *NT-proBNP* у групи Γ_2 утврђена је значајно већа концентрација у D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,01$), али без значајних разлика између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$), као ни између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). У групи Γ_3 концентрација *NT-proBNP* била је значајно веће 180. дана у односу на 90. дан терапије, али без значајности између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$), као ни између D_0 и D_{180} ($p > 0,05$).



Графикон 4. Концентрације *NT-proBNP* у крви паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређене по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Поређењем резултата концентрације *NT-proBNP* на презентацији (D_0) између експерименталних група *Kruskal-Wallis* тестом, праћеним *Dunn* тестом (Графикон 5), установљена је значајно већа концентрација *NT-proBNP* код паса у групи Γ_3 у поређењу са псима из групе Γ_1 ($p < 0,05$), али без значајних разлика између паса из група Γ_1 и Γ_2 ($p > 0,05$),

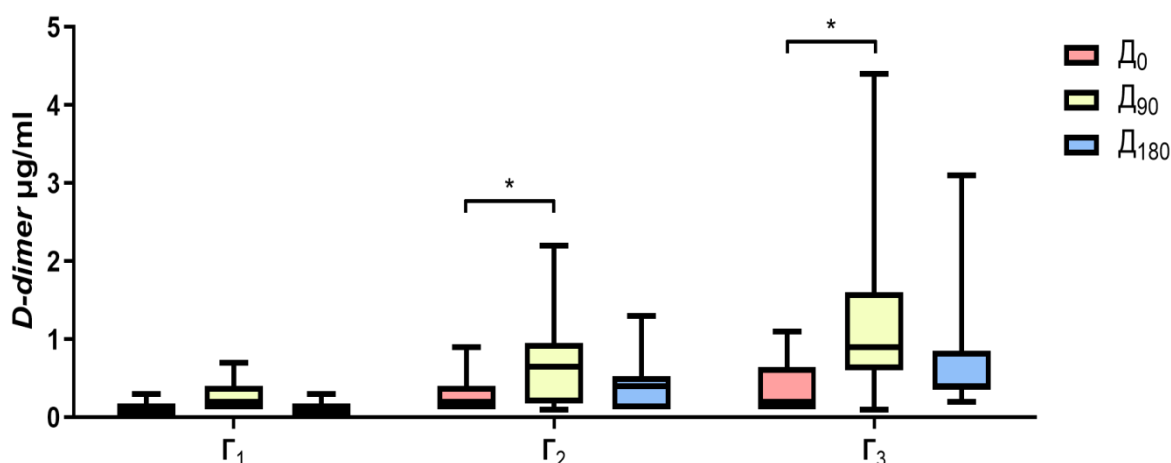
као ни између паса из група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$). Анализирајући резултате концентрације *NT-proBNP* на средини терапије (D_{90}) није уочена значајна разлика између експерименталних група ($p > 0,05$). На крају терапије (D_{180}), статистичком анализом установљене су значајно веће концентрације *NT-proBNP* у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 ($p < 0,01$), као и у групи Γ_2 у поређењу са групом Γ_1 ($p < 0,05$), али без статистичке значајности између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$).



Графикон 5. Концентрације *NT-proBNP* у крви паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређене по експерименталним групама. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

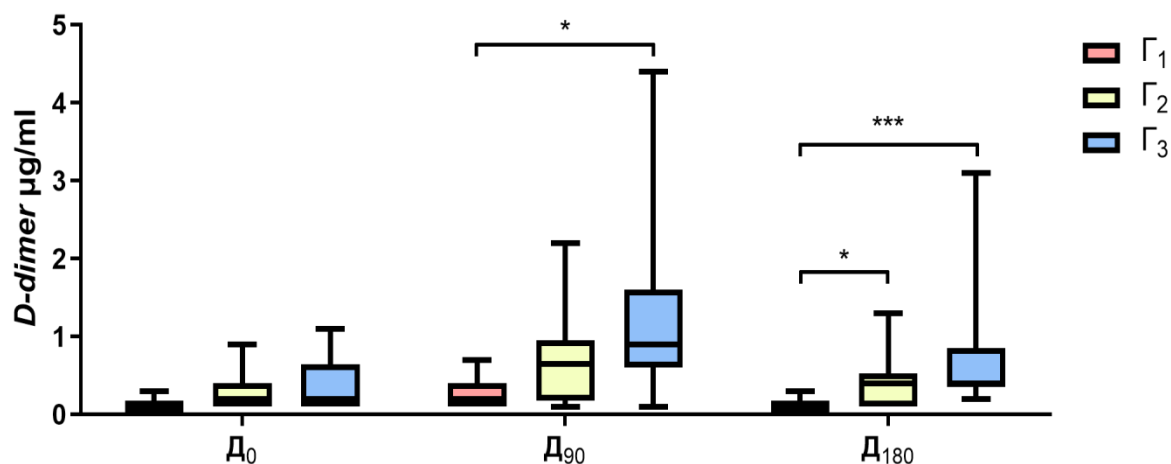
5.11. Резултати концентрација биомаркера *D-dimer*

Анализом резултата концентрације *D-dimera* пре третмана (D_0) у крви паса установљене су концентрације у оквиру утврђених референтних вредности ($< 0,2 \mu\text{g/ml}$, Carretón и сар., 2013а) за све три експерименталне групе и то: $0,10 \mu\text{g/ml}$ ($0,10\text{--}0,10$) код паса у групи Γ_1 ; $0,20 \mu\text{g/ml}$ ($0,10\text{--}0,40$) у Γ_2 и $0,20 \mu\text{g/ml}$ ($0,1\text{--}0,65$) у Γ_3 групи. Неки пси у групама Γ_1 , Γ_2 и Γ_3 су имали патолошке вредности јер су максималне концентрације измерене у овим групама биле $0,30$; $0,90$ и $1,10 \mu\text{g/ml}$, редом. Деведесетог дана терапије (D_{90}) концентрација *D-dimera* се повећала у свакој групи, а само у групи Γ_1 је остала унутар референтног опсега за здраве псе и износила је $0,20 \mu\text{g/ml}$ ($0,10\text{--}0,40$). Пси у групама Γ_2 и Γ_3 достигли су патолошке нивое *D-dimera* у овом периоду терапије са концентрацијама од $0,65 \mu\text{g/ml}$ ($0,18\text{--}0,95$) и $0,90 \mu\text{g/ml}$ ($0,60\text{--}1,60$), редом. На крају третмана (D_{180}), у свим експерименталним групама концентрација *D-dimera* се смањила, али је код паса у групама Γ_2 ($0,10\text{--}0,53$) и Γ_3 ($0,35\text{--}0,85$) остала изнад горње границе референтног опсега и износила је $0,40 \mu\text{g/ml}$. У групи Γ_1 концентрација *D-dimera* се смањила и вратила у оквиру референтних вредности за здраве псе на $0,1 \mu\text{g/ml}$ ($0,10\text{--}0,10$). Поређењем концентрације *D-dimer-a* код паса из групе Γ_1 Friedman тестом праћен Dunn тестом нису установљене значајне разлике између испитиваних периода терапије ($p > 0,05$) што је приказано у Графикону 6. Анализирајући резултате концентрације *D-dimera* код паса у групи Γ_2 , утврђене су значајно веће концентрације 90. дана терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p < 0,05$). Без значајних разлика биле су вредности у узорцима узетим у D_0 моменту у односу на крај терапије – D_{180} ($p > 0,05$), као и између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). У групи Γ_3 концентрације *D-dimera* су поново биле значајно веће у D_{90} у односу на D_0 ($p < 0,05$), али без статистичке значајности између D_0 и D_{180} ($p > 0,05$), као и између D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$).



Графикон 6. Концентрације *D-dimera* у крви паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређене по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Поређењем концентрације *D-dimer*-а на презентацији (D_0) у различитим групама (Графикон 7), *Kruskal-Wallis* тест, праћен *Dunn* тестом, није показао значајне разлике између резултата испитиваних група ($p > 0,05$). Анализирајући резултате концентрације *D-dimera* 90. дана терапије, уочена је значајно виша концентрација у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 ($p < 0,05$), али без статистичке значајности између групе Γ_1 и Γ_2 ($p > 0,05$), као и између групе Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$). На крају третмана (D_{180}) уочене су значајно веће концентрације *D-dimera* у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 ($p < 0,001$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_1 ($p < 0,05$), али без статистичке значајности између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$).



Графикон 7. Концентрације *D-dimera* у крви паса природно инфицираних нематодом *D. immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређене по експерименталним групама. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.12. Резултати параметара антиоксидативне заштите и оксидативног стреса

5.12.1. Активност ензима супероксид дисмутазе (SOD)

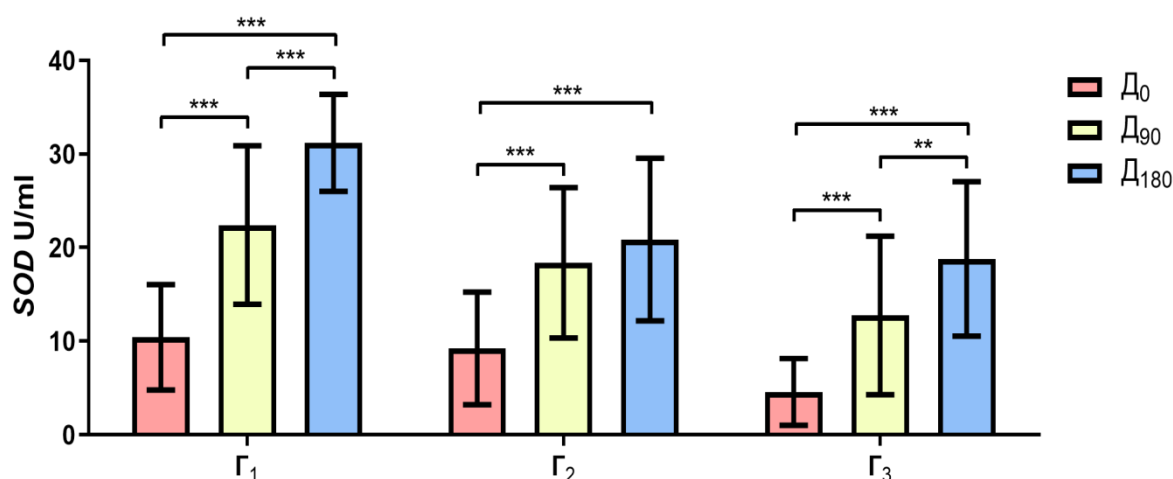
Резултати активности ензима супероксид дисмутазе изражени су у интернационалним јединицама по милилитру плазме (U/ml), а приказани су у Табели 13.

Табела 13. Активности супероксид дисмутазе (SOD) изражене у U/ml (средња вредност \pm SD) у свим експерименталним групама, приказане у различитим периодима терапије.

Групе	n	D ₀ $\bar{x} \pm SD$	D ₉₀ $\bar{x} \pm SD$	D ₁₈₀ $\bar{x} \pm SD$
Г ₁	11	10,41 \pm 5,64	22,41 \pm 8,46	31,19 \pm 5,18
Г ₂	14	9,22 \pm 6,02	18,39 \pm 8,04	20,85 \pm 8,69
Г ₃	9	4,58 \pm 3,57	12,74 \pm 8,47	18,79 \pm 8,25

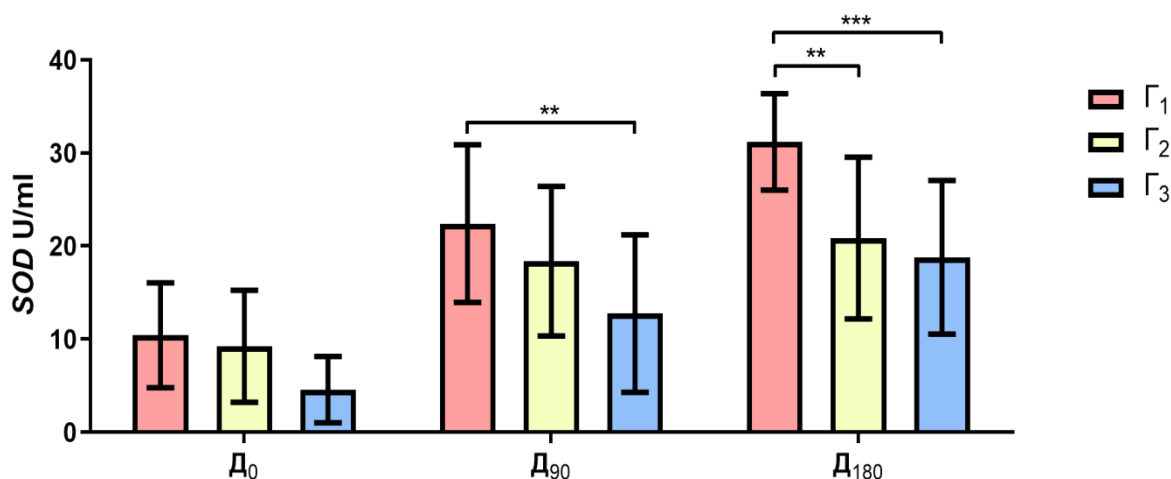
Легенда: D₀ – пре терапије, D₉₀ – 90. дан терапије, D₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Поређењем активности супероксид дисмутазе (SOD) код паса из групе Г₁ установљен је значајан пораст активности овог ензима током времена, што је приказано у Графикону 8. Двосмерни ANOVA тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен Tukey тестом, показао је значајно већу активност SOD у овој групи паса на крају терапије (D₁₈₀) у односу на D₀ ($p < 0,001$), као и у односу на D₉₀ ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је и значајно виша активност овог ензима на средини терапије D₉₀ у односу на D₀ ($p < 0,001$). Анализирајући резултате активности SOD код паса у групи Г₂, утврђена је значајно већа активност 90. дана терапије (D₉₀) и 180. дана терапије у односу на D₀ ($p < 0,001$). Између D₉₀ и D₁₈₀ није било значајних разлика у активности SOD ($p > 0,05$). У групи Г₃ активност SOD поново је била значајно већа на средини терапије (D₉₀) и на крају терапије (D₁₈₀) у односу на D₀ ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је значајно виша активност овог ензима на крају терапије (D₁₈₀) у односу на D₉₀ ($p < 0,01$).



Графикон 8. Активност SOD у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређена по периодима терапије. D₀ – пре терапије, D₉₀ – 90. дан терапије, D₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Поређењем резултата активности супероксид дисмутазе (*SOD*) на презентацији (D_0) по различитим групама (Графикон 9), нису установљене значајне разлике међу испитиваним групама ($p > 0,05$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је значајно виша концентрација у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), али без статистичке значајности између група Γ_1 и Γ_2 ($p > 0,05$), као и између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$). На крају третмана (D_{180}) уочена је значајно виша активност супероксид дисмутазе у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,01$), као и са групом Γ_3 ($p < 0,001$), али без статистичке значајности између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$).



Графикон 9. Активност *SOD* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређена по експерименталним групама. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.12.2. Активност ензима каталазе (*CAT*)

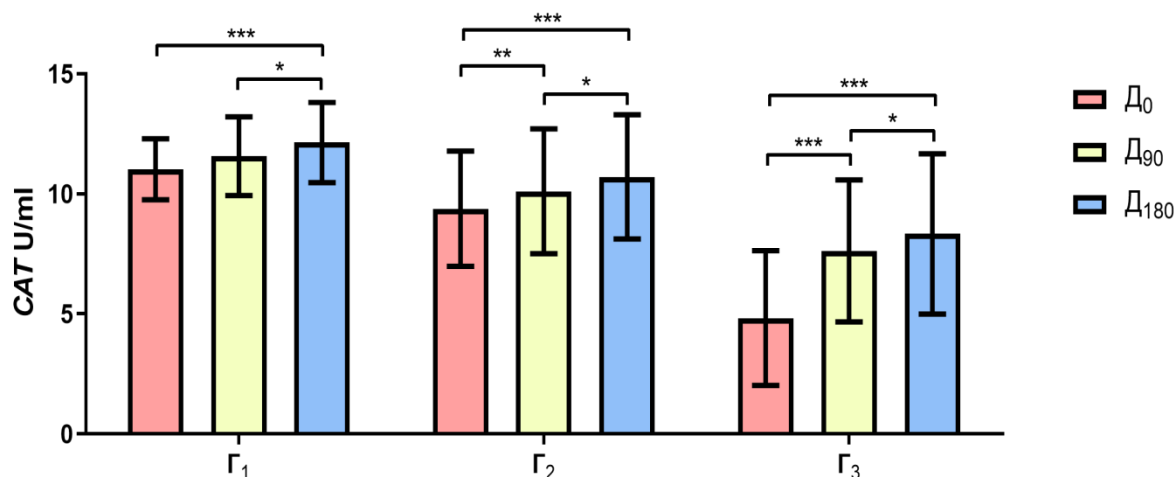
Поређењем резултата активности каталазе (*CAT*) код паса из групе Γ_1 установљен је значајан пораст активности овог ензима током времена, што је приказано у Табели 14 и Графикону 10. Значајно виша активност *CAT* у овој групи паса према резултатима двосмерног *ANOVA* теста са поновљеним мерењем у једном фактору, праћеног *Tukey* тестом, уочена је на крају терапије – D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и у односу на D_{90} ($p < 0,05$). У овој групи паса нису уочене значајне разлике у активности овог ензима између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$).

Табела 14. Активности каталазе (*CAT*) изражене у U/ml (средња вредност \pm SD) у свим експерименталним групама, приказане у различитим периодима терапије.

Групе	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	11,03 \pm 1,27	11,57 \pm 1,64	12,14 \pm 1,67
Γ_2	14	9,38 \pm 2,41	10,11 \pm 2,61	10,71 \pm 2,59
Γ_3	9	4,82 \pm 2,80	7,62 \pm 2,96	8,33 \pm 3,34

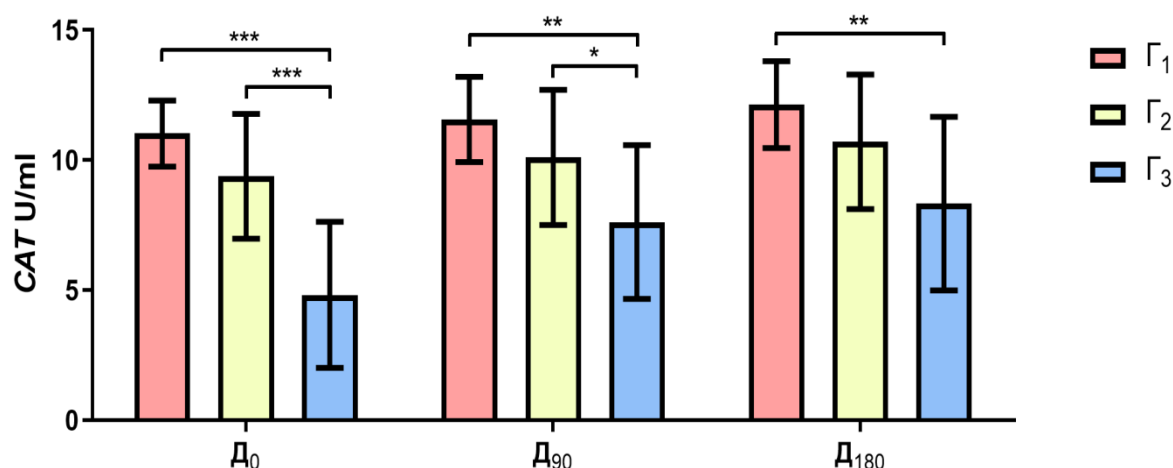
Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Анализирајући резултате активности *CAT* код паса у групи Γ_2 , утврђена је значајно виша активност 90. дана терапије у моменту D_{90} у односу на D_0 ($p < 0,01$), као и у моменту D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,001$). Значајно виша активност *CAT* била је и у моменту D_{180} у односу на D_{90} ($p < 0,05$). У групи Γ_3 активност *CAT* поново је била значајно већа на средини терапије – D_{90} у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и на крају терапије (D_{180}) у односу на D_0 ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је значајно виша активност овог ензима на крају терапије (D_{180}) у односу на D_{90} ($p < 0,05$).



Графикон 10. Активност *CAT* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређена по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Поређењем активности каталазе на презентацији (D_0) у различитим групама (Графикон 11), добијени резултати показали су значајно вишу активност у групи Γ_1 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је значајно виша активност у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,05$). Значајне разлике у активности овог ензима нису установљене међу групама Γ_1 и Γ_2 ($p > 0,05$). На крају третмана – D_{180} , уочена је значајно виша активност каталазе у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), али без статистички значајних разлика између група Γ_1 и Γ_2 ($p > 0,05$), као и између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$).



Графикон 11. Активност *CAT* у крвној плазми природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређена по експерименталним групама. Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.12.3. Активност ензима глутатион С-трансферазе (*GST*)

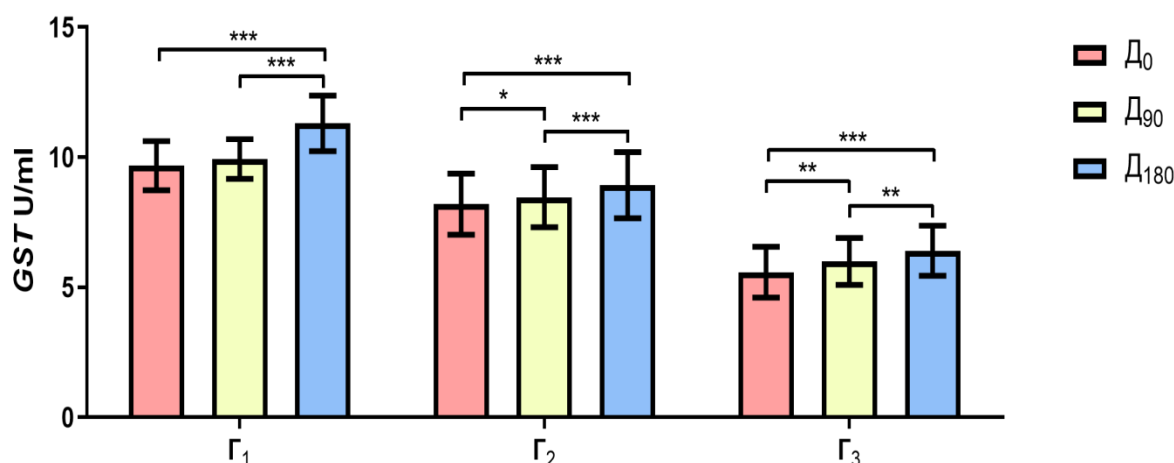
Поређењем активности глутатион С-трансферазе (*GST*) код паса из групе Г₁ установљен је значајан пораст у активности овог ензима током времена што је приказано у Табели 15 и Графику 12. Значајно виша активност *GST* у овој групи паса према резултатима двосмерног *ANOVA* теста са поновљеним мерењем у једном фактору, праћеног *Tukey* тестом, уочена је на крају терапије – Д₁₈₀ у односу на Д₀ ($p < 0,001$), као и у односу на Д₉₀ ($p < 0,001$). У овој групи паса нису уочене значајне разлике у активности овог ензима између Д₀ и Д₉₀ ($p < 0,05$).

Табела 15. Активности глутатион С-трансферазе (*GST*) изражене у U/ml (средња вредност ±SD) у свим експерименталним групама, приказане у различитим периодима терапије.

Групе	n	Д ₀ $\bar{x} \pm SD$	Д ₉₀ $\bar{x} \pm SD$	Д ₁₈₀ $\bar{x} \pm SD$
Г ₁	11	9,67 ± 0,94	9,93 ± 0,76	11,30 ± 1,07
Г ₂	14	8,19 ± 1,18	8,46 ± 1,16	8,93 ± 1,27
Г ₃	9	5,58 ± 0,97	6,00 ± 0,90	6,41 ± 0,96

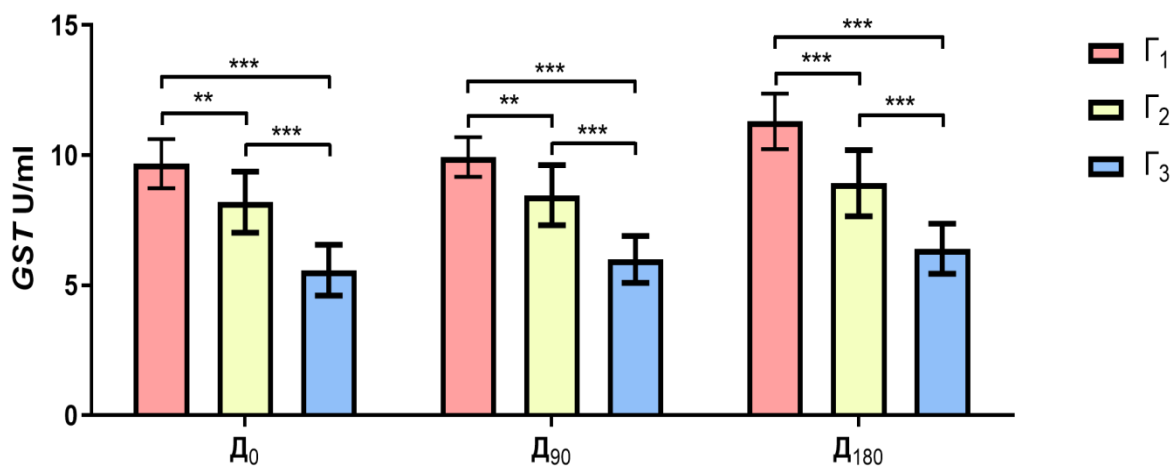
Легенда: Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Анализирајући резултате активности *GST* код паса у групи Г₂, утврђене су значајно више концентрације у моменту Д₉₀ у односу на Д₀ ($p < 0,05$), као и у моменту Д₁₈₀ у односу на Д₀ ($p < 0,001$). Значајно виша активност *GST* била је и у моменту Д₁₈₀ у односу на Д₉₀ ($p < 0,001$). У групи Г₃ активност *GST* поново је била значајно већа на средини терапије (Д₉₀) у односу на Д₀ ($p < 0,01$), као и на крају терапије (Д₁₈₀) у односу на Д₀ ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је значајно виша активност овог ензима на крају терапије (Д₁₈₀) у односу на Д₉₀ ($p < 0,01$).



Графикон 12. Активност *GST* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређена по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Поређењем активности *GST* на презентацији (D_0) по различитим групама (Графикон 13), добијени резултати показали су значајно вишу активност у групи Γ_1 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$). Такође, значајно вишу активност *GST* имали су и пси у групи Γ_1 у односу на псе у групи Γ_2 ($p < 0,01$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је значајно виша концентрација у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,001$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$), али и у групи Γ_1 у односу на групу Γ_2 ($p < 0,01$). На крају третмана (D_{180}) уочена је значајно виша активност *GST* у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,001$), као и у односу на Γ_3 ($p < 0,001$), али и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p > 0,001$).



Графикон 13. Активност *GST* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређена по експерименталним групама. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.12.4. Концентрација малондиалдехида (*MDA*)

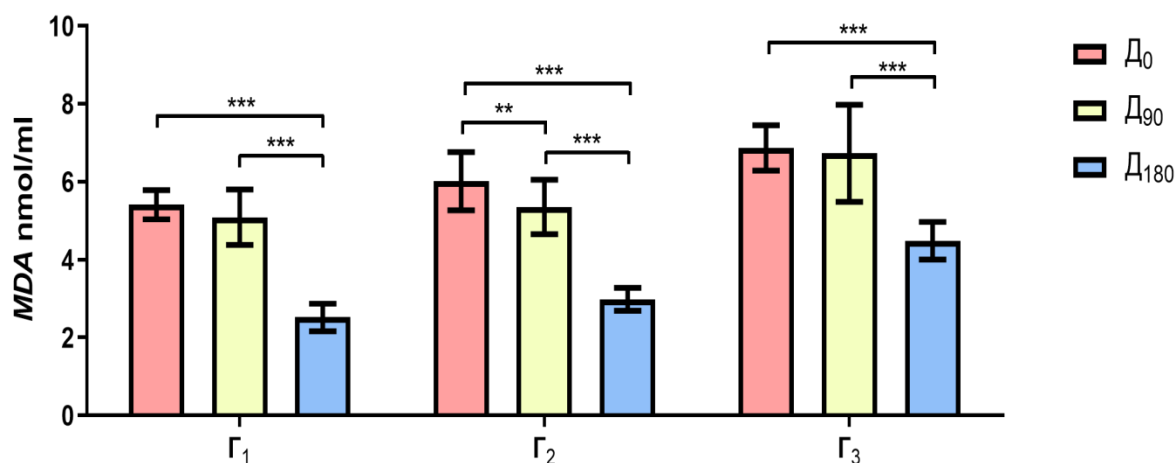
Резултати концентрације малондиалдехида (*MDA*) код паса из групе Γ_1 показују значајано смањење концентрације овог маркера током времена, што је приказано у Табели 16 и Графикону 14. Двосмерни *ANOVA* тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен *Tukey* тестом, показао је значајно вишу концентрацију *MDA* у овој групи паса пре терапије – D_0 и на средини терапије – D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$).

Табела 16. Концентрације малондиалдехида изражене у U/ml (средња вредност \pm SD) у свим експерименталним групама приказане у различитим периодима терапије.

Групе	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	5,41 \pm 0,38	5,09 \pm 0,71	2,52 \pm 0,36
Γ_2	14	6,02 \pm 0,74	5,36 \pm 0,70	2,98 \pm 0,30
Γ_3	9	6,87 \pm 0,58	6,73 \pm 1,24	4,49 \pm 0,49

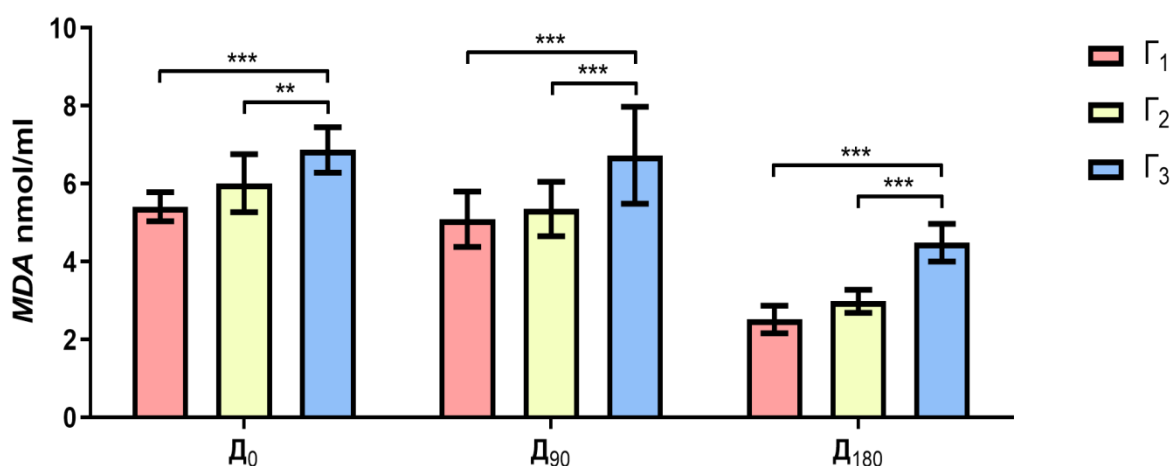
Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Анализирајући резултате концентрације *MDA* код паса у групи Γ_2 , утврђене су значајно више концентрације пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,01$), као и D_{180} у односу на D_0 ($p < 0,001$). Значајно виша концентрација *MDA* била је и у D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У групи Γ_3 концентрација *MDA* поново је била значајно већа пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$), као и на средини терапије (D_{90}) у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи паса нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$).



Графикон 14. Концентрација *MDA* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређена по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Поређењем концентрације *MDA* на презентацији (D_0) у различитим групама (Графикон 15), значајно виша концентрација је установљена у групи Γ_3 у односу на групу Γ_1 ($p < 0,001$), као и у односу на групу Γ_2 ($p < 0,01$). Значајних разлика у концентрацији *MDA* између паса у групи Γ_1 и групи Γ_2 није било ($p > 0,05$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је значајно виша концентрација у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 ($p < 0,001$), као и у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,001$), али међу псима у групама Γ_1 и Γ_2 нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера ($p > 0,05$). На крају третмана (D_{180}) уочен је исти тренд статистичких значајности као и на средини терапије, те је већа концентрација уочена код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групи Γ_1 ($p < 0,001$), као и у односу на псе у групи Γ_2 ($p < 0,001$), док између паса из група Γ_1 и Γ_2 није било значајних разлика у концентрацијама *MDA* ($p > 0,05$).



Графикон 15. Концентрација *MDA* у крвној плазми паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређена по експерименталним групама. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.13. Резултати процене степена оштећења ДНК паса

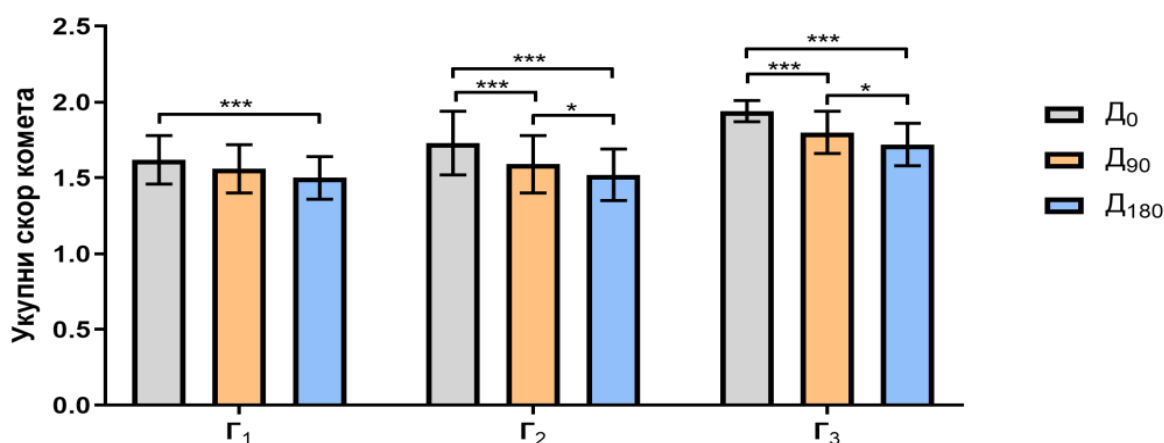
За све прикупљене узорке крви, пре комет теста спроведен је тест вијабилности. Вијабилност леукоцита тестирана трипан плавим (*Tripan blue test*) у сваком узорку била је већа од 90%, што је показатељ да су узорци били адекватни за даља испитивања. Резултати комет теста (индиректног показатеља степена оштећења ДНК) приказани су као укупан скор комета (*Total Comet Score – TCS*) и наведени су у Табели 17.

Табела 17. Степен оштећења ДНК домаћина у *in vivo* комет тесту изражен кроз укупан скор комета у свим експерименталним групама, приказан у различитим периодима терапије.

Групе	n	D_0 $\bar{x} \pm SD$	D_{90} $\bar{x} \pm SD$	D_{180} $\bar{x} \pm SD$
Γ_1	11	1,62 ± 0,16	1,56 ± 0,16	1,50 ± 0,14
Γ_2	14	1,73 ± 0,21	1,59 ± 0,19	1,52 ± 0,17
Γ_3	9	1,94 ± 0,07	1,80 ± 0,14	1,72 ± 0,14

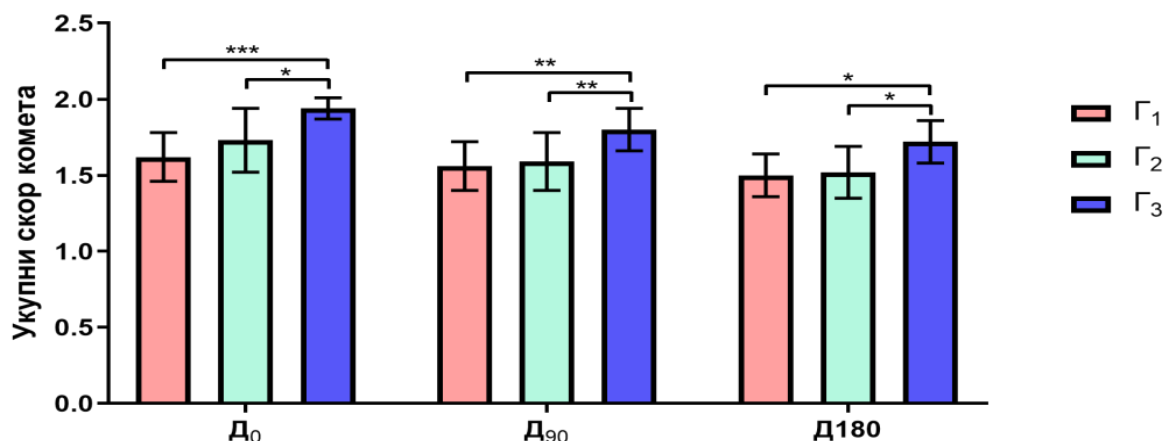
Легенда: D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан терапије, D_{180} – 180. дан терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Анализом добијених резултата уочено је временски зависно смањење степена оштећења ДНК паса инфицираних нематодом *D. immitis* (Графикон 16). Поређењем резултата укупног скова комета код паса у групи Γ_1 , двосмерни *ANOVA* тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен *Tukey* тестом, показао је значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима узоркованим пре терапије (D_0) у поређењу са оним узоркованим на крају терапије – D_{180} ($p < 0,001$). У групи Γ_2 , као и у групи Γ_3 , значајно веће оштећење ДНК утврђено је у D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,001$), као и у поређењу са D_{180} ($p < 0,001$). У овим групама статистички значајно већи степен оштећења уочен је 90. дана (D_{90}) у односу на 180. дан терапије – D_{180} ($p < 0,05$).



Графикон 16. Степен оштећења ДНК у леукоцитима паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у експерименталним групама поређен по периодима терапије. D_0 – пре терапије, D_{90} – 90. дан – средина терапије, D_{180} – 180. дан – на крају терапије; Γ_1 – група асимптоматских паса, Γ_2 – група паса са средњом клиничком сликом, Γ_3 – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Статистичким поређењем резултата укупног скова комета код паса на презентацији (D_0) у различитим групама (Графикон 17), значајно веће оштећење ДНК установљено је код паса у групи Γ_3 у поређењу са псима из групе Γ_2 ($p < 0,05$), као и групе Γ_1 ($p < 0,001$). Између паса из групе Γ_1 и групе Γ_2 није било значајних разлика у степену оштећења ДНК ($p > 0,05$). Анализирајући резултате добијене 90. дана терапије (D_{90}), значајно већи степен оштећења ДНК установљен је код паса у групи Γ_3 у односу на псе из групе Γ_1 ($p < 0,01$), као и у односу на псе из групе Γ_2 ($p > 0,01$). Значајне разлике у степену оштећења ДНК између паса из група Γ_1 и Γ_2 у овом периоду терапије нису установљене ($p > 0,05$). На крају терапије (D_{180}) уочен је значајно већи степен оштећења ДНК код паса у групи Γ_3 у поређењу са псима из групе Γ_1 ($p < 0,05$) и Γ_2 ($p < 0,05$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК између паса из група Γ_1 и Γ_2 у овом периоду терапије није било ($p > 0,05$).



Графикон 17. Степена оштећења ДНК у леукоцитима паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* у свим испитиваним периодима терапије поређен по експерименталним групама. Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан – средина терапије, Д₁₈₀ – 180. дан – крај терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.14. Резултати отпорности леукоцита паса на оштећење ДНК

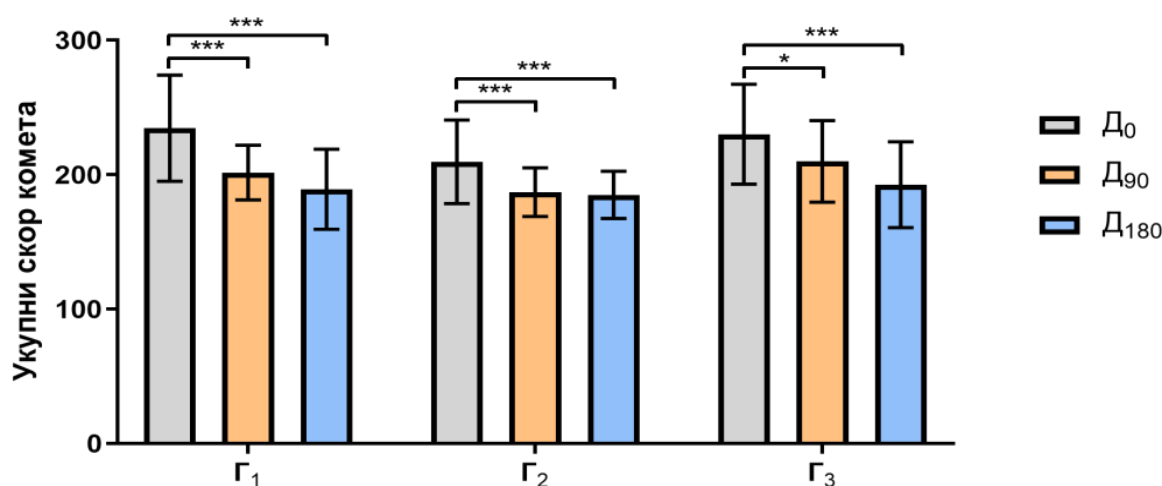
Отпорност леукоцита на оштећење ДНК изазвано водоник пероксидом процењено је у *ex vivo* комет тесту, а резултати су приказани као укупан скор комета (*Total Comet Score – TCS*) у Табели 18.

Табела 18. Степен оштећења ДНК домаћина у *ex vivo* комет тесту изражен кроз укупан скор комета у свим експерименталним групама приказан по различитим периодима терапије

Групе	n	Д ₀ $\bar{x} \pm SD$	Д ₉₀ $\bar{x} \pm SD$	Д ₁₈₀ $\bar{x} \pm SD$
Г ₁	11	234,70 ± 39,54	201,70 ± 20,33	189,20 ± 29,77
Г ₂	14	209,70 ± 31,08	187,10 ± 18,11	185,10 ± 17,64
Г ₃	9	230,20 ± 37,08	210,00 ± 30,24	192,70 ± 31,92

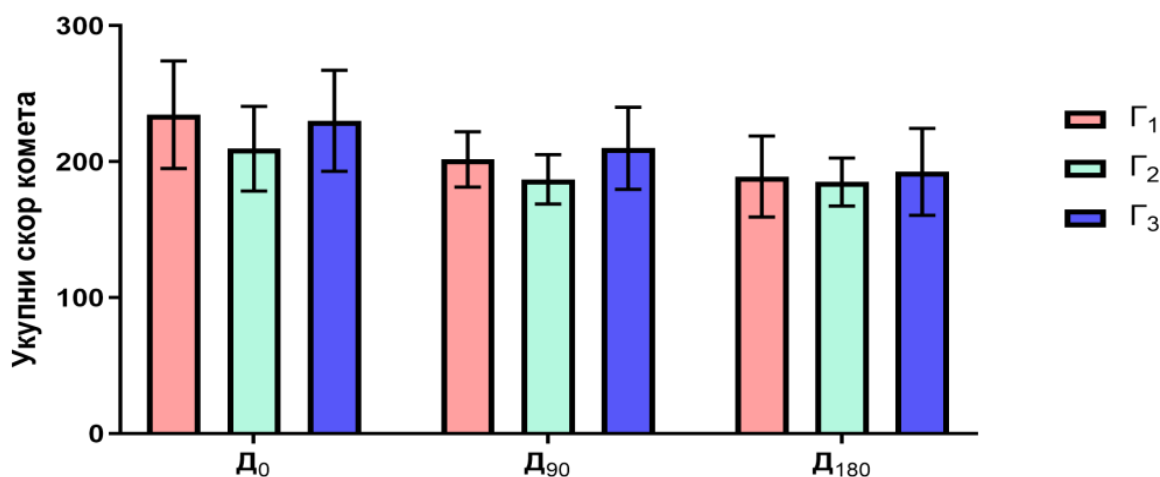
Легенда: Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан терапије, Д₁₈₀ – 180. дан терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; n – број паса у групи; SD – стандардна девијација.

Анализом добијених резултата уочено је временски зависно повећање отпорности леукоцита паса инфицираних нематодом *D. immitis* на оштећења изазвана познатим мутагеном водоник пероксидом (Графикон 18). Двосмерни ANOVA тест са поновљеним мерењем у једном фактору, праћен Tukey тестом, код паса у групи Г₁, показао је значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима узоркованим пре терапије (Д₀) у поређењу са средином – Д₉₀ ($p < 0,001$) и крајем терапије – Д₁₈₀ ($p < 0,001$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК изазваних познатим мутагеном између Д₉₀ и Д₁₈₀ није било ($p > 0,05$). Код паса у групи Г₂, уочен је значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима узоркованим пре терапије (Д₀) у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,001$), као и са Д₁₈₀ ($p < 0,001$). Између Д₉₀ и Д₁₈₀ није било значајних разлика у степену оштећења ДНК ($p > 0,05$). Код паса у групи Г₃ уочен је значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима узоркованим у Д₀ у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,001$), али и са Д₁₈₀ ($p < 0,05$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК између Д₉₀ и Д₁₈₀ није било ($p > 0,05$).



Графикон 18. Степен оштећења ДНК у леукоцитима паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* и третираних водоник пероксидом у експерименталним групама поређен по периодима терапије. Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан – средина терапије, Д₁₈₀ – 180. дан – на крају терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Поређењем резултата степена оштећења ДНК у леукоцитима инфицираних паса изазваних познатим мутагеном између експерименталних група у сваком испитиваном периоду терапије, нису уочене статистички значајне разлике ($p > 0,05$) што је приказано у Графикону 19.



Графикон 19. Степена оштећења ДНК у леукоцитима паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* и третираних водоник пероксидом у свим испитиваним периодима терапије поређен по експерименталним групама. Д₀ – пре терапије, Д₉₀ – 90. дан – средина терапије, Д₁₈₀ – 180. дан – на крају терапије; Г₁ – група асимптоматских паса, Г₂ – група паса са средњом клиничком сликом, Г₃ – група паса са тешком клиничком сликом.

6. ДИСКУСИЈА

Кардиопулмонална диروفилариоза је обољење које се јавља широм света са већом преваленцијом у деловима са тропском и суптропском климом, а њени обрасци просторне дистрибуције у корелацији су са присуством прелазних домаћина (вектора) – комараца, који предствљају важан фактор у епизоотиологији овог обољења. Поред присуства вектора постоје и други фактори ризика за преношење *D. immitis*. *Vieira* и сар. (2014) су у Португалији помоћу мултиваријантног модела као факторе ризика за присуство инфекције паса нематодом *D. immitis* идентификовали између осталих: старост паса, која се углавном кретала између четири и девет година; затим окружење у коме пси бораве, при чему су најподложнији били они који живе на отвореном; али и величину животиње, при чему су пси великих раса били подложнији инфекцији. Резултати истраживања ових аутора показују да је највећа преваленција *D. immitis* установљена код паса старости између четири и девет година (42,7%), затим код паса старијих од десет година (31%), док је најмања преваленција установљена код паса старости од једне до три године (26,3%). У складу са овим резултатима су и нешто раније спроведена истраживања од стране *Yildirim* и сар. (2007) који су установили највећу преваленцију код паса старости од седам до десет година (28,6%), а затим код паса старости од четири до шест (17,1%) и најмању код паса старости од шест месеци до три године (4,8%). *Carretón* и сар. (2017) доказују и да су старији пси чешће погођени хроничним инфекцијама нематодом *D. immitis* и да испољавају теже клиничке знаке болести. Резултати нашег истраживања су у складу са раније поменутиим истраживањима и показују да је просечна старост паса била 6,85 година, као и да су пси са тешком клиничком сликом били значајно старији од паса са испољеном средњом клиничком сликом, као и у односу на асимптоматске псе. Како *Vieira* и сар. (2014) наводе, већи пси би требало да су подложнији инфекцији нематодом *D. immitis* и да испољавају теже клиничке знаке, међутим, у нашем истраживању нису установљене значајне разлике у телесној маси паса са различитом тежином клиничке слике. Вероватни разлог за ово јесте то што пси великих раса углавном бораве на отвореном простору те су приступачнији векторима. Ову тврдњу су потврдили и *Lu* и сар. (2017) у свом истраживању, где наводе да је код паса са испољеним клиничким симптомима који су живели више од 50% времена на отвореном, преваленција овог обољења била већа у односу на псе са испољеним клиничким симптомима кардиопулмоналне диروفилариозе који проводе мање од 50% времена на отвореном. Утицај старости на тежину испољене клиничке слике можемо објаснити чињеницом да се минутни волумен срца постепено смањује током физиолошког процеса старења и доказано је да код геријатријских паса то смањење може достићи и 30% (*Bright* и *Mears*, 1997). Поред тога, и максимални број откуцаја срца, као и потрошња кисеоника током физичке активности се, такође, смањују како животиње старе. У истраживању *Strasser* и сар. (1997) упоређивани су кардиоваскуларни одговори током физичке активности између младих и старих паса, када је доказана повезаност старења са губитком кардиоваскуларне резерве и способности срчане адаптације. Уколико томе додамо и патогена који има директно негативно дејство на кардиоваскуларни систем домаћина можемо објаснити резултате корелације старости и тежине клиничке слике у нашем истраживању.

Као и код сваког инфективног обољења и код кардиопулмоналне диروفилариозе правовремена и тачна дијагноза је важна у сузбијању овог патогена. Америчко удружење за борбу против болести срчаног црва препоручује да се сви пси, укључујући и оне код којих се примењује превентивна терапија, тестирају једном годишње и то са минимум два различита теста, како на присуство микрофиларија, тако и на присуство антигена утеруса женке *D. immitis* у крви домаћина (*Nelson* и сар., 2018; *AHS guidelines*, 2020). Поред постављања правовремене и тачне дијагнозе овог обољења, у свакодневној клиничкој пракси врло је важно и праћење појаве резистенције *D. immitis* на тренутно доступне лекове. Све је већа забринутост доктора

ветеринарске медицине да примена терапије доксициклином и ивермектином може изазвати тешке нежељене реакције код третираних паса, због великог броја угинулих микрофиларија (као последица примењене терапије) и њихових производа разградње (*Bowman* и *Mannella*, 2011). Имајући у виду микрофиларицидно дејство макроцикличних лактона, треба бити опрезан при администрацији ових лекова поготову код паса са великим бројем циркулишућих микрофиларија у крви (*Ames* и *Atkins*, 2020). Брза смрт великог броја микрофиларија током фазе ране елиминације, најчешће 4–8 сати након прве дозе макроцикличних лактона, може изазвати системске нежељене ефекте, као што су летаргија, губитак апетита, појачана саливација, повраћање, бледило слузокожа и тахикардија. Повремено, пси са микрофиларијемидом од чак 5000 микрофиларија у милилитру крви могу развити акутни циркулаторни колапс након апликације ових лекова (*Nelson* и сар., 2005). Из тог разлога веома је битно пре апликације ових препарата, било превентивно или у склопу терапије, установити број микрофиларија у крви инфицираних паса и проценити оправданост примене, узимајући у обзир наведени ризик.

За доказивање присуства различитих стадијума *D. immitis* у организму домаћина постоји више тестова који се у већој или мањој мери користе у свакодневной клиничкој пракси (*Little* и сар., 2018). За доказивање микрофиларија у крви у клиничкој пракси најчешће се користе директни крвни размаз и модификовани Нотов тест, док се антиген утеруса адулта детектује „брзим“ имунохроматографским тестовима. Поузданост метода за детекцију микрофиларија је у директној вези са циркадијалним ритмом (ритам полагања ларви током 24 сата) ослобађања микрофиларија из утеруса женке *D. immitis* (*Lovis* и сар., 2017). Осцилације у току дана када степен микрофиларемије код домаћина варира, знатно утичу на исход тестирања (*Evans* и сар., 2017; *Ionică* и сар., 2017;). Од метода за детекцију адултих облика *D. immitis* постоје имунохроматографски тестови који су високоспецифични за антиген утеруса женки адулта (*Carmichael* и сар., 2017; *Henry* и сар., 2018). Међутим, ови тестови имају и ограничења која се базирају на имунским реакцијама домаћин–паразит, затим сложенем животном циклусу паразита, као и разликама у осетљивости и специфичности тестова различитих произвођача (*Starkey* и сар., 2020). Код неких паса лажно негативни резултати могу се јавити због блокирања антигена утеруса женки *D. immitis* услед формирања имунских комплекса антиген–антитело у организму пса (*Little* и сар., 2018). Резултати добијени у истраживању *Drake* и сар. (2015) показују да имунохроматографски тестови за детекцију антигена женки *D. immitis* могу бити непоуздан индикатор статуса паса инфицираних нематодом *D. immitis*, који се лече применом „slow kill“ протокола. Наиме, више од половине паса који су били негативни на присуство антигена женки *D. immitis*, након третмана серума у циљу отклањања имунских комплекса, и даље је било позитивно на антиген утеруса женки. Из поменутих разлога, даљи развој техника за доказивање присуства инфекција изазваних врстом *D. immitis* резултирао је развојем молекуларних метода за детекцију молекула ДНК паразита у крви домаћина (*Oi* и сар., 2015; *Rojas* и сар., 2015; *Xu* и сар., 2015). Молекуларне технике имају добру осетљивост и ефикасност у детекцији, али је њихов недостатак релативно висока цена и време потребно да се анализа изведе.

Све је више доказа у научној литератури о постојању резистенције *D. immitis* на деловање макроцикличних лактона (*Bourguinat* и сар., 2015; *McTier* и сар., 2017; *Prichard*, 2021), због чега је у нашем истраживању праћен ефекат терапије ивермектином и доксициклином на елиминацију микрофиларија из крви применом модификованог Нотовог теста и молекуларних дијагностичких метода (ланчана реакција полимеризације – PCR и qPCR). Резултати модификованог Нотовог теста у нашој студији показали су да терапија ивермектином и доксициклином смањује, број микрофиларија у крви током времена, а коначно и број паса позитивних на циркулишуће микрофиларије. На презентацији (D₀) модификовани Нотов тест је показао да је 73,5% (25/34) природно инфицираних паса позитивно на циркулишуће микрофиларије. Поређењем узорака крви паса откривен је највећи проценат позитивних узорака

на циркулишуће микрофиларије у групи паса са тешком клиничком сликом (Γ_3), затим у групи Γ_2 и најмањи у групи Γ_1 , односно да је постојала повезаност између броја микрофиларија и тежине клиничке слике. Узорци крви анализирани су и применом конвенционалног PCR теста који умножава специфични регион *16S rRNA* величине 440 парова база који је присутан код филарије *D. immitis* (Watts и сар., 1999). Добијени резултати показали су да је 92% (31/34) паса било позитивно на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis*, односно да је PCR метода резултирала са шест позитивних узорака више у односу на модификовани Нотов тест. На средини терапије (D_{90}), дошло је до смањења броја позитивних паса и на циркулишуће микрофиларије и на циркулишућу ДНК *D. immitis*, као и реалног броја циркулишћих микрофиларија у крви, док су на крају терапије (D_{180}) и модификовани Нотов тест и PCR дали негативне резултате за све испитиване узорке. Зато се може се потврдити да је терапија ивермектином и доксициклином била успешна у елиминацији циркулишућих микрофиларија до краја терапије (D_{180}). Природно инфицирани пси испитивани су и у студији спроведеној од стране Grandi и сар. (2010) где су добијени резултати показали да је на презентацији 72,7% паса било позитивно на циркулишуће микрофиларије, са бројем циркулишућих микрофиларија у распону 80–29.910 по милилитру крви. У овом истраживању терапија ивермектином и доксициклином је резултирала брзим опадањем броја микрофиларија у циркулацији, са 37,5% (3/8) паса негативних до 30. дана, 87,5% (7/8) до 60. дана и 100% до 90. дана. У студији McCall и сар. (2014), где су пси били експериментално инфицирани примењена терапије је, такође, постепено смањивала број циркулишућих микрофиларија. У нашем истраживању пре почетка терапије 73,5% (25/34) паса је било позитивно, а просечан број микрофиларија био је $6285,29 \pm 4637,81$ по милилитру крви. Деведесетог дана (D_{90}), 35,29% (12/34) паса је остало позитивно на Нотовом тесту, са просечним бројем од $518,82 \pm 879,46$ микрофиларија по милилитру крви, док су сви пси били негативни на циркулишуће микрофиларије 180. дана. За разлику од нашег, у истраживању McCall и сар. (2014) позитивни пси и даље су били присутни чак и 217. дана инфекције. Познато је да зрела женка *D. immitis* ослобађа микрофиларије у циркулацију и да се заступљеност микрофиларија у периферној венској крви мења у зависности од доба дана (Ionică и сар., 2017). Ово може да објасни разлику у броју циркулишућих микрофиларија установљених у различитим студијама. За разлику од нашег, као и истраживања Grandi и сар. (2010), где је у терапији коришћен ивермектин, у студији McCall и сар. (2014) коришћен је модификовани „slow kill“ протокол, у ком је уместо ивермектина коришћен моксидектин, па спорија елиминација микрофиларија из крви може објаснити различитом ефикасношћу ова два антипаразитика.

Знајући какав је клинички значај квантификације микрофиларија током дијагностике, у нашем истраживању извршена је примена и оптимизација молекуларне методе за релативну квантификацију ДНК микрофиларија у крви паса. Методом *qPCR* испитивани су узорци крви свих паса укључених у ово истраживање. Налаз је био позитиван код 31 (92%) пса што је био случај и код конвенционалне PCR методе. Предност *qPCR* методе у односу на конвенционалну је што омогућава да се изврши квантификација патогена у узорку крви мерењем релативне количине присутне ДНК *D. immitis*. Када се упореде пси према испољеним клиничким симптомима, пре терапије (D_0), највећа количина ДНК патогена била је у групи Γ_3 , затим у Γ_2 , и најнижа у групи Γ_1 , што значи да је постојала корелација између количине патогена и тежине клиничке слике. Након 90. дана терапије (D_{90}), дошло је до очигледног смањења количине циркулишуће ДНК *D. immitis* у крви, док су на крају терапије (D_{180}) сви пси укључени у ово истраживање били негативни на присуство ДНК *D. immitis*, потврђујући ефикасност примењене терапије. Резултати *qPCR* анализа у нашем истраживању су у складу са резултатима Negron и сар. (2022), као и Lau и сар. (2024), који су у установили да је *qPCR* метода погодна алтернатива модификованом Нотовом тесту за квантитативно бројање микрофиларија у крви, јер је *qPCR* метода била осетљивија. Такође, метода *qPCR* има велики потенцијал у свакодневној примени у

циљу откривања инфекција узроковних нематодом *D. immitis*, као и бољем праћењу ефекта терапије кардиопулмоналне диروفилариозе.

Поред правовремене и тачне детекције и квантификације овог патогена, у постављању праћењу тока инфекције и прогнозе овог обољења, велики број дијагностичких метода налази примену у свакодневној клиничкој пракси. Између осталих то су основне хематолошке и биохемијске анализе (*Niwetpathomwat* и сар., 2007; *Boswood*, 2009), али и савремена имицинг дијагностика (*Tudor* и сар., 2014; *Yevstafieva* и сар., 2022). Анализом резултата основних параметара црвене крвне лозе у нашем истраживању код паса пре терапије (D_0), установљено је да су пси са тешким клиничким симптомима имали број еритроцита и вредност хематокрита испод доње границе референтног опсега за здраве псе, што је у складу са резултатима добијеним у истраживањима *Niwetpathomwat* и сар. (2007), *Rath* (2014) и *Kesici* и сар. (2022). Испитивани пси без симптома, као и они са средњом клиничком сликом у нашем истраживању имали су све параметре црвене крвне лозе у оквирима референтних интервала, а мањи број еритроцита код паса са тешком клиничком сликом вероватно је био повезан са траумом коју кретање паразита изазива на црвеним крвним ћелијама и васкуларним зидовима у дужем временском периоду (*Rath* и сар., 2014). Број еритроцита, концентрација хемоглобина и вредности хематокрита пре почетка терапије (D_0) нису се значајно разликовали међу експерименталним групама ($p > 0,05$). Остале вредности параметара црвене лозе у нашој студији биле су унутар референтних интервала у свим групама пре почетка терапије (D_0). На средини терапије (D_{90}), вредност хематокрита се код паса са тешком клиничком сликом (Γ_3) повећала изнад доње границе референтног опсега за здраве псе. Међутим број еритроцита, иако се повећао у овом периоду терапије, остао је испод доње границе референтног опсега. Значајне разлике у броју еритроцита и вредности хематокрита међу псима у различитим експерименталним групама, у овом периоду терапије, нису уочене. Међутим, у истом периоду терапије (D_{90}) установили смо значајно нижу концентрацију хемоглобина код паса са тешком клиничком сликом у односу на асимптоматске псе. *Kim* и сар. (2020) су, такође, установили да је концентрација хемоглобина била значајно нижа код паса са тешком клиничком сликом у поређењу са негативним псима из контролне групе. Након завршетка терапије (D_{180}) дошло је до значајног повећања хематокрита код паса у групама Γ_1 и Γ_3 , док су се и остале вредности параметара црвене крвне лозе кретале у референтним опсезима за све псе укључене у наше истраживање, и није било значајних разлика међу групама. Анализом резултата основних параметара беле крвне лозе код паса пре терапије једино је установљено повећање броја *MID* ћелија (моноцити и еозинофили) изнад референтног опсега за здраве псе и то код паса у групама Γ_2 и Γ_3 . На средини терапије (D_{90}), број *MID* ћелија код паса у групи Γ_2 се смањило, али се задржао изнад горње границе референтног опсега за здраве псе, док је код паса у групи Γ_3 дошло до повећања броја *MID* ћелија. Након завршетка терапије (D_{180}) број *MID* ћелија се смањило код паса у групама Γ_2 и Γ_3 у оквиру референтног опсега за здраве псе. Већи број еозинофила у крви током инфекције установили су и *Kesici* и сар. (2022) у својој студији у којој је половина испитиваних паса имала повишен број еозинофила и на крају терапије. Иако су се леукоцити кретали у референтним интервалима у нашем истраживању, значајно већи број леукоцита уочен је на средини терапије код паса са тешком клиничком сликом у односу на асимптоматске, као и псе са средњом клиничком сликом. На крају терапије значајно већи број леукоцита имали су пси у групи Γ_3 у односу на псе у групи Γ_2 . Леукоцитоза може бити узрокована повећаним бројем *MID* ћелија. Међутим, имајући у виду да је број *MID* ћелија на крају терапије био у оквирима референтних интервала, а леукоцитоза је остала код паса са тешким симптомима, можемо претпоставити да су ти пси имали акутну инфламацију. Значајно већи број леукоцита код паса са тешком клиничком сликом на средини терапије, као и на крају терапије можемо објаснити акутизацијом патолошког процеса током болести кардиопулмоналне диروفилариозе. Пораст броја леукоцита на средини терапије може

указивати на потенцијално учешће примењеног терапијског протокола на модификацију инфламаторног одговора домаћина која је и довела до акутизације патолошког процеса. Остале вредности параметара беле крвне лозе у нашем истраживању кретале су се у референтним опсезима за здраве псе.

Што се тиче биохемијских параметара, утврдили смо да су најзначајније промене уочене у активностима ензима *AST*, *ALT* и *LDH*. Сви ови ензими имају претежно интрацелуларно деловање и стога је код здравих паса активност ензима у серуму веома ниска, док би свако повећање активности ових ензима било одраз оштећења ткива у коме су смештени. Активности ензима *AST*, *ALT* и *LDH* пре почетка терапије (D_0) код свих паса биле су више од горње границе референтног интервала и нису се значајно разликовале међу експерименталним групама. Повећани нивои активности ових ензима, у нашем истраживању, могу бити узроковани циркулацијом микрофиларија или одраслим паразитима који су локализовани у јетри, посебно у жучним путевима где узрокују оштећење паренхима овог органа, о чему су говорили *Sevimli* и сар. (2007) и *Tabrizi* (2012). Поред тога, повећана ензимска активност *AST* и *LDH* код паса у нашем експерименту може бити подржана присуством кардиоваскуларних повреда изазваних адултима *D. immitis* код инфицираних паса (*Kesici* и сар., 2022). Примењена терапија довела је до смањења активности ензима *AST* и *ALT*, који су се већ на средини терапије (D_{90}) вратили у оквиру референтних опсега, што се задржало и на крају терапије (D_{180}). Са друге стране, активност ензима *LDH* је порасла и на средини терапије (D_{90}), и на крају терапијског циклуса (D_{180}). Ово можемо објаснити позитивним ефектом терапије на елиминацију микрофиларија из циркулације. Елиминацијом микрофиларија вероватно је дошло до смањења негативног дејства циркулишућих микрофиларија на ткиво јетре (*Tabrizi*, 2012), док повишена активност ензима *LDH* може бити последица оштећења миокарда адултним облицима *D. immitis*, којима је походан дужи временски период за елиминацију из организма паса (*McCall*, 2005). У нашем истраживању, повишени укупни протеини установљени су код свих паса и у свим периодима терапије. Висок ниво укупних протеина, уз физиолошку концентрацију албумина, може указивати на хиперглобулинемију насталу услед појачаног хуморалног одговора на инфекцију изазвану нематодом *D. immitis*. У литератури је доказано да хиперглобулинемија може бити узрокована хроничном инфекцијом, упалом, неоплазијом и паразитским и инфективним болестима између осталих и кардиопулмоналном дирофилариозом, шугом и ерлихиозом (*de Caprariis* и сар., 2009). У студији *Asawakarn* и сар. (2021) доказано је да су пси са кардиопулмоналном дирофилариозом имали повећане концентрације укупних протеина са чијим су у складу и наши резултати. Остали параметри испитивани у овом истраживању нису били значајно промењени. Међутим, примењено је и да су пси са тешком клиничком сликом имали више концентрације холестерола у односу на псе у групама Γ_1 и Γ_2 . Иако није достигнута статистичка значајност међу групама у концентрацији овог параметра, сматрамо да би даља истраживања холестерола код инфекције изазване нематодом *D. immitis* била интересантна у погледу потенцијала овог параметра у предвиђању клиничког стања паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе. Такође, на крају терапије доксициклином и ивермектином концентрација холестерола се вратила у границе референтног опсега. *Reimann* и сар. (2017) су у свом истраживању уочили позитивну корелацију концентрације холестерола и *MDA* код паса са срчаним обољењем. У нашем истраживању пси са тешком клиничком сликом имали су концентрације холестерола изнад горње границе референтног интервала за разлику од других група паса, док је концентрација *MDA* код њих била значајно виша у односу на псе са средњом клиничком сликом и асимптоматске псе. Даља истраживања су свакако неопходна, како би се детаљније објаснила повезаност ових параметара са клиничким стадијумом кардиопулмоналне дирофилариозе и бројем паразита у организму паса.

Да би се процено ефекат примењене терапије на степен оптерећења срчаног мишића, у овом истраживању, праћене су промене концентрација биомаркера *NT-proBNP* у серуму паса

природно инфицираних нематодом *D. immitis* током примењене терапије. Постављена хипотеза за ово истраживање заснована је на добро познатој патогенези инфекције врстом *D. immitis* која укључује оштећење васкуларног ендотела, тромбозу, тромбоемболију и настанак плућне хипертензије (Ames и Atkins, 2020; Nelson и сар., 2020). Услед настанка плућне хипертензије долази до оптерећења рада десне коморе срца, што може довести до појаве аритмија и срчане инсуфицијенције. Како би се умањило оптерећење на срчани мишић услед конгестивне инсуфицијенције покрећу се различити компензацијски механизми, који укључују појачану активност симпатичког нервног система, као и система ренин–ангиотензин–алдостерон. Када је организам у стању хиперволемије, ослобађа се низ натриуретских пептида, између осталих и бета натриуретички пептид (*BNP*) као прохормон, који има улогу у уклањању вишка воде и соли.

За дијагностичка и прогностичка мерења код паса са срчаним проблемима користи се биомаркер *NT-proBNP*, јер је доказано да има дужи полуживот од *BNP*, те је због тога погоднији за праћење (Hendriks и сар., 2022). Према Morey и сар. (2023), биомаркер *NT-proBNP* има велики значај у диференцијацији патолошких стања неvezано за то да ли су срчаног порекла или не. Штавише, доказано је да постоји јака веза између ехокардиографских параметара кардиомегалије и срчане конгестије са повишеном концентрацијом *NT-proBNP* у серуму (Rammal и сар., 2023). Према истраживањима Costa-Rodríguez и сар. (2023), доказано је да је у циљу одређивања тока лечења и прецизне прогнозе кардиопулмоналне диروفилариозе неопходно извршити процену кардиопулмоналног статуса паса, у чему од велике помоћи може бити праћење концентрација *NT-proBNP* у серуму. На основу истраживања Harr и сар. (2022) референтне вредности *NT-proBNP* за здраве псе су постављене на < 900 pmol/l. Концентрација *NT-proBNP* већа 1800 pmol/l индикација је за присуство срчаног обољења, док већа од 2700 pmol/l указује на присуство хроничне срчане инсуфицијенције (de Lima и Ferreira, 2017).

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације показују да су концентрације *NT-proBNP* пре отпочињања терапије биле унутар референтних интервала код асимптоматских паса (Γ_1), као и код паса са средњом клиничком сликом (Γ_2). На основу добијених резултата може се претпоставити да код паса са овим степенима испољавања клиничке слике не долази до тешких оштећења срчаног мишића. Насупрот томе, пси који су испољили тешке клиничке симптоме имали су значајно веће концентрације *NT-proBNP* у поређењу са асимптоматским псима, те се код њих не може искључити постојање хроничног оптерећења срчаног мишића. Према истраживањима спроведеним од стране Carretón и сар. (2014, 2017), доказано је да постоји веза између тежине испољене клиничке слике кардиопулмоналне диروفилариозе и нивоа *NT-proBNP* у серуму. Пси са тешким клиничким симптомима у истраживању спроведеном од стране Lee и сар. (2020) имали су значајно веће концентрације *NT-proBNP* у поређењу са псима са умереном клиничком сликом, као и у поређењу са здравим псима, а са чим су у складу и наши резултати. Како у научној литератури није било података о ефекту третмана на динамику кретања концентрација *NT-proBNP*, у овој студији по први пут су праћене промене у концентрацијама овог биомаркера у узорцима крви код паса. Резултати нашег истраживања показују да је 90. дана терапије (D_{90}) концентрација *NT-proBNP* порасла у свим експерименталним групама, а само код асимптоматских паса је остала испод горње границе референтног опсега. Пси у групи Γ_2 , као и пси у групи Γ_3 имали су ниво овог биомаркера виши од горње граничне вредности, али нису достигли референтне нивое *NT-proBNP* који указују на присуство срчаног обољења. На средини терапијског циклуса није било статистички значајних разлика међу експерименталним групама. Након шест месеци третмана ивермектином и доксициклином, пси у свакој експерименталној групи достигли су патолошке концентрације *NT-proBNP* (веће од 900 pmol/l), док су пси у групама Γ_2 и Γ_3 имали концентрације које указују на могуће постојање срчаног обољења, односно веће од 1800 pmol/l. На крају терапије статистичком анализом резултата доказано је да су пси са умереним и тешким

клиничким симптомима имали значајно више концентрације *NT-proBNP* од паса без симптома кардиопулмоналне диروفилариозе. Ово може указивати на прогресију срчаног оштећења током времена. Наиме, може се закључити да током терапије ивермектином и доксициклином није дошло до смањења оптерећења срчаног мишића, детектовано кроз нивое концентрације *NT-proBNP* у серуму. Насупрот томе, *Falcón-Cordón* и сар. (2019) су у свом истраживању приметили да је елиминација паразита услед примењене терапије довела до побољшања систолне функције десне коморе, иако није било приметне промене у нивоу плућне хипертензије. Овај резултат може бити и последица компензацијског механизма прилагођавања рада десне коморе срца на дугорочно стање плућне хипертензије.

Имајући у виду наше и наведене резултате других аутора, може се претпоставити да би потпорна комбинована терапија пимобенданом (група бензимидазола) и силденафилом (инхибитор фосфодиестеразе) могла бити од помоћи код паса са средњом и тешком клиничком сликом кардиопулмоналне диروفилариозе. Ова тврдња је подржана налазима *Iwanuk* и сар. (2019), који су открили да третман пимобенданом снижава вредност биомаркера *NT-proBNP*, након изазваног физичког напора код паса са асимптоматском болешћу митралних залистака. Ови резултати указују на позитиван ефекат примењене терапије који се огледа у смањеном утицају стреса на срчани зид. *Tjostheim* и сар. (2019) су доказали да је код паса оболелих од кардиопулмоналне диروفилариозе, након терапије пимобенданом и силденафилом, дошло до побољшања функције десне коморе срца и смањења плућног артеријског притиска. Међутим, потребна су даља проспективна клиничка испитивања да би се проценила безбедност и ефикасност овог третмана. Са друге стране, плућна тромбоемболија, настала спонтано или као последица терапије, може погоршати плућну хипертензију и знакове слабости десне стране срца. Из тог разлога пратили смо и кретање концентрација *D-dimera* пре и током примене терапије ивермектином и доксициклином. Анализа резултата концентрација *D-dimera* показује да су се, пре почетка терапије, концентрације за све три експерименталне групе кретале унутар утврђених референтних интервала за здраве псе, односно испод 0,2 µg/ml. Међутим, скоро половина паса са умереним и тешким клиничким симптомима (47% (16/34) свих паса) имала је патолошке вредности овог биомаркера, што је у складу са ранијим налазом *Carretón* и сар. (2013а). Ови истраживачи су, такође, приметили да микрофиларијемични пси имају патолошке нивое *D-dimera* у плазми, и претпоставили су да присуство микрофиларија у крви повећава ризик од појаве плућне тромбоемболије. Резултати нашег истраживања, показују да је 41% (14/34) паса имало и присутне микрофиларије у крви на презентацији (пре терапије) и патолошке нивое концентрација *D-dimera*, што је у складу са резултатима *Carretón* и сар. (2013а), што указује на то да су микрофиларије могле бити један од узрока појаве плућне тромбоемболије. У корист овој тврдњи говоре и резултати добијени од стране *Carretón* и сар. (2013б), где је установљена директна веза између појаве плућне тромбоемболије и хистопатолошких налаза делова диروفиларија окружених угрушцима у плућном парехиму код свих паса са повишеним вредностима *D-dimera* у крвној плазми. Деведесетог дана терапије резултати нашег истраживања показали су повећање концентрације овог биомаркера у свим експерименталним групама, али су код асимптоматских паса исте остале у оквиру референтног интервала. Пси који су испољили тешке клиничке симптоме током тог периода лечења имали су концентрације које су биле значајно више од оних код асимптоматских паса ($p < 0,05$). Супротно нашим налазима, *Yoon* и сар. (2017) су открили да су се нивои концентрација *D-dimera* значајно смањили у свим групама након почетка терапије, али су се патолошке вредности овог биомаркера задржале код паса са тешким клиничким симптомима. Након завршетка лечења у нашој студији, концентрација *D-dimera* у свим експерименталним групама се смањила, али је код паса са умереним и тешким клиничким симптомима остала на патолошком нивоу. Такође, *Yoon* и сар. (2017) су открили да се ризици од плућне инфламације и тромбоемболије нису значајно смањили код паса са тешким клиничким знацима упркос

шестомесечном третману, са чим су у складу и наши налази. Повећање *D-dimera* након три месеца лечења у нашој студији може се објаснити губитком способности паразита да модулишу имунски одговор домаћина. Утврђено је да ларве и адулти филарија као начин преживљавања користе антикоагулантне карактеристике својих антигена, како би регулисали стварање крвних угрушака у свом непосредном интраваскуларном окружењу (*Diosdado* и сар., 2020). Ивермектин у комбинацији са доксициклом вероватно утиче на функцију екскреторно-секреторног органа микрофиларија *D. immitis* који је одговоран за контролу секреције поменутих антигена. Ово би се могло објаснити механизмом деловања ивермектина, који је позитиван алостерични модулатор глутамат-хлоридних канала смештених на мишићу који окружује екскреторно-секреторни орган микрофиларија *D. immitis* (*Vatta* и сар., 2014). Такође, доказано је да макроциклични лактони изазивају парализу ћелије екскреторних пора ларви паразита *Brugia malayi*, узročника лимфне филариозе, ометајући функцију екскреторно-секреторног органа (*Moreno* и сар., 2010). Као резултат тога, паразити луче мање имуномодулаторних супстанци и стога су подложнији имунском одговору домаћина (*Moreno* и сар., 2010), што укључује активацију функције тромбоцита, фибринолитичке активаторе и фактор Ха који поспешује стварање тромба (*Diosdado* и сар., 2020). Из напред поменутих тврдњи, можемо закључити да праћење нивоа *D-dimera* код паса инфицирани филаријом *D. immitis* може бити од помоћи приликом процене постојања плућне тромбоемболије, која неретко може настати и услед примењене терапије (*Carretón* и сар., 2013б). Према *Savadelis* и сар. (2020), током десетомесечне студије, није било видљивих промена плућних образаца као одговора на терапију моксидектином и доксициклином. Наши резултати добијени након шест месеци лечења су у складу са налазима *Savadelis* и сар. (2020), па предлажемо да треба размотрити примену терапије за спречавање коагулације код паса са умереним и тешким клиничким симптомима кардиопулмоналне дирофилариозе.

У патогенези кардиопулмоналне дирофилариозе оксидативни стрес игра важну улогу, с обзиром на то да је познато да се *ROS* стварају као одговор на присуство било ког патогена (*Almeida* и сар., 2013). Учешће оксидативног стреса је веома значајно у динамици тока паразитских инфекција и има суштинску улогу у одбрани домаћина од инфекције паразитима и микроорганизмима (*Çenesiz*, 2020). Истовремено, паразит користи сложене одбрамбене механизме и негује отпорност на утицаје реактивних врста кисеоника (*ROS*), са циљем да одржи свој опстанак у организму домаћина (*Szewczyk-Golec* и сар., 2021). Неки паразити су развили софистициране стратегије за манипулисање имунским одговором домаћина, укључујући и модулацију стварања оксидативног стреса (*Rossi* и *Fasel*, 2018). Резултати добијени у нашем истраживању указују на постојање нарушене равнотеже у синтези прооксиданаса и антиоксиданса код паса инфицираних нематодом *D. immitis*. Да пси инфицирани нематодом *D. immitis* имају промењене параметре оксидативног стреса указали су и други истраживачи (*Dimri* и сар., 2012; *Rath* и сар., 2014; *Carretón* и сар., 2017). Према истраживању *Dimri* и сар. (2012), активност *GST* и *CAT* биле су значајно ниже код паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе у поређењу са контролном групом здравих паса. Међутим, активност *SOD* је показала обрнути тренд и била је значајно већа код оболелих паса у поређењу са здравом контролом. Смањење активности *GST* у овом случају може бити и последица превеликог трошења овог ензима у циљу појачавања антиоксидативне заштите. Повећање активности *SOD* аутори су приписали појачаној регулацији у његовој синтези ради супротстављања слободним радикалима. Тако повећана активност *SOD* вероватно доводи до повећане производње водоник пероксида, а тиме повећаног коришћења *CAT* за претварање водоник пероксида у воду, што објашњава мању активност каталазе код оболелих у односу на здраве псе. Такође, и *Rath* и сар. (2014) су доказали већу активност *SOD*, а мању активност *CAT* код паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе у односу на здраве контролне псе. *Aslan* и сар. (2010), *Dimri* и сар. (2012) и *Rath* и сар. (2014) у својим истраживањима доказују да је концентрација

липидних пероксида, маркера постојања оксидативног стреса, значајно већа код паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе у односу на здраве псе. Сва поменута истраживања потврђују да инфекција нематодом *D. immitis* итекако утиче на равнотежу између прооксиданса и антиоксиданаса. Међутим, у тренутно доступној литератури, не постоји истраживање у коме су упоређене вредности антиоксидативних ензима и параметара оксидативног стреса током терапије.

У нашем истраживању праћен је ефекат примењене терапије на промене у активности антиоксидативних ензима и примећен је пораст активности супероксид дисмутазе (*SOD*) на средини и на крају терапије, уз стабилну активност каталазе и глутатион С-трансферазе (*GST*) на средини терапије и благи раст на крају терапије. Међутим, што се тиче концентрације малондиалдехида (*MDA*), током терапије уочено је смањење концентрације зависно од времена. *Kausar* и сар. (2020) су испитивали потенцијал инфекције филаријом *Setaria cervi* да изазове поремећај у равнотежи прооксиданаса и оксиданаса код пацова. Резултати су показали да су инфицирани пацови имали значајно мању активност *SOD* 10. дана инфекције у односу на ону пре инфекције. Повишена активност *SOD* је примећена у свим групама на средини терапије, а на крају је дошло до значајног пада активности овог ензима. Исти тренд у активности *SOD* примећен је и у нашем истраживању код паса оболелих од кардиопулмоналне дирофилариозе на средини терапије. Међутим, и након терапије смо уочили раст активности *SOD*. У истраживању *Kausar* и сар. (2020) уочено је значајно повећање активности каталазе у серуму свих инфицираних пацова 10. дана од момента инфекције. Ниво каталазе је био повишен на средини терапије, док је на крају терапије дошло до смањења активности овог ензима. Међутим, у нашем истраживању, каталаза је имала стабилну активност на средини терапије, а на крају терапијског циклуса забележен је раст овог ензима. Даље, *Sebai* и сар. (2021) су такође доказали да инфекција мишева нематодом *Heligmosomoides polygyrus* доводи до смањења ензимске активности *SOD*, али и *CAT* у цревима мишева, што указује на поремећај равнотеже оксиданаса и антиоксиданаса, односно на постојање оксидативног стреса код домаћина. Третман есенцијалним биљним уљима и албендазолом довео је до побољшања антиоксидативних параметара већ након седам дана терапије. Претходна истраживања, као и наши резултати могу се објаснити механизмима одбране, када домаћин користи штетне ефекте *ROS* на ћелије паразита да их уништи. Фагоцитне ћелије као одговор на дејство патогена у организму, реагују повећаном потрошњом кисеоника (*Dickson* и *Zhou*, 2020). Ово за последицу има производњу и ослобађање великих количина супероксид анјона ($O_2^{\bullet-}$) и водоник пероксида (H_2O_2) који имају важну улогу у борби против, паразитских, бактеријских и вирусних инфекција. Велике количине реактивних радикала могу имати и штетне ефекте на организам домаћина, који се последично брани синтезом антиоксидативних ензима који имају улогу у неутрализацији слободних радикала. Функционална повезаност антиоксидативних ензима каталазе (*CAT*) и супероксид дисмутазе (*SOD*) огледа се у улози *SOD* да изврши дисмутацију супероксид анјона чиме настаје водоник пероксид који је супстрат за каталазу. Каталаза даље разлаже водоник пероксид на воду и молекул кисеоника, чиме се на крају неутрализују превелике количине супероксидног анјона (*Hayes* и сар., 2005). Хронична инфекција изазвана са *D. immitis*, довела је у нашем истраживању до смањења *SOD* у серуму паса вероватно због повећаног искоришћавања овог ензима у процесу дисмутације супероксидног анјона током оксидативног метаболизма путем инхибиције повратне спреге. Са друге стране, активност *CAT* је вероватно била повећана као одговор на повећано стварање водоник пероксида који делује као супстрат за каталазу. Активност ензима *GST*, у нашем истраживању, имала је исти тренд као и активност ензима *CAT*. Установљена је стабилна активност *GST* на средини терапијског циклуса и раст на крају терапије. Како је примењена терапија деловала и довела до значајног смањења микрофиларија у крви, већ након три месеца, смањено се и инфламаторно одговор на присуство микрофиларија, што је омогућило и опоравак антиоксидативне заштите. То је

резултирало повећањем активности *SOD*, као и активности *CAT* и *GST*. Повећани ниво *GST* код паса у нашем истраживању може бити из разлога што је овај ензим одговоран за елиминацију водоник пероксида, као и липидних пероксида из организма. За разлику од наших резултата, у истраживању спроведеном од стране *Kausar* и сар. (2020) до значајног повећања *GST* активности у серуму пацова дошло је 10. дана инфекције, док је на средини и на крају терапије забележен пад активности.

Директан показатељ оксидативног стреса је малондиалдехид (*MDA*), чија је концентрација праћена и у нашем истраживању. Резултати концентрација овог биомаркера у нашем истраживању показали су смањење концентрације *MDA* зависно од времена, као резултат примењене терапије, које се огледа у елиминацији циркулишућих микрофиларија и смањењу инфламаторног одговора домаћина. *Kausar* и сар. (2020) су уочили значајан пораст концентрације *MDA* код пацова инфицираних филаријом *Setaria cervi* 10. дана након инфекције, односно, пре отпочињања терапије, али и на средини терапијског циклуса, док су значајан пад концентрације овог биомаркера уочили након завршетка терапије.

У циљу процене степена оштећења ДНК домаћина под утицајем различитих паразитских инфекција до данас су обављена бројна истраживања (*Baldissera* и сар., 2016; *Atwa* и сар., 2020; *Chelomina* и сар., 2021). Међутим, у доступној литератури нема ниједне студије о утицају инфекције изазване врстом *D. immitis* на степен оштећења ДНК паса природно инфицираних овом нематодом. У нашој студији, испитивали смо потенцијални генотоксични ефекат *D. immitis* код природно инфицираних паса и пратили кретање степена оштећења ДНК током терапије. Генотоксични ефекат је процењиван коришћењем комет теста који се показао као ефикасан тест за процену степена оштећења ДНК у леукоцитима паса и мачака (*Heaton* и сар., 2002). Резултати укупног комет скорa (*TCS*) добијени пре почетка терапије показали су највећи степен оштећења ДНК код паса у групи Г₃, у којој су били пси са тешким клиничким симптома, и сви су били позитивни и на присуство циркулишућих микрофиларија и на ДНК *D. immitis*. Код ових паса (Г₃) и концентрација *MDA* је била највиша, док су активности антиоксидативних ензима биле најниже у поређењу са другим групама. Степен оштећења ДНК домаћина био је значајно већи код паса из групе Г₃ у односу на псе у другим групама. Пре почетка терапије између паса из групе Г₁ и Г₂ није било значајних разлика у степену оштећења ДНК домаћина. Исти тренд степена оштећења примењен је на средини терапије, као и након завршетка терапијског циклуса. На основу добијених резултата, закључили смо да је степен оштећења ДНК у корелацији са тежином испољених клиничких симптома. Настало оштећење ДНК може се објаснити активирањем механизма урођеног имунитета заснованог на инфламацији током инфекције са *D. immitis*, с обзиром на то да одрасли паразити и циркулишуће микрофиларије покрећу инфламаторне одговоре (*Furlanello* и сар., 1998), који су одговорни за индукцију оксидативног стреса, што на крају доводи и до оштећења молекула ДНК (*Trachootham* и сар., 2008). Уопштено говорећи, инфекција малим бројем адултних облика изазива блажу клиничку слику болести код паса, али клиничка тежина кардиопулмоналне диروفилариозе није увек у корелацији са бројем паразита. Поред оптерећења бројем адултних облика и присуства микрофиларија, патогенеза и тежина болести зависе и од трајања инфекције и интеракције домаћин–паразит (*McCall* и сар., 2008). Наиме, *Carretón* и сар. (2014) су открили да се нивои *C*-реактивног протеина (*CRP*) у серуму повећавају са погоршањем болести, што указује на инфламаторне процесе који могу допринети прогресији болести. Сличне резултате су добили и *Yoon* и сар. (2017), који су указали да су нивои инфламаторних биомаркера у складу са тежином испољених симптома. Ови резултати подржавају наше налазе из студије генотоксичности, с обзиром на то да механизми оштећења ДНК укључују урођени инфламаторни одговор домаћина на присуство патогена. Иако потенцијал генотоксичности инфекције са *D. immitis*, до ове студије, није био истражен, постоје многа истраживања о генотоксичном потенцијалу других паразитских инфекција које подржавају наше налазе. *Kocuyigit* и сар. (2005), као узрок за

индуковано оштећење ДНК код пацијената са кожном лишманиозом наводе постојање оксидативног стреса. Поред тога, доказано је да инфекција са *Trypanosoma evansi* може повећати ниво оштећења ДНК, како у леукоцитима, тако и у ћелијама различитих органа, као што су јетра, срце и слезина (*Baldissera* и сар., 2016). Резултати добијени од стране *Atwa* и сар. (2020) су показали да инфекција са *Cryptosporidium parvum* изазива већу миграцију ДНК у леукоцитима имунокомпромитованих мишева у поређењу са леукоцитима пореклом од здравих јединки. Такође, и *Chelomina* и сар. (2021) су открили да метил *Paragonimus heterotremus* доводи до оштећења ДНК код лабораторијских пацова као домаћина, а највероватније настаје као последица оксидативног и инфламаторног одговора домаћина. Поред тога, наши резултати о генотоксичности указују на смањење оштећења ДНК зависно од времена у леукоцитима паса у свим групама, вероватно као последица смањења интензитета инфекције услед ефекта примењене терапије. Код асимптоматских паса (G_1), значајно виши нивои оштећења ДНК нађени су само у леукоцитима из узорака узетих пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$), док су код паса са умереним и тешким симптомима разлике постојале између свих испитиваних периода. Може се претпоставити да је у нашем истраживању елиминација микрофиларија услед примењене терапије довела до смањења инфламаторног одговора заснованог на урођеном имунском систему, што је резултирало доказаним смањењем оксидативног стреса и побољшањем антиоксидативне заштите што је омогућило процес поправке ДНК. У прилог нашим резултатима говоре и резултати добијени од стране *Yoon* и сар. (2017) који су открили да је терапија „slow kill“ методом на крају студије смањила концентрацију инфламаторних биомаркера у серуму код свих паса укључених у експеримент. Поред тога, у студији *Méndez* и сар. (2015), примећено је значајно смањење нивоа *CRP* након третмана доксициклином и ивермектином, вероватно због смањења васкуларне инфламације изазване елиминацијом бактерије *W. pipientis*. Имајући у виду важну улогу како у развоју паразита, тако и у патогенези и имунском одговору организма на инфекцију са *D. immitis*, неопходно је даља истраживања усмерити ка утицају ове бактерије на ток инфекције изазване врстом *D. immitis*. Утицај инфламације и инфламаторних одговора заснованих на урођеном имунском систему на степен оштећења ДНК потврђен је у неколико студија. Терапија инфекције узроковане метилем *Opisthorchis viverrini* код хрчака смањила запаљење жучних путева, а самим тим и степен оксидативног оштећења ДНК (*Pinlaor* и сар., 2006). Након два месеца лечења празиквантелом, оштећење ДНК у леукоцитима и инфламаторни индикатори у плазми пацијената са инфекцијом јетре узроковане метилем смањили су се на физиолошке нивое (*Dechakhamphu* и сар., 2008; *Thanan* и сар., 2008). *El-Sayed* и *Eman* (2014) су открили да је третман токсоплазмозе сулфадиазиним и пириметаминим резултирао смањењем свих измерених параметара комет теста у организму домаћина. Резултати поправке ДНК добијени у нашем истраживању у складу су са резултатима студије *Florentino* и сар. (2021), у којој су истраживани одговори ћелија домаћина на нивоу генома, током инфекције са *Trypanosoma cruzi* на *HeLa* ћелијама и *AC16* ћелијској линији хуманих кардиомиоцита. У истраживању *Florentino* и сар. (2021) у раним стадијумима инфекције пронађена су многа места осетљива на оксидоване базе у молекулу ДНК ћелије домаћина. Они су након почетног оштећења ДНК уочили значајно смањење миграције оштећених делова молекула ДНК, што је указало да је процес репарације ДНК отпочео. Све наведене студије сугеришу да су имунски одговор домаћина и оксидативни стрес главни узроци оштећења ДНК, што се највероватније догађа и код кардиопулмоналне диофилариозе паса. Такође, и у нашем истраживању као и у поменутих студијама, уочава се одговор домаћина на оштећење молекула ДНК у виду отпочињања процеса репарације молекула ДНК. То нас је навело да додатно испитамо отпорност леукоцита инфицираних паса током терапије на штетно дејство доказаног мутагена. Како бисмо проценили степен отпорности леукоцита узоркованих током различитих периода инфекције/терапије на дејство познатог мутагена користили смо *ex vivo* методу комет теста. *Heaton* и сар. (2002) су у свом

истраживању одредили да је оптимална концентрација водоник пероксида која изазива значајно оштећење ДНК у леукоцитима паса и мачака $100 \mu\text{mol/l}$. На основу тих резултата и ми смо одлучили да истом концентрацијом водоник пероксида третирамо леукоците паса укључених у наше истраживање. Резултати добијени у *ex vivo* комет тесту показали су повећану отпорност леукоцита на мутагено дејство H_2O_2 узоркованих 180. дана терапије (D_{180}) у односу на леукоците узорковане у D_{90} и D_0 , али није било разлике међу групама у сваком испитиваном периоду лечења. Познато је да су у инфламаторном стању координација и равнотежа механизма поправке ДНК од суштинског значаја да би се обезбедила ефикасна и тачна поправка насталих оштећења (Kau и сар., 2019). Током инфламације ослобађају се релативно високе концентрације водоник пероксида, што доводи до смањене активности антиоксидативних ензима. У том стању настаје низ штетних ефеката на молекуле ДНК услед прекомерног накупљања водоник пероксида (Đelić и сар., 2022). Инфламација обично јењава након уклањања патогена и опоравка подођеног ткива (Palmai-Pallag и Bachrati, 2014). Отпорност ћелија на индуковано оштећење молекула ДНК, такође, зависи од ефикасности свих путева поправке ДНК, односно механизма да се заобиђу места непоправљеног оштећења ДНК (Walmacq и сар., 2012). Jaiswal и сар. (2000) су показали да инфламаторни цитокини могу утицати на активност поправке ДНК. Резултати добијени у нашем истраживању указују да хронична упала изазвана инфекцијом са *D. immitis* смањује отпорност леукоцита на генотоксичне агенсе. Поред тога, примењена терапија је временом смањила оптерећење домаћина микрофиларијама, а самим тим и инфламаторни одговор организма, што је довело до повећања антиоксидативног капацитета и на крају до повећања отпорности леукоцита на спољашње мутагене. На пример, Thamm и сар. (2013) су показали да лимфоцити златних ретривера са дијагносткованим лимфомом имају повећану осетљивост на *ex vivo* оштећења ДНК у односу на здраве псе. Многе студије генотоксичности показале су веће ендогено оштећење ДНК у ћелијама периферне крви пацијената оболелих од малигнух обољења него у контролним ћелијама (Blasiak и сар., 2004; Colleu-Durel и сар., 2004), али након *ex vivo* мутагеног дејства, открили су још веће оштећење ДНК у ћелијама периферне крви пацијената са малигнитетом (Shao и сар., 2005; Bendesky и сар., 2006). Ћелије периферне крви предиабетичара и дијабетичара реагују знатно јаче на дејство мутагена од оних из контролне групе. Чак и гојазност може повећати ризик од оштећења ДНК (Đelić и сар., 2019). Као и код свих побројаних патолошких стања, и код кардиопулмоналне диофилариозе, вероватно, услед поремећаја оксидативног/антиоксидативног баланса и појачаног инфламаторног одговора долази до поремећаја механизма поправке оштећења ДНК што резултује повећаном осетљивошћу нуклеинских киселина на штетно дејство различитих молекула.

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Код паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* старост јединки је статистички значајно утицала на тежину клиничке слике, док телесна маса паса није имала утицај на интензитет симптома кардиопулмоналне диروفилариозе.
2. Примењени „*slow kill*” протокол који подразумева продужену примену ивермектина и доксициклина, показао се успешним у елиминацији микрофиларија *D. immitis* код паса природно инфицираних овим паразитом.
3. Примењени конвенционални PCR и *qPCR* показали су се осетљивијим у детекцији микрофиларија *D. immitis*, односно њихове ДНК, у односу на модификовани Нотов тест, а *qPCR* се може предложити као метода избора за квантификацију паразита што је значајно за праћење тока инфекције и ефекта примењене терапије.
4. Хематолошки параметри били су незнатно промењени код инфицираних паса, док је примењена терапија довела до враћања промењених концентрација у опсеге референтних интервала.
5. Активности ензима *AST*, *ALT* и *LDH* биле су више од горње границе референтног интервала пре почетка терапије паса. Примењена терапија довела је до смањења активности ензима *AST* и *ALT* већ на средини терапије, за разлику од *LDH* који је остао повишен. Већина осталих биохемијских параметара везаних за функцију поједних ткива и органа нису били значајно промењени.
6. Нивои концентрације биомаркера *NT-proBNP* у серуму инфицираних паса били су виши код јединки са тежом клиничком сликом кардиопулмоналне диروفилариозе. Пси из свих група су на крају терапије достигли патолошке концентрације *NT-proBNP* (веће од 900 pmol/l), док су пси са средњом и тешком клиничком сликом имали концентрације које указују на постојање кардиоваскуларног обољења (веће од 1800 pmol/l).
7. Концентрација *D-dimera* пре почетка терапије код свих паса се кретала унутар утврђених референтних интервала. Деведесетог дана од почетка терапије пси са средњом и тешком клиничком сликом имали су повишене вредности концентрације овог биомаркера, док су се након завршетка терапије (180. дана) код ових паса вредности концентрације смањиле, али су и даље биле изнад референтних интервала, што указује на присуство васкуларних промена.

8. Смањење концентрације малондиалдехида (*MDA*) и пораст активности антиоксидативних ензима (*SOD*, *CAT* и *GST*) након завршене терапије указује на то да је примењена терапија довела до смањења оксидативног стреса и повећања антиоксидативне заштите код испитиваних паса.
9. Степен оштећења ДНК утврђен применом *in vivo* комет теста био је у корелацији са тежином испољених клиничких симптома код паса. Оштећење ДНК се смањивало током спровођења терапије као последица смањења интензитета инфекције и оксидативног стреса.
10. Хронична инфламација настала као последица инфекције нематодом *D. immitis*, према резултатима *ex vivo* комет теста, довела је до смањења отпорности леукоцита на генотоксичне агенсе. Отпорност леукоцита на спољашње мутагене се повећала након примењене терапије, односно елиминисања микрофиларија и смањења оксидативног стреса.
11. Резултати добијени у *in vivo* и *ex vivo* комет тесту указују на оправданост примене ових метода у праћењу утицаја инфекције нематодом *D. immitis* на организам домаћина.
12. Примењени „*slow kill*“ протокол, који подразумева продужену примену ивермектина и доксициклина показао се ефикасним у елиминацији микрофиларија *D. immitis* код природно инфицираних паса, што је последично довело до смањења оксидативног стреса, степена оштећења ДНК и повећања отпорности леукоцита код инфицираних паса.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham, D., Robert, B.G., Marcia, M.G., 1988. *Dirofilaria immitis*: surface properties of third- and fourth-stage larvae. *Experimental parasitology*, 65(2), 157-167
2. Adebayo, O.O., Akande, F.A., Adenubi, O.T., 2020. Canine dirofilariasis: A case report and review of the literature. *Folia Veterinaria*, 64(3), 75-81.
3. Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. In: Packer, L. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando, Florida, USA, 121-126.
4. Almeida, B.F.M., Narciso, L.G., Melo, L.M., Preve, P.P., Bosco, A.M., Lima, V.M.F.D., Ciarlini, P.C., 2013. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *The Veterinary Journal*, 198(3), 599-605.
5. Alobaidii, W.A., Ali, S.A., 2024. Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs. *The Indian Veterinary Journal*, 101(1), 7-11.
6. American Heartworm Society – AHS, 2020. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. <https://www.heartwormsociety.org/>
7. Ames, M.K., Atkins, C.E., 2020. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 283, p.109131.
8. Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P., 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 261-271.
9. Angelou, A., Gelasakis, A.I., Verde, N., Pantchev, N., Schaper, R., Chandrashekar, R., Papadopoulos, E., 2019. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasites and Vectors*, 12, 1-11.
10. Antinoff, N., 2001. Clinical observations in ferrets with naturally occurring heartworm disease and preliminary evaluation of treatment, with ivermectin and with and without melarsomine. In *Recent advances in heartworm disease*. American Heartworm Society, Batavia, Illinois, 45-47.
11. Anvari, D., Narouei, E., Daryani, A., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Hezarjaribi, H.Z., Narouei, M.R., Gholami, S., 2020. The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. *Research in Veterinary Science*, 131, 104-116.
12. Akao, N., 2011. Human dirofilariasis in Japan. *Tropical medicine and health*, 39(1), 65.
13. Aroch, I., Rojas, A., Slon, P., Lavy, E., Segev, G., Baneth, G., 2015. Serological crossreactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with

- Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 303-305.
14. Asawakarn, S., Sirisawadi, S., Kunnasut, N., Kamkong, P., Taweethavonsawat, P., 2021. Serum protein profiles and C-reactive protein in natural canine filariasis. *Veterinary World*, 14(4), 860.
 15. Aslan, O., Alparslan Y., Murat K., Sule A., 2010. Detection of some biochemical and lipid peroxidation parameters in *Dirofilaria immitis* infected dogs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(5), 954-957.
 16. Atkins C.E., Keene B.W., McGuirk S.M., 1988. Pathophysiologic mechanisms of cardiac dysfunction in experimentally induced heartworm caval syndrome in dogs: an echocardiographic study. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 403-410.
 17. Atkins, C.E., 1991. Heartworm disease. In: Allen DG, ed. *Small Animal Medicine*. Philadelphia: JB Lippincott, 341-363.
 18. Atkins, C., 2005. Canine heartworm disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th ed. St. Louis: Elsevier, 1118-1136.
 19. Atkins, C., (2010). Canine heartworm disease. In S. Ettinger & E. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat*. (2nd ed.), St. Louis, Mo, USA: Saunders Elsevier, 1353-1381.
 20. Atwa, M.T., Salem, N.I., Mohamed, H.R., 2020. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on DNA damage and cytokines gene expression in blood of immunocompromised mice. *Egyptian Journal of Zoology*, 73(73), 16-25.
 21. Aziz, M.A., Diallo, S., Diop, I.M., Lariviere, M., Porta. M., 1982a. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet*, 2, 171-173.
 22. Aziz, M.A., Diallo, S., Lariviere, M., Diop, I.M., Porta, M., Gaxotte, P., 1982b. Ivermectin in onchocerciasis. *Lancet*, 2, 1456-1457.
 23. Awara, W.M., El-Nabi, S.H., El-Gohary, M., 1998. Assessment of vinyl chloride-induced DNA damage in lymphocytes of plastic industry workers using a single-cell gel electrophoresis technique. *Toxicology*, 128, 9-16.
 24. Baldissera, M.D., Sagrillo, M.R., de Sá, M.F., Grando, T.H., Souza, C.F., de Brum, G.F., da Luz, S.C.A., Oliveira, S.S., De Mello, A.L.B., Nascimento, K., Tatsch, E., Moresco, R. N., da Silva, A.S., Monteiro, S.G., 2016. Relationship between DNA damage in liver, heart, spleen and total blood cells and disease pathogenesis of infected rats by *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, 161, 12-19.
 25. Bamorovat, M., Sharifi, I., Harandi, M.F., Nasibi, S., Sadeghi, B., Khedri, J., Mohammadi, M.A., 2017. Parasitological, serological and molecular study of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs, southeastern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(2), 260.

26. Bandi, C., Trees, A.J., Brattig, N.W., 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*, 98(1-3), 215-238.
27. Batty K.T., Law A.S.F., Stirling V., Moore B.R., 2007. Pharmacodynamics of doxycycline in a murine malaria model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 4477-9.
28. Bazzocchi, C., Genchi, C., Paltrinieri, S., Lecchi, C., Mortarino, M., Bandi, C., 2003. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Veterinary Parasitology*, 117(1-2), 73-83.
29. Beall, M.J., Arguello-Marin, A., Drexel, J., Liu, J., Chandrashekar, R., Alleman, A.R., 2017. Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. *Parasites and Vectors*, 10, 481.
30. Becker, Z., Holló, N., Farkas, R., Gyurkovszky, M., Reiczigel, J., Olaszy, K., Vári, Z., Vörös, K., 2022. Serodiagnostic difficulties and possibilities of heartworm disease in regions where both *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* infections occur. *Acta Veterinaria Hungarica*, 70(2), 92-99.
31. Bendas, A.J.R., Mendes-de-Almeida, F., Guerrero, J., Labarthe, N., 2017. Update on *Dirofilaria immitis* epidemiology in South America and Mexico: literature review. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54(4), 319-329.
32. Bendesky, A., Michel, A., Sordo, M., Calderón-Aranda, E.S., Acosta-Saavedra, L.C., Salazar, A.M., Podoswa, N., Ostrosky-Wegman, P., 2006. DNA damage, oxidative mutagen sensitivity, and repair of oxidative DNA damage in nonmelanoma skin cancer patients. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(7), 509-517.
33. Bernardini, L., Barbosa, E., Charão, M.F., Goethel, G., Muller, D., Bau, C., Steffens, N.A., Santos Stein, C., Moresco, R.N., Garcia, S.C., Souza Vencato, M., 2020. Oxidative damage, inflammation, genotoxic effect, and global DNA methylation caused by inhalation of formaldehyde and the purpose of melatonin. *Toxicology Research*, 9(6), 778-789.
34. Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Rykala, J., Kolacinska, A., Morawiec, Z., Drzewoski, J., Zadrozny, M., 2004. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1-2), 139-148.
35. Bottari, N.B., Crivellenti, L.Z., Borin-Crivellenti, S., Oliveira, J.R., Coelho, S.B., Contin, C.M., Tatsch, E., Moresco, R.N., Santana, A.E., Tonin, A.A., Tinucci-Costa, M., 2016. Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microbial Pathogenesis*, 92, 26-29.
36. Bourguinat, C., Lee, A.C., Lizundia, R., Blagburn, B.L., Liotta, J.L., Kraus, M.S., Keller, K., Epe, C., Letourneau, L., Kleinman, C.L., Paterson, T., 2015. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Veterinary Parasitology*, 210(3-4), 167-178.

37. Brattig, N.W., Bazzocchi, C., Kirschning, C.J., Reiling, N., Buttner, D.W., Ceciliani, F., Geisinger, F., Hochrein, H., Ernst, M., Wagner, H., Bandi, C., Hoerauf, A., 2004. The major surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *Journal of Immunology*, 73, 437-445.
38. Brawner, W.R.Jr., Dillon, A. R., Robertson-Plouch, C. K., Guerrero, J., 1998. Radiographic diagnosis of feline heartworm disease and correlation to other clinical criteria: Results of a multicenter clinical case study. In "Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98" (R. L. Seward, ed.), American Heartworm Society, Batavia, Illinois, 91-95.
39. Boonyapakorn, C., Srikittjakarn, L., Morakote, N., Hoerchner, F., 2008. The epidemiology of *Dirofilaria immitis* infection in outpatient dogs at Chiang Mai university small animal hospital, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 39(1), p.33.
40. Borthakur, S.K., Deka, D.K., Islam, S., Sarma, D.K., Sarmah, P.C., 2015. Prevalence and molecular epidemiological data on *Dirofilaria immitis* in dogs from Northeastern States of India. *The Scientific World Journal*, 2015, 265385.
41. Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *Journal of Veterinary Cardiology*, 11, 23-32.
42. Bowman, D.D., Atkins, C.E., 2009. Heartworm biology, treatment, and control. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 39(6), 1127-1158.
43. Bowman, D.D., Mannella C., 2011. Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(4), 160-172.
44. Bright, J.M., Mears, E. 1997. Chronic heart disease and its management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27, 1305-1329.
45. Buntine, P., Thien, F., Stewart, J., Woo, Y.P., Koolstra, M., Bridgford, L., Datta, M., Gwini, S.M., 2019. Effect of a clinical flowchart incorporating Wells score, PERC rule and age-adjusted D-dimer on pulmonary embolism diagnosis, scan rates and diagnostic yield. *Emergency Medicine Australasia*, 31(2), 216-224.
46. Calvert, C.A., Rawlings C.A., 1985. Pulmonary manifestation of heartworm disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 15, 991-1009.
47. Calvert, C.A., Rawlings, C.A., 1988. Canine heartworm disease. In *Canine and Feline Cardiology*. Ed P. R Fox. NewYork,Churchill Livingstone, 519-548
48. Calvert, C.A., Thomason, J., 2008. Heartworm Disease. In Tilley L.P., Francis, J., Smith, W.K., Oyama, M.A., Sleeper, M.M., *Manual of canine and feline cardiology* (4th ed). Saunders & Elsevier Inc, 183-199.
49. Campbell, W.C., Blair, L.S., 1978. Efficacy of avermectins against *Dirofilaria immitis* in dogs. *Journal of Helminthology*, 52, 308-310.
50. Campbell, W.C., 1985. Ivermectin: an update. *Parasitology Today*, 1(1), 10-16.

51. Campbell, D.J., 1995. Angiotensin peptides in the brain. *Tissue Renin-Angiotensin Systems: Current Concepts of Local Regulators in Reproductive and Endocrine Organs*, 349-355.
52. Campbell, W.C. (2016). Lessons from the history of ivermectin and other antiparasitic agents. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 1-14.
53. Cancrini, G., Kramer, L.H., 2001. Insect vectors of *Dirofilaria* spp., In Heartworm Infection in Humans and Animals, Ediciones Universidad, 63-82.
54. Cancrini, G., Di Regalbono, A.F., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., Pietrobelli, M., 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 118(3-4), 195-202.
55. Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, M., Tolari, F., Dell'Omodarme, M., Prati, M.C., 2006. Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), 574-579.
56. Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H.P., Giannelli, A., Ionică, A.M., Maia, C., 2018. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites and Vectors*, 11, 1-21.
57. Cappellin, E., Gatti, R., Spinella, P., De Palo, C. B., Woloszczuk, W., Maragno, I., De Palo, E. F., 2001. Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) fragments proANP (1–30) and proANP (31–67) measurements in chronic heart failure: a useful index for heart transplantation?. *Clinica Chimica Acta*, 310(1), 49-52.
58. de Caprariis, D., Sasanelli, M., Paradies, P., Otranto, D., Lia, R., 2009. Monoclonal gammopathy associated with heartworm disease in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(6), 296-300.
59. Carretón, E., Corbera, J.A., Juste, M.C., Morchón, R., Simón, F., Montoya-Alonso, J.A., 2011. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Veterinary Parasitology*, 176, 313–316.
60. Carretón, E., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Morchón, R., Simón, F., Passeri, B., Cantoni, A.M., Kramer, L., 2013a. D-dimer deposits in lungs and kidneys suggest its use as a marker in the clinical workup of dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), 182-186.
61. Carretón, E., Morchón, R., González-Miguel, J., Simón, F., Juste, M. C., Montoya-Alonso, J. A. 2013b. Variation of D-dimer values as assessment of pulmonary thromboembolism during adulticide treatment of heartworm disease in dogs. *Veterinary Parasitology*, 195(1-2), 106-111.
62. Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M.C., Méndez, J.C., Montoya-Alonso, J.A., 2014. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 43-47.

63. Carretón, E., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caro-Vadillo, A., Montoya-Alonso, J.A., 2017. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasites and Vectors*, 10, 165-171.
64. Carusillo, A., Mussolino, C., 2020. DNA damage: from threat to treatment. *Cells*, 9(7), 1665.
65. Çenesiz, S., 2020. The role of oxidant and antioxidant parameters in the infectious diseases: A systematic literature review. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26, 849-858.
66. Chandrashekar, R., Beall, M.J., Saucier, J., O'Connor, T., McCall, J.W., McCall, S.D., 2014. Experimental *Dirofilaria immitis* infection in dogs: effects of doxycycline and advantage multi® administration on immature adult parasites. *Veterinary Parasitology*, 206, 939-8.
67. Carmichael, J., McCall, S., DiCosty, U., Mansour, A., Roycroft, L., 2017. Evaluation of *Dirofilaria immitis* antigen detection comparing heated and unheated serum in dogs with experimental heartworm infections. *Parasites and Vectors*, 10, 135-143.
68. Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235-263.
69. Chelomina, G.N., 2018. Clonorchis. In Handbook of foodborne diseases; Liu, D., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 723-726.
70. Chelomina, G.N., Kukla, S.P., Chelomin, V.P., Doanh, P.N., 2021. Genotoxicity of *Paragonimus heterotremus* infection in a rat model of simultaneous pulmonary and hepatic paragonimiasis. *Biomedicines*, 9(9), 1180.
71. Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.
72. Ciuca, L., Musella, V., Miron, L.D., Maurelli, M.P., Cringoli, G., Bosco, A., Rinaldi, L., 2016. Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. *Geospatial Health*, 11(3).
73. Cohen, I., 1979. Role of endothelial cell injury and platelets in atherogenesis. *Artery*, 5, 237-245.
74. Colleu-Durel, S., Guitton, N., Nourgalieva, K., Legue, F., Leveque, J., Danic, B., Chenal, C., 2004. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. *European Journal of Cancer*, 40(3), 445-451.
75. Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261.
76. Costa-Rodríguez, N., García-Rodríguez, S.N., Matos, J.I., Falcón-Cordón, Y., Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., 2023. Usefulness of NT-proBNP in dogs with heartworm: could this biomarker be useful to evaluate pulmonary hypertension? *Parasites and Vectors*, 16(1), 292.

77. Dahl, E.L., Shock, J.L., Shenai, B.R., Gut, J., DeRisi, J.L., Rosenthal, P.J., 2006. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3124-3131.
78. Dantas-Torres, F., 2008. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*, 1, 1-17.
79. Davitkov, D., Davitkov, D., Vučićević, M., Nešić, V., Glavinić, U., Stevanović, J., Stanimirović, Z., 2016. Molecular detection and investigation of the presence of *Dirofilariosis* causative agent in dogs on the territory of Belgrade. *Veterinarski Glasnik*, 70(3-4), 89-98.
80. Dechakhamphu, S., Yongvanit, P., Nair, J., Pinlaor, S., Sithithaworn, P., Bartsch, H., 2008. High excretion of etheno adducts in liver fluke-infected patients: protection by praziquantel against DNA damage. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 17(7), 1658-1664.
81. DeFrancesco, T.C., Rush, J.E., Rozanski, E.A., Hansen, B.D., Keene, B.W., Moore, D.T., Atkins, C.E., 2007. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(2), 243-250.
82. Dewhurst, E., Cue, S., Crawford, E., Pappasoulotis, K., 2008. A retrospective study of canine d-dimer concentrations measured using an immunometric "Point-of-Care" test. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 344-348.
83. Diakou, A., Soubasis, N., Chochlios, T., Oikonomidis, I.L., Tselekis, D., Koutinas, C., Karaiosif, R., Psaralexi, E., Tsouloufi, T.K., Brellou, G., Kritsepi-Konstantinou, M., 2019. Canine and feline dirofilariosis in a highly enzootic area: first report of feline dirofilariosis in Greece. *Parasitology Research*, 118, 677-682.
84. Dickson, B.K., Zhou, J., 2020. Role of reactive oxygen species and iron in host defense against infection. *Frontiers in Bioscience*, 1, 50-56.
85. Dimri, U., Singh, S. K., Sharma, M. C., Behera, S. K., Kumar, D., Tiwari, P., 2012. Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 296-299.
86. Di Nisio, M., Squizzato, A., Rutjes, A.W., Büller, H.R., Zwinderman, A.H., Bossuyt, P.M., 2007. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(2), 296-304.
87. Diosdado, A., Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J., 2020. *Dirofilaria immitis* possesses molecules with anticoagulant properties in its excretory/secretory antigens. *Parasitology*, 147(5), 559-565.
88. Đelić, N., Radaković, M., Borozan, S., Dimirijević-Srećković, V., Pajović, N., Vejnović, B., Borozan, N., Bankoglu, E.E., Stopper, H., Stanimirovic, Z., 2019. Oxidative stress and DNA damage in peripheral blood mononuclear cells from normal, obese, prediabetic and diabetic persons exposed to adrenaline *in vitro*. *Mutation research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 81-89.

89. Đelić, N., Borozan, S., Dimitrijević-Srećković, V., Pajović, N., Mirilović, M., Stopper, H., Stanimirović, Z., 2022. Oxidative stress and DNA damage in peripheral blood mononuclear cells from normal, obese, prediabetic and diabetic persons exposed to thyroid hormone *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9072.
90. Drake, J., Gruntmeir, J., Merritt, H., Allen, L., Little, S.E., 2015. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasites and Vectors*, 8, 1-5.
91. Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review*, 82, 47-95.
92. El-Sayed, N.M., Eman, M.A., 2014. *Toxoplasma gondii* infection can induce retinal DNA damage: an experimental study. *International Journal of Ophthalmology*, 7(3), 431.
93. Evans, C.C., Moorhead, A.R., Storey, B.E., Blagburn, B.L., Wolstenholme, A.J., Kaplan, R.M., 2017. Evaluation of the larval migration inhibition assay for detecting macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 246, 76-81.
94. Evans, C.C., Bradner, J.L., Savadelis, M.D., Nelson, C.T. and Moorhead, A.R., 2019. Acetic acid as an alternative reagent in the modified Knott test. *Veterinary Parasitology*, 276, p.108975.
95. Eze, J.I., Anene, B.M., Chukwu, C.C., 2008. Determination of serum and organ malondialdehyde (MDA) concentration, a lipid peroxidation index, in *Trypanosoma brucei*-infected rats. *Comparative Clinical Pathology*, 17, 67-72.
96. Falcón-Cordón, Y., Montoya-Alonso, J. A., Caro-Vadillo, A., Matos-Rivero, J. I., Carretón, E., 2019. Persistence of pulmonary endarteritis in canine heartworm infection 10 months after the eradication of adult parasites of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 273, 1-4.
97. Ferreira, C., Afonso, A., Calado, M., Maurício, I., Alho, A.M., Meireles, J., Madeira de Carvalho, L., Belo, S., 2017. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasites and Vectors*, 10, 1-8.
98. Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Landmann, F., Baccei, S.G., Guerrero, R., de Souza Lima, S., 2011. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PloS One*, 6, e20843.
99. Fine, D.M., DeClue, A.E., Reiner, C.R., 2008. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(11), 1674-1679.
100. Florentino, P.T., Mendes, D., Vitorino, F.N.L., Martins, D.J., Cunha, J.P., Mortara, R.A., Menck, C.F., 2021. DNA damage and oxidative stress in human cells infected by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009502.

101. Fonfara, S., Loureiro, J., Swift, S., James, R., Cripps, P., Dukes-McEwan, J., 2010. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *The Veterinary Journal*, 184(3), 334-339.
102. Fortin, J.F., Slocombe, J.O.D., 1981. Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* and *Aedes triseriatus* and *Ae. vexans*. *Mosquito News*, 41, 625-633.
103. Fox, P.R., Oyama, M.A., Reynolds, C., Rush, J.E., DeFrancesco, T.C., Keene, B.W., Atkins, C.E., MacDonald, K.A., Schober, K.E., Bonagura, J.D., Stepien, R.L., 2009. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *Journal of Veterinary Cardiology*, 11, 51-61.
104. França, R.T., Da Silva, A.S., Costa, M.M., Paim, F.C., Paim, C.B., Thomé, G.R., Wolkmer, P., Pereira, M.E., Schetinger, M.R.C., Moresco, R.N., Mazzanti, C.M., 2012. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1309-1313.
105. Francis, C.W., Marder, V.J., Barlow, G.H., 1980. Plasmic degradation of crosslinked fibrin: characterization of new macromolecular soluble complexes and a model of their structure. *The Journal of Clinical Investigation*, 66(5), 1033-1043.
106. Fuehrer, H.P., Morelli, S., Bleicher, J., Brauchart, T., Edler, M., Eisschiel, N., Hering, T., Lercher, S., Mohab, K., Reinelt, S., Stessl, T., 2020. Detection of *Crenosoma* spp., *Angiostrongylus vasorum* and *Aelurostrongylus abstrusus* in gastropods in eastern Austria. *Pathogens*, 9(12), p.1046.
107. Furlanello, T., Caldin, M., Vezzoni, A., Venco, L., Kitagawa, H., 1998. Patogenesi, 31-46. In Genchi, C., Venco, L., Vezzoni, A. (ed), La filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto. Editorial Scivac, Cremona, Italy.
108. Furtado, A.P., Melo, F.T., Giese, E.G., dos Santos, J.N., 2010. Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. *Journal of Parasitology*, 96(3), 499-504.
109. Fuster, V., 2006. Novel cardiovascular biomarkers and implications for clinical trials. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 3, 57.
110. Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., Santos-Gomes, G., 2019. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2603730.
111. Gajić, B., Bogunović, D., Vejnović, B., Mirilović, M., Kulišić, Z., 2016. Zastupljenost *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp. kod ne vlasničkih pasa na području Beograda. *Veterinarski Žurnal Republike Srpske*, 16(2), 142-151.
112. Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425.

113. Geersing, G.J., Erkens, P.M., Lucassen, W.A., Büller, H.R., Ten Cate, H., Hoes, A.W., Moons, K.G., Prins, M.H., Oudega, R., van Weert, H.C., Stoffers, H.E., 2012. Safe exclusion of pulmonary embolism using the Wells rule and qualitative D-dimer testing in primary care: prospective cohort study. *BMJ*, 345.
114. Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 286-292.
115. Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M., 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*, 176(4), 295-299.
116. Genchi, M., Rinaldi, L., Venco, L., Cringoli, G., Vismarra, A., Kramer, L., 2019. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. *Veterinary Parasitology*, 267, 26-31.
117. Genchi, C., Kramer, L.H., 2020. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Veterinary Parasitology*, 280, p.108995.
118. Genchi, M., Ciuca, L., Vismarra, A., Ciccone, E., Cringoli, G., Kramer, L., Rinaldi, L., 2021. Evaluation of alternative reagents on the performance of the modified Knott's test. *Veterinary Parasitology*, 298, p.109555.
119. Geyer, J., Janko, C., 2012. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), 969-986.
120. Ghedin, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J.E., Delcher, A.L., Guiliano, D.B., Miranda-Saavedra, D., Angiuoli, S.V., 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science*, 317(5845), 1756-1760.
121. Gioia, G., Lecová, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C., Mortarino, M., 2010. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2), 160-163.
122. Girotti, M.J., Khan, N., McLellan, B.A. 1991. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 31(1), 32-35.
123. Godel, C., Kumar, S., Koutsovoulos, G., Ludin, P., Nilsson, D., Comandatore, F., Wrobel, N., Thompson, M., Schmid, C.D., Goto, S., Bringaud, F., 2012. The genome of the heartworm, *Dirofilaria immitis*, reveals drug and vaccine targets. *The FASEB Journal*, 26(11), 4650.
124. Goldberg, I.D., Stemerman, M.B., Handin, R.I., 1980. Vascular permeation of platelet factor 4 after endothelial injury. *Science*, 209, 611-612.
125. Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G., Kramer, L., 2010. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), 347-351.

126. Gu, Q., Yang, X.P., Bonde, P., DiPaula, A., Fox-Talbot, K., Becker, L.C., 2006. Inhibition of TNF- α reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 48(6), 320-328.
127. Guerrero, J., Genchi, C., Vezzoni, A., Ducos de Lahitte, J., Bussieras, J., Rojo, F.A., Ortega, L.M., Rodenas, A., Bulman, G.M., Larsson, M.H.M.A., Labarthe, N.V., 1989. Distribution of *Dirofilaria immitis* in selected areas of Europe and South America. *Proceedings of Heartworm symposium*, Washinton, DC, USA, 13-18.
128. Guerrero, J., McCall, J.W., Genchi, C., Bazzocchi, C., Kramer, L., Simòn, F., Martarino, M., 2004. Recent advances in heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 125(1-2), 105-130.
129. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
130. Hall, C., 2004. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP. *European Journal of Heart Failure*, 6(3), 257-260.
131. Harr, K.E., Gordon, S.G., Baumwart, R.D., Feldgreber, R., Spiro, M.R., 2022. Analytical validation of a novel point-of-care immunoassay for canine N-terminal pro-brain natriuretic peptide analysis. *Veterinary Clinical Pathology*, 51(3), 398-407.
132. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
133. Heaton, P.R., Ransley, R., Charlton, C.J., Mann, S.J., Stevenson, J., Smith, B.H.E., Rawlings, J.M., Harper, E.J., 2002. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *The Journal of Nutrition*, 132(6), 1598-1603.
134. Hegde, M.L., Hazra, T.K., Mitra, S., 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18(1), 27-47.
135. Holden-Dye, L., Walker, R., 2014. Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 2014, 1-29.
136. Holzmüller, P., Sereno, D., Cavaleyra, M., Mangot, I., Daulouede, S., Vincendeau, P., Lemesre, J.L., 2002. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infection and Immunity*, 70(7), 3727-3735.
137. Hendriks, P.M., van de Groep, L.D., Veen, K.M., van Thor, M.C., Meertens, S., Boersma, E., Boomars, K.A., Post, M.C., van den Bosch, A.E., 2022. Prognostic value of brain natriuretic peptides in patients with pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *American Heart Journal*, 250, 34-44.
138. Henry, L.G., Brunson, K.J., Walden, H.S., Wenzlow, N., Beachboard, S.E., Barr, K.L., Long, M.T., 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Veterinary Parasitology*, 254, 178-182.

139. Holmes, N.E., Charles, P.G., 2009. Safety and efficacy review of doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics*, 1, CMT-S2035.
140. Hugot, J.P., Baujard, P., Morand, S., 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3, 199-208.
141. Ikeda, T., Matsuda, K., Itoh, H., Shirakami, G., Miyamoto, Y., Yoshimasa, T., Nakao, K., Ban, T., 1997. Plasma levels of brain and atrial natriuretic peptides elevate in proportion to left ventricular end-systolic wall stress in patients with aortic stenosis. *American Heart Journal*, 133(3), 307-314.
142. Iliev, P., Kirkova, Z., Ivanov, A., Prelezov, P., Tonev, A., Kalkanov, I., 2017. Retrospective analysis on helminthic and protozoan infections in dogs and cats in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(1), 389-393.
143. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Chemical Agents and Related Occupations, Vol 100 F, A Review of Human Carcinogen; WHO, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2012.
144. Jaiswal, M., LaRusso, N.F., Burgart, L.J., Gores, G.J., 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Research*, 60(1), 184-190.
145. Ionică, A.M., Matei, I.A., D'Amico, G., Bel, L.V., Dumitrache, M.O., Modrý, D., Mihalca, A.D., 2017. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1-6.
146. Iwanuk, N., Nolte, I., Wall, L., Sehn, M., Raue, J., Pilgram, A., Rumstedt, K., Bach, J. P., 2019. Effect of pimobendan on NT-proBNP and c troponin I before and after a submaximal exercise test in dogs with preclinical mitral valve disease without cardiomegaly—a randomised, double-blinded trial. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-11.
147. Jurković, D., Beck, A., Huber, D., Mihaljević, Z., Polkinghorne, A., Martinković, F., Lukačević, D., Pilat, M., Brezak, R., Bosnić, S., Beck, R., 2019. Seroprevalence of vector-borne pathogens in dogs from Croatia. *Parasitology Research*, 118, 347-352.
148. Kaiser, L., Spickard, R.C., Sparks Jr, H.V., Williams, J.F., 1989. *Dirofilaria immitis*: alteration of endothelium-dependent relaxation in the *in vivo* canine femoral artery. *Experimental Parasitology*, 69(1), 9-15.
149. Kartashev, V., Batashova, I., Kartashov, S., Ermakov, A., Mironova, A., Kuleshova, Y., Ilyasov, B., Kolodiy, I., Klyuchnikov, A., Ryabikina, E., Babicheva, M., 2011. Canine and human dirofilariosis in the Rostov region (southern Russia). *Veterinary Medicine International*, 2011, 685713.

- 150.Kausar, S., Khan, W., Dwivedi, S., Azam, A., 2020. Antifilarial effect of nanocomposite of silver nanoparticles with nitazoxanide against the microfilariae of *Setaria cervi*-infected albino rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 1341-1356.
- 151.Kay, J., Thadhani, E., Samson, L., Engelward, B., 2019. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA Repair*, 83, 102673.
- 152.Kesici, H., Değer, Y., Oguz, B., Özdek, U., 2022. The serum total and lipid-bound sialic acid with hematological-biochemical parameter levels in dogs with dirofilariosis. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(1), 3589-3596.
- 153.Khanmohammadi, M., Akhlaghi, L., Razmjou, E., Falak, R., Enameh, R.Z., Mokhtarian, K., Arshadi, M., Tasbihi, M., Meamar, A.R., 2020. Morphological description, phylogenetic and molecular analysis of *Dirofilaria immitis* isolated from dogs in the northwest of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(1), 57.
- 154.Khedri, J., Radfar, M.H., Borji, H., Azizzadeh, M., Akhtardanesh, B., 2014. Canine heartworm in southeastern of Iran with review of disease distribution. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 560.
- 155.King, I.L., Li, Y., 2018. Host–parasite interactions promote disease tolerance to intestinal helminth infection. *Frontiers in Immunology*, 9, p.411552.
- 156.Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., Hocevar, B.A., 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 96-109.
- 157.Klotins, K.C., Martin, S.W., Bonnett, B.N., Peregrine, A.S., 2000. Canine heartworm testing in Canada: are we being effective?. *The Canadian Veterinary Journal*, 41(12), 929.
- 158.Knight, D.H., 2004. Heartworm infection. Textbook of respiratory disease in dogs and cats. Edited by: King, L.G., Saunders, St. Louis, 517-525.
- 159.Kim, S.J., Suh, S.I., Hyun, C., 2020. Evaluation of red blood cell profiles in dogs with heartworm disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 84(4), 265-271.
- 160.van Kimmenade, R.R., Januzzi Jr, J.L., 2009. The evolution of the natriuretic peptides–Current applications in human and animal medicine. *Journal of Veterinary Cardiology*, 11, 9-21.
- 161.Knott, J., 1939. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(2), 191–196.
- 162.Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H., Erel, O., 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1-2), 71-78.
- 163.Köse, M., Erdoğan, M., 2012. Serological screening of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in Turkey. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 125(11-12), 503-508.

164. Kotani, T., Powers, K.G., 1982. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 43(12), 2199-2206.
165. Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C., 2005. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections?. *Veterinary Parasitology*, 133(2-3), 133-136.
166. Kramer, F., Schaper, R., Schunack, B., Połozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A., Jodies, R., Kowalska, D., Schüpbach, D., Pantchev, N., 2014. Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitology Research*, 113, 3229-3239.
167. Kume, S., Itagaki, S., 1955. On the life-cycle of *Dirofilaria immitis* in the dog as the final host. *British Veterinary Journal*, 111(1), 16-24.
168. Kurucz, K., Kepner, A., Krtinic, B., Zana, B., Földes, F., Bányai, K., Oldal, M., Jakab, F., Kemenesi, G., 2016. First molecular identification of *Dirofilaria* spp. (Onchocercidae) in mosquitoes from Serbia. *Parasitology Research*, 115, 3257-3260.
169. Labarthe, N., Serrão, M.L., Fontenele Melo, Y., Oliveira, S.J.D., Lourenço-de-Oliveira, R., 1998. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 145-154.
170. Labarthe, N., Guerrero, J., 2005. Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico?. *Veterinary Parasitology*, 133(2-3), 149-156.
171. Laidoudi, Y., Davoust, B., Varloud, M., Niang, E.H.A., Fenollar, F., Mediannikov, O., 2020. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1-15.
172. Lau, D.C.W., Power, R.I., Slapeta, J., 2024. Exploring multiplex qPCR as a diagnostic tool for detecting microfilarial DNA in dogs infected with *Dirofilaria immitis*: A comparative analysis with the modified Knott's test. *Veterinary Parasitology*, 325, p.110097.
173. Lee, A.C., Montgomery, S.P., Theis, J.H., Blagburn, B.L., Eberhard, M.L., 2010. Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends in Parasitology*, 26(4), 168-173.
174. Lee, K., Park, J.S., Seo, K.W., Song, K.H., 2018. Evaluation of ST2 and NT-proBNP as cardiac biomarkers in dogs with heartworm disease. *Korean Journal of Veterinary Service*, 41(2), 79-83.
175. Lee, T.R., Hwang, S.H., Seo, K.W., Song, K.H., 2020. Evaluation of serum NT-proBNP and cardiac troponin I concentrations in dogs with heartworm disease. *Journal of Veterinary Clinics*, 37(6), 311-316.
176. Ledesma, N., Harrington, L., 2011. Mosquito vectors of dog heartworm in the United States: vector status and factors influencing transmission efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(4), 178-185.

177. Lehman, C.M., Wilson, L.W., Rodgers, G.M., 2004. Analytic validation and clinical evaluation of the STA LIATEST immunoturbidimetric D-dimer assay for the diagnosis of disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(2), 178-184.
178. Leidy J. 1856. On filarial canis cordis. *Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 8(2), 5-59.
179. de Lima, G.V., Ferreira, F.D.S., 2017. N-terminal-pro brain natriuretic peptides in dogs and cats: a technical and clinical review. *Veterinary World*, 10, 1072-1082.
180. Little, S., Saleh, M., Wohltjen, M., Nagamori, Y., 2018. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasites and Vectors*, 11, 1-10.
181. Litster, A., Atkins, C., Atwell, R., Buchanan, J., 2005. Radiographic cardiac size in cats and dogs with heartworm disease compared with reference values using the vertebral heart scale method: 53 cases. *Journal of Veterinary Cardiology*, 7(1), 33-40.
182. Liu, C., Yang, N., Jianbin, H., Yang, M., Sun, M., 2013. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Shenyang, northeastern China. *Korean Journal of Parasitology*, 51, 375-377.
183. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
184. Losonsky, J.M., Thrall, D.E., Lewis, R.E., 1983. Thoracic radiographic abnormalities in 200 dogs with heartworm infestation. *Veterinary Radiology*, 24, 124.
185. Lovis, L., Grandjean, M., Overney, L., Seewald, W., Sager, H., 2017. Seasonality and circadian variation of microfilaremia in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 243, 235-241.
186. Lu, T.L., Wong, J.Y., Tan, T.L., Hung, Y.W., 2017. Prevalence and epidemiology of canine and feline heartworm infection in Taiwan. *Parasites and Vectors*, 10, 7-15.
187. Maerz, I., 2020. Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Veterinary Parasitology*, 283, p.109156.
188. Mair, J., 2008. Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46, 1507-14.
189. Maizels, R.M., 2013. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, 193, 365-374.
190. Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J., Deplazes, P., 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1-5.

191. Maldonado, E., Rojas, D.A., Morales, S., Miralles, V., Solari, A., 2020. Dual and opposite roles of reactive oxygen species (ROS) in Chagas disease: beneficial on the pathogen and harmful on the host. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-17.
192. Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B., 2002. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 509(1-2), 127-151.
193. Manfredi, M.T., DiCerbo, A., Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe Parassitologiche*, 8, 40-45.
194. Marčić, D., Potkonjak, A., Stošić, M.Z., Spasojević-Kosić, L., Pušić, I., Savić, S., 2020. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from shelters in Vojvodina, Serbia. *Acta Scientiae Veterinariae*, 48, 1772.
195. Martin, R.J., Robertson, A.P., Choudhary, S., 2021. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends in Parasitology*, 37(1), 48-64.
196. McCall, J.W., 1981. The role of arthropods in the development of animal models for filariasis research. *Georgia Entomological Society Journal*, 16(1), 283-293.
197. McCall, J.W., 2005. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update and recommendations. *Veterinary Parasitology*, 133, 197-205.
198. McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*, 66, 193-285.
199. McCall, J.W., Kramer, L., Genchi, C., Guerrero, J., Dzimianski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A., McCall, S.D., Supakorndej, N., Grandi, G., Carson, B., 2011. Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 176(4), 361-367.
200. McCall, J.W., Kramer, L., Genchi, C., Guerrero, J., Dzimianski, M.T., Mansour, A., McCall, S.D., Carson, B., 2014. Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 5-13.
201. McCall, J.W., Mansour, A., DiCosty, U., Fricks, C., McCall, S., Dzimianski, M.T., Carson, B., 2023a. Long-term evaluation of viability of microfilariae and intravenously transplanted adult *Dirofilaria immitis* in microfilaremic dogs treated with low-dose, short-and long-treatment regimens of doxycycline and ivermectin. *Parasites and Vectors*, 16(1), p.190.
202. McCall, J.W., DiCosty, U., Mansour, A., Fricks, C., McCall, S., Dzimianski, M.T., Carson, B., 2023b. Inability of *Dirofilaria immitis* infective larvae from mosquitoes fed on blood from microfilaremic dogs during low-dose and short-treatment regimens of doxycycline and ivermectin to complete normal development in heartworm naïve dogs. *Parasites and Vectors*, 16(1), 1-7.

203. McHaffie, J., 2012. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. *Parasitology Research*, 110, 499-502.
204. McTier, T.L., Six, R.H., Pullins, A., Chapin, S., McCall, J.W., Rugg, D., Maeder, S.J., Woods, D.J., 2017. Efficacy of oral moxidectin against susceptible and resistant isolates of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Parasites and Vectors*, 10, 39-45.
205. Méndez, J.C., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J.J., Montoya-Alonso, J.A., 2015. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*, 209(3-4), 197-201.
206. Mircean, V., Dumitrache, M.O., Györke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A.D., Cozma, V., 2012. Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(7), 595-604.
207. Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175.
208. Miterpáková, M., Valentová, D., Čabanová, V., Berešíková, L., 2018. Heartworm on the rise—New insights into *Dirofilaria immitis* epidemiology. *Parasitology Research*, 117, 2347-2350.
209. Montarsi, F., Ciocchetta, S., Devine, G., Ravagnan, S., Mutinelli, F., Frangipane di Regalbono, A., Otranto, D., Capelli, G., 2015. Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1-9.
210. Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2010. Epidemiological survey of canine heartworm disease on the island of Gran Canaria (Canary Islands—Spain) between 2000 and 2008. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 165-168.
211. Morchón, R., Bargues, M.D., Latorre, J.M., Melero-Alcibar, R., Pou-Barreto, C., Mas-Coma, S., Simón, F., 2007. Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(4), 653-658.
212. Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., Mellado-Hernández, I., 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe—new distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3, p.196.
213. Moreira, H.R., Madeira, E.A., Cunha, D.N.L., Scofield, A., Góes-Cavalcante, G., Abel, I., Guimarães, R.J., Fernandes, J.I., 2019. *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Algodual Island, Brazilian Amazon. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39, 510-515.
214. Moreno, Y., Nabhan, J.F., Solomon, J., Mackenzie, C.D., Geary, T.G., 2010. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 20120-20125.

215. Morey, A.G., Lamb, K.E., Karnia, J.J., Wiggen, K.E., Lyons, B.M., Nafe, L.A., Leach, S.B., 2023. N-terminal brain natriuretic peptide, cardiac troponin-I, and point-of-care ultrasound in dogs with cardiac and noncardiac causes of nonhemorrhagic ascites. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37(3), 900-909.
216. Morrow, D.A., de Lemos, J.A., 2007. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation*, 115, 949-952.
217. Motran, C.C., Silvane, L., Chiapello, L.S., Theumer, M.G., Ambrosio, L.F., Volpini, X., Celas, D.P., Cervi, L., 2018. Helminth infections: recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. *Frontiers in Immunology*, 9, p.350291.
218. Mukendi, J.P.K., Kimbita, E., Mbanzulu, K.M., Maindo, P.P.M., Misinzo, G., 2016. Morphological and molecular detection of canine dirofilarial species of veterinary and medical importance in Morogoro municipality, Tanzania. *Veterinary Parasitology*, 220, 1-3.
219. Mukoyama, M., Nakao, K., Saito, Y., Ogawa, Y., Hosoda, K., Suga, S.I., Shirakami, G., Jougasaki, M., Imura, H., 1990. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 323(11), 757-758.
220. Mukoyama, M., Nakao, K., Hosoda, K., Suga, S., Saito, Y., Ogawa, Y., Shirakami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., 1991. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(4), 1402-1412.
221. Mycroft, F.J., Hiatt, P.H., 1990. The toxic hazards of industrial and occupational chemicals. In *Poisoning and Drug Overdose* (ed. Olsen, K. R.), Appleton and Lange, Norwalk, 358-504.
222. Nazar, N., Lakshmanan, B., Jayavardhanan, K.K., 2017. Molecular characterization of human *Dirofilaria* isolates from Kerala. *Indian Journal of Medical Research*, 146(4), 528-533.
223. Negron, V., Saleh, M.N., Sobotyck, C., Luksovsky, J.L., Harvey, T.V., Verocai, G.G., 2022. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in combination with antigen detection tests. *Parasites and Vectors*, 15(1), 1-7.
224. Nelson, O.L., Andreasen, C., 2003. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 830-834.
225. Nelson, C.T., McCall, J.W., Rubin, S.B., Buzhardt, L.F., Dorion, D.W., Graham, W., Longhofer, S.L., Guerrero, J., Robertson-Plouch, C., Paul, A., 2005. 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 133, 255-266.
226. Nelson, C.T., Myrick, E.S., Nelson, T.A., 2017. Clinical benefits of incorporating doxycycline into a canine heartworm treatment protocol. *Parasites and Vectors*, 10, 181-184.

227. Nelson, C.T., McCall, J.W., Jones, S., Moorhead, A., 2018. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of the heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Edited by Wilmington, American Heartworm Society.
228. Nelson, C.T., McCall, J. W., Jones, S., Moorhead, A., 2020. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs, Wilmington.
229. Nelson, C.T., 2021. Heartworm and related nematodes. In Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat, WB Saunders, 1399-1417.
230. Nguyen, C., Koh, W.L., Casteriano, A., Beijerink, N., Godfrey, C., Brown, G., Emery, D., Slapeta, J., 2016. Mosquito-borne heartworm *Dirofilaria immitis* in dogs from Australia. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1-11.
231. Niwetpathomwat, A., Kaewthamasorn, M., Tiawsirisup, S., Techangamsuwan, S., Suvarnvibhaja, S., 2007. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Science*, 82(3), 364-369.
232. Noack, S., Harrington, J., Carithers, D.S., Kaminsky, R., Selzer, P.M., 2021. Heartworm disease—Overview, intervention, and industry perspective. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 16, 65-89.
233. Nohl, H., Esterbauer, H., Evans, C.R., 1996. Free radicals in the environment, medicine and toxicology: critical aspects and current highlights. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 765.
234. Oi, M., Yoshikawa, S., Ichikawa, Y., Nakagaki, K., Matsumoto, J., Nogami, S., 2014. Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999-2001 and 2009-2011. *Parasite*, 21.
235. Oi, M., Sato, Y., Nakagaki, K., Nogami, S., 2015. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. *Parasitology Research*, 114(10), 3645-3648.
236. Olson, J.D., 2015. D-dimer: an overview of hemostasis and fibrinolysis, assays, and clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, 69, 1-46.
237. Omeragić, J., Alagić, D., Šerić-Haračić, S., Kapo, N., Klarić Soldo, D., Šabić, E., Crnkić, Ć., Hadžijunuzović-Alagić, Dž., Aganović, E., Škapur, V., 2021. Zoonotic endoparasites in dogs from the Bosnian-Podrinje Canton, Bosnia and Herzegovina. *Macedonian Veterinary Review*, 44(1), 63-70.
238. Orihel, T.C., 1961. Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *The Journal of Parasitology*, 47(2), 251-262.
239. Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites and Vectors*, 6, 16.

240. Otranto, D., Iatta, R., Baneth, G., Cavalera, M.A., Bianco, A., Parisi, A., Dantas-Torres, F., Colella, V., McMillan-Cole, A.C., Chomel, B., 2019. High prevalence of vector-borne pathogens in domestic and wild carnivores in Iraq. *Acta Tropica*, 197, p.105058.
241. Oyama, M.A., Rush, J.E., Rozanski, E.A., Fox, P.R., Reynolds, C.A., Gordon, S.G., Bulmer, B.J., Lefbom, B.K., Brown, B.A., Lehmkuhl, L.B., Prosek, R., 2009. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(11), 1319-1325.
242. Oyama, M.A., Singletary, G.E., 2010. The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(4), 545-558.
243. Paes-de-Almeida, E.C., Ferreira, A.M.R., Labarthe, N.V., Caldas, M.L.R., McCall, J.W., 2003. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Veterinary Parasitology*, 113, 157-168.
244. Palmai-Pallag, T., Bachrati, C.Z., 2014. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes and Infection*, 16(10), 822-832.
245. Panarese, R., Iatta, R., Mendoza-Roldan, J.A., Szlosek, D., Braff, J., Liu, J., Beugnet, F., Dantas-Torres, F., Beall, M.J., Otranto, D., 2020. Comparison of diagnostic tools for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Pathogens*, 9(6), p.499.
246. Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L., 2009. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitology Research*, 105, 101-114.
247. Pawłowska, M., Mila-Kierzenkowska, C., Szczegielniak, J., Woźniak, A., 2023. Oxidative stress in parasitic diseases—reactive oxygen species as mediators of interactions between the host and the parasites. *Antioxidants*, 13(1), 38.
248. Pinlaor, S., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Tada-Oikawa, S., Ma, N., Pinlaor, P., Sithithaworn, P., Sripa, B., Murata, M., Oikawa, S., Kawanishi, S., 2006. iNOS-dependent DNA damage via NF- κ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the antihelminthic drug praziquantel. *International Journal of Cancer*, 119(5), 1067-1072.
249. Potter, L.R., Yoder, A.R., Flora, D.R., Antos, L.K., Dickey, D.M., 2009. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, 341-366.
250. Potkonjak, A., Rojas, A., Gutiérrez, R., Nachum-Biala, Y., Kleinerman, G., Savic, S., Polacek, V., Pusic, I., Harrus, S., Baneth, G., 2020. Molecular survey of *Dirofilaria* species in stray dogs, red foxes and golden jackals from Vojvodina, Serbia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68, p.101409.
251. Prichard, R.K., 2021. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: risks for prevention of heartworm disease. *International Journal for Parasitology*, 51(13-14), 1121-1132.

252. Prosek, R., Sisson, D.D., Oyama, M.A., Solter, P.F., 2007. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(2), 238-242.
253. Pugliese, M., Napoli, E., Monti, S., Biondi, V., Zema, E., Passantino, A., 2022. Oxidative stress and high-mobility group box 1 assay in dogs with gastrointestinal parasites. *Antioxidants*, 11(9), 1679.
254. Puttachary, S., Trailović, S.M., Robertson, A.P., Thompson, D.P., Woods, D.J., Martin, R.J., 2013. Derquantel and abamectin: effects and interactions on isolated tissues of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 188(2), 79-86.
255. Radaković, M., Stevanović, J., Đelić, N., Lakić, N., Knežević-Vukcević, J., Vuković-Gačić, B., Stanimirović, Z., 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the comet assay. *Journal of Biosciences*, 38, 53-62.
256. Radev, V., Lalkovski, N., Zhelyazkov, P., Kostova, T., Sabev, P., Nedelchev, N., Vassileva, R., 2016. Prevalence of gastrointestinal parasites and *Dirofilaria* spp. in stray dogs from some regions in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 19(1), 57-62.
257. Raja, A.S., Greenberg, J.O., Qaseem, A., Denberg, T.D., Fitterman, N., Schuur, J.D., 2015. Evaluation of patients with suspected acute pulmonary embolism: best practice advice from the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 163(9), 701-711.
258. Rajamanickam, C., Wiesenhutter, E., Zin F.M., Hamid, J., 1985. The incidence of canine haematozoa in Peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology*, 17, 151-157.
259. Rajković, M., Glavinić, U., Bogunović, D., Vejnović, B., Davitkov, D., Đelić, N., Stanimirović, Z., 2023. "Slow kill" treatment reduces DNA damage in leukocytes of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 322, 110008.
260. Rammal, D., Koutinas, C.K., Athanasiou, L.V., Tangalidi, M., Rubio, C.P., Cerón, J.J., Tamvakis, A., Patsikas, M.N., Polizopoulou, Z.S., 2023. Association of paraoxonase-1 and NT-proBNP with clinical, clinico-pathologic and echocardiographic variables in dogs with mitral valve disease. *Veterinary Sciences*, 10(1), 33.
261. Rath, P. K., Panda, S. K., Mishra, B. P., Patra, R. C., Nath, I., 2014. Thoracic radiography and oxidative stress indices in heartworm affected dogs. *Veterinary World*, 7(9), 689-692.
262. Rehman, S.U., Januzzi Jr, J.L., 2008. Natriuretic peptide testing in clinical medicine. *Cardiology in Review*, 16(5), 240-249.
263. Reimann, M.J., Häggström, J., Møller, J.E., Lykkesfeldt, J., Falk, T., Olsen, L.H., 2017. Markers of oxidative stress in dogs with myxomatous mitral valve disease are influenced by sex, neuter status, and serum cholesterol concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(2), 295-302.

- 264.Rjeibi, M.R., Rouatbi, M., Mabrouk, M., Tabib, I., Rekik, M., Gharbi, M., 2017. Molecular study of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs from Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1505-1509.
- 265.Roberts, R., Sobel, B.E., Parker, C.W., 1976. Radioimmunoassay for creatine kinase isoenzymes. *Science*, 194(4267), 855-857.
- 266.Robinson, M.W., Menon, R., Donnelly, S.M., Dalton, J.P., Ranganathan, S., 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(8), 1891-1907.
- 267.Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V.M., Baneth, G., 2015. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasites and Vectors*, 8, 1-10.
- 268.Rossi, M., Fasel, N., 2018. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. *International Immunology*, 30(3), 103-111.
- 269.Roy, P., Saha, A., 2002. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*, 38-45.
- 270.Russell, R.C., Geary, M.J., 1992. The susceptibility of the mosquitoes *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* to infection with dog heartworm *Dirofilaria immitis* and their vector efficiency. *Medical and Veterinary Entomology*, 6(2), 154-158.
- 271.Sagonas, K., Meyer, B.S., Kaufmann, J., Lenz, T.L., Häsler, R., Eizaguirre, C., 2020. Experimental parasite infection causes genome-wide changes in DNA methylation. *Molecular Biology and Evolution*, 37(8), 2287-2299.
- 272.Sanaei, E., Charlat, S. and Engelstädter, J., 2021. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 96(2), 433-453.
- 273.Santa-Ana, M., Khadem, M., Capela, R., 2006. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (nematoda: filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 104-106.
- 274.Saint Andre, A., Blackwell, N.M., May, L.R., Hoerauf, A., Brattig, N.W., Volkmann, L., Taylor, M.J., Ford, L., Hise, A.G., Lass, J.H., Diaconu, E., Pearlman, E., 2002. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science*, 295, 1892-1895.
- 275.Savadelis, M.D., Ohmes, C.M., Hostetler, J.A., Settje, T.L., Zolynas, R., Dzimianski, M.T., Moorhead, A.R., 2017. Assessment of parasitological findings in heartworm-infected beagles treated with Advantage Multi® for dogs (10% imidacloprid+ 2.5% moxidectin) and doxycycline. *Parasites and Vectors*, 10, 1-7.

- 276.Savadelis, M.D., Day, K.M., Bradner, J.L., Wolstenholme, A.J., Dzimianski, M.T., Moorhead, A.R., 2018. Efficacy and side effects of doxycycline versus minocycline in the three-dose melarsomine canine adulticidal heartworm treatment protocol. *Parasites and Vectors*, 11, 1-7.
- 277.Savadelis, M.D., Coleman, A.E., Rapoport, G.S., Sharma, A., Sakamoto, K., Keys, D.A., Ohmes, C.M., Hostetler, J.A., Dzimianski, M.T., Moorhead, A.R., 2020. Clinical assessment of heartworm-infected beagles treated with a combination of imidacloprid/moxidectin and doxycycline, or untreated. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(5), 1734-1745.
- 278.Savić, S., Stošić, M.Z., Marčić, D., Hernández, I., Potkonjak, A., Otašević, S., Ružić, M., Morchón, R., 2020. Seroepidemiological study of canine and human dirofilariasis in the endemic region of northern Serbia. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 571.
- 279.Schafer, A.I., Handin, R.I., 1979. The role of platelets in thromboembolic and vascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 22, 31-52.
- 280.Schaub, R.G., Rawlings, C.A., 1980. Pulmonary vascular response during phases of canine heartworm disease: scanning electron microscopic study. *American Journal of Veterinary Research*, 41(7), 1082-1089.
- 281.Schnyder, M., Deplazes, P., 2012. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites and Vectors*, 5(1), 258.
- 282.Schwan, E.V., Durand, D.T., 2002. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae: research communication. *Journal of the South African Veterinary Association*, 73(3), 124-126.
- 283.Sebai, E., Abidi, A., Serairi, R., Marzouki, M., Saratsi, K., Darghouth, M.A., Sotiraki, S., Akkari, H., 2021. Essential oil of *Mentha pulegium* induces anthelmintic effects and reduces parasite-associated oxidative stress in rodent model. *Experimental Parasitology*, 225, p.108105.
- 284.Serarslan, G., Yılmaz, H.R., Söğüt, S., 2005. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 30(3), 267-271.
- 285.Self, S.C., Liu, Y., Nordone, S.K., Yabsley, M.J., Walden, H.S., Lund, R.B., Bowman, D.D., Carpenter, C., McMahan, C.S., Gettings, J.R., 2019. Canine vector-borne disease: mapping and the accuracy of forecasting using big data from the veterinary community. *Animal Health Research Reviews*, 20(1), 47-60.
- 286.Sevimli, F.K., Kozan, E., Bülbül, A., Birdane, F.M., Köse, M., Sevimli, A., 2007. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: unusually located and unusual findings. *Parasitology research*, 101, 1487-1494.
- 287.Shao, L., Lin, J., Huang, M., Ajani, J.A., Wu, X., 2005. Predictors of esophageal cancer risk: assessment of susceptibility to DNA damage using comet assay. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 44, 415-422.

288. Shaw, S.P., Rozanski, E.A., Rush, J.E., 2004. Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(3), 322-324.
289. Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748.
290. da Silva, A.S., Munhoz, T.D., Faria, J.L., Vargas-Hernández, G., Machado, R.Z., Almeida, T.C., Moresco, R.N., Stefani, L.M., Tinucci-Costa, M., 2013. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: effect on the pathogenesis of the disease. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 366-369.
291. Simón, F., Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., López-Belmonte, J., Grandi, G., Genchi, C., 2008. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: its effect on endothelial mammal cells. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 223-231.
292. Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 507-544.
293. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
294. Sorci, G., Faivre, B., 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1513), 71-83.
295. Sripa, B., Brindley, P.J., Mulvenna, J., Laha, T., Smout, M.J., Mairiang, E., Bethony, J.M., Loukas, A., 2012. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*—multiple pathways to cancer. *Trends in Parasitology*, 28(10), 395-407.
296. Starkey, L.A., Bowles, J.V., Blagburn, B.L. (2020). Comparison of acid-versus heat-treatment for immune complex dissociation and detection of *Dirofilaria immitis* antigen in canine plasma. *Veterinary Parasitology*, 282, 109134.
297. Stokol, T., 2003. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 33(6), 1419-1435.
298. Stone, M.J., Willerson, J.T., Gomez-Sanchez, C.E., Waterman, M.R., 1975. Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. *The Journal of Clinical Investigation*, 56(5), 1334-1339.
299. Strasser, A., Simunek, M., Seiser, M., Hofecker, G., 1997. Age-dependent changes in cardiovascular and metabolic responses to exercise in beagle dogs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 44(1-10), 449-460.
300. Suh, G.H., Ahn, K.S., Ahn, J.H., Kim, H.J., Leutenegger, C., Shin, S., 2017. Serological and molecular prevalence of canine vector-borne diseases (CVBDs) in Korea. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1-8.

- 301.Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., 1988. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 332, 78-81.
- 302.Şuleşco, T., Volkova, T., Yashkova, S., Tomazatos, A., Von Thien, H., Lühken, R., Tannich, E., 2016. Detection of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA in mosquitoes from Belarus. *Parasitology Research*, 115, 3535-3541.
- 303.Szewczyk-Golec, K., Pawłowska, M., Wesołowski, R., Wróblewski, M., Mila-Kierzenkowska, C., 2021. Oxidative stress as a possible target in the treatment of toxoplasmosis: perspectives and ambiguities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), p.5705.
- 304.Tabrizi, B.A., 2012. Evaluation of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase in *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *World Journal of Zoology*, 7(1), 79-82.
- 305.Tahir, D., Damene, H., Davoust, B., Parola, P., 2017. First molecular detection of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) infection in dogs from Northern Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 51, 66-68.
- 306.Tan, K.R., Magill, A.J., Parise, M.E., Arguin, P.M., 2011. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(4), p.517.
- 307.Tang, W.H., Francis, G.S., Morrow, D.A., Newby, L.K., Cannon, C.P., Jesse, R.L., Storrow, A.B., Christenson, R.H., Christenson, R.H., Apple, F.S., 2007. National Academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation*, 116(5), 99-109.
- 308.Tasić, A., Rossi, L., Tasić, S., Miladinović-Tasić, N., Ilić, T., Dimitrijević, S., 2008. Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. *Parasitology Research*, 103, 1297-1302.
- 309.Tasić, A., Tasić-Otašević, S., Gabrielli, S., Miladinović-Tasić, N., Ignjatović, A., Đorđević, J., Dimitrijević, S., Cancrini, G., 2012. Canine *Dirofilaria* infections in two uninvestigated areas of Serbia: epidemiological and genetic aspects. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(12), 1031-1035.
- 310.Tasić-Otašević, S., Savić, S., Jurhar-Pavlova, M., Stefanovska, J., Stalević, M., Ignjatović, A., Randelović, M., Gajić, B., Cvetkovikj, A., Gabrielli, S., 2022. Molecular survey of dirofilaria and leishmania species in dogs from Central Balkan. *Animals*, 12(7), p.911.
- 311.Taylor Jr, F.B., Toh, C.H., Hoots, K.W., Wada, H., Levi, M., 2001. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(11), 1327-1330.
- 312.Taylor, M.J., Hoerauf, A., Bockarie, M., 2010. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *The Lancet*, 376(9747), 1175-1185.
- 313.Taylor, M.J., Voronin, D., Johnston, K.L., Ford, L., 2013. *Wolbachia* filarial interactions. *Cellular Microbiology*, 15, 520-526.

- 314.Thamm, D.H., Grunerud, K.K., Rose, B.J., Vail, D.M., Bailey, S.M., 2013. DNA repair deficiency as a susceptibility marker for spontaneous lymphoma in golden retriever dogs: a casecontrol study. *PLoS One*, 8(7), e69192.
- 315.Thanan, R., Murata, M., Pinlaor, S., Sithithaworn, P., Khuntikeo, N., Tangkanakul, W., Hiraku, Y., Oikawa, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., 2008. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(3), 518-524.
- 316.Thomas, D.J., Styblo, M., Lin, S., 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176(2), 127-144.
- 317.Tiawsirisup, S., Nithiuthai, S., 2006. Vector competence of *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) for *Dirofilaria immitis* (Leidy). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 37, p.110.
- 318.Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- 319.Tjostheim, S.S., Kelliham, H.B., Grint, K.A., Stepien, R.L., 2019. Effect of sildenafil and pimobendan on intracardiac heartworm infections in four dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, 23, 96-103.
- 320.Toh, C.H., Downey, C., 2005. Performance and prognostic importance of a new clinical and laboratory scoring system for identifying non-overt disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 16(1), 69-74.
- 321.Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Valle, N. R., Huang, P., 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(8), 1343-1374.
- 322.Trailović, S., 2001. Ispitivanje mehanizama neurotoksičnog delovanja ivermektina. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
- 323.Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Record*, 152(4), 97-105.
- 324.Tudor, N., Ionita, L., Tapaloaga, D., Tudor, P., Ionita, C., Vlagioiu, C., 2014. Radiographic cardiopulmonary changes in dogs with heartworm disease. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(6), 9918-9924.
- 325.Turner, J.D., Marriott, A.E., Hong, D., O'Neill, P., Ward, S.A., Taylor, M.J., 2020. Novel anti-*Wolbachia* drugs, a new approach in the treatment and prevention of veterinary filariasis?. *Veterinary Parasitology*, 279, p.109057.
- 326.Uchide, T., Saida, K., 2005. Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(11), 1155-1161.

327. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.
328. Vatta, A.F., Dzimianski, M., Storey, B.E., Camus, M.S., Moorhead, A.R., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J., 2014. Ivermectin-dependent attachment of neutrophils and peripheral blood mononuclear cells to *Dirofilaria immitis* microfilariae *in vitro*. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 38-42.
329. Venco, L., Vezzoni, A., 2001. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. In: Simón, F., Genchi, C. (Eds.), Heartworm Infection in Humans and Animals. Ediciones Universidad de Salamanca, p. 218.
330. Venco, L., Genchi, C., Simón, F., 2011. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro, pp. 19–60. In Simón, F., Genchi, C., Venco, L., Montoya M.N.(ed), La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. *Merial Laboratorios*, Barcelona, Spain.
331. Vercruyse, J., Rew, R.S. eds., 2002. *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CAB International.
332. Vezzani, D., Eiras, D.F., Wisnivesky, C., 2006. Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), 259-273.
333. Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simoes, A.R., Diez-Banos, P., Gestal, J., 2014. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite*, 21(5).
334. Vinnie-Siow, W.Y., Low, V.L., Tan, T.K., Wong, M.L., Leong, C.S., Ahmad, N.W., Lim, Y.A.L., 2022. Identification of potential vectors of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* (Spirurida: Filariidae): First observation of infective third-stage larva of *B. pahangi* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Pathogens and Global Health*, 116(6), 356-364.
335. Vitale, C.B., Ihrke, P.J., Gross, T.L., 1994. Putative diethylcarbamazine-induced urticaria with eosinophilic dermatitis in a dog. *Veterinary Dermatology*, 5, 197-203.
336. Wada, H., Matsumoto, T., Yamashita, Y., 2014. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *Journal of Intensive Care*, 2, 1-8.
337. Walmacq, C., Cheung, A.C., Kireeva, M.L., Lubkowska, L., Ye, C., Gotte, D., Strathern, J.N., Carell, T., Cramer, P., Kashlev, M., 2012. Mechanism of translesion transcription by RNA polymerase II and its role in cellular resistance to DNA damage. *Molecular Cell*, 46(1), 18-29.
338. Wang, D., Bowman, D.D., Brown, H.E., Harrington, L.C., Kaufman, P.E., McKay, T., Nelson, C.T., Sharp, J.L., Lund, R., 2014. Factors influencing US canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1-18.

339. Watts, K.J., Courtney, C.H., Reddy, G.R., 1999. Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. *Molecular and Cellular Probes*, 13(6), 425-430.
340. Weber, M., Hamm, C., 2006. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart*, 92(6), 843-849
341. Wells, P.S., Anderson, D.R., Rodger, M., Forgie, M., Kearon, C., Dreyer, J., Kovacs, G., Mitchell, M., Lewandowski, B., Kovacs, M.J., 2003. Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 349(13), 1227-1235.
342. Wells, P.S., 2007. Integrated strategies for the diagnosis of venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 41-50.
343. Wiese, S., Breyer, T., Dragu, A., Wakili, R., Burkard, T., Schmidt-Schweda, S., Füchtbauer, E.M., Dohrmann, U., Beyersdorf, F., Radicke, D., Holubarsch, C.J., 2000. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation*, 102(25), 3074-3079.
344. Wolf, J., Law, J.M., Lynch, A., 2021. Non-cardiogenic pulmonary oedema and multisystemic haemorrhage secondary to an accidental intravenous injection of melarsomine in a dog. *Veterinary Record Case Reports*, 9(4), p.e196.
345. Wolstenholme, A.J., Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(1), 85-95.
346. Xu, D., Zhang, J., Shi, Z., Song, C., Zheng, X., Zhang, Y., Hao, Y., Dong, H., Wei, L., El-Mahallawy, H.S., Kelly, P., 2015. Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1-7.
347. Yevstafieva, V., Kryvoruchenko, D., Melnychuk, V., Nikiforova, O., Kone, M., Barabolia, O., 2022. Efficacy of ultrasound in diagnosis of dirofilariasis in dogs caused by *Dirofilaria immitis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(3), 281-286.
348. Yildirim, A., Ica, A., Atalay, O., Duzlu, O. Inci, A., 2007. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Research in Veterinary Science*, 82(3), 358-363.
349. Yildirim, A., Inci, A., Duzlu, O., Biskin, Z., Ica, A., Sahin, I., 2011. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), 143-147.
350. Yilmaz, E., Wongkamchai, S., Ramünke, S., Koutsovoulos, G.D., Blaxter, M.L., Poppert, S., Schaper, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., 2019. High genetic diversity in the *Dirofilaria repens* species complex revealed by mitochondrial genomes of feline microfilaria samples from Narathiwat, Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 389-399.

351. Yoon, W.K., Kim, Y.W., Suh, S.I., Hyun, C., 2017. Evaluation of cardiopulmonary and inflammatory markers in dogs with heartworm infection treated using the slow kill method. *Veterinary Parasitology*, 244, 35-38.
352. Zohdy, S., Valenta, K., Rabaoarivola, B., Karanewsky, C.J., Zaky, W., Pilotte, N., Williams, S.A., Chapman, C.A., Farris, Z.J., 2019. Causative agent of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in wild lemurs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 119-121.

БИОГРАФИЈА

Милан Рајковић рођен је 06. јануара 1992. године у Неготину где је завршио основну школу „Вук Караџић“. Средњу медицинску школу је завршио у Зајечару 2011. године и исте године уписао интегрисане академске студије ветеринарске медицине на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Током студија, био је члан Међународне организације за размену студената (*International Veterinary Students' Association – IVSA*) и у оквиру размене студената боравио је у Румунији 2013. године и Турској 2015. године. Као члан поменуте организације два пута био је делегат *IVSA* Србија у Генералној скупштини *IVSA* и то у Анкари и Истанбулу (Турска) 2015. године и Северној Каролини (Сједињене Америчке Државе) 2017. године. Добитник је стипендије фондације *Merck Animal Health* за обављање студентске летње праксе и 2015. године боравио је на Ветеринарској клиници „Тухатјалка“ у Јуваскули (Финска). У оквиру *CEEPUS* програма одлушао је зимски семестар пете године студија на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Вроцлаву (Пољска). Дипломирао је 2017. године са просечном оценом 8,90 и оценом 10 на дипломском раду под називом: „Директно деловање органофосфатних инсектицида на холинергичне рецепторе“. Исте године уписао је докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Научноистраживачки рад започео је 2017. године као волонтер у оквиру пројекта „Молекуларно-генетичка и екофизиолошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производњи безбедне хране“ ев. бр. III46002 (руководилац: др Зоран Станимировић, редовни професор), а 01. новембра 2018. године засновао је радни однос на Катедри за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду као истраживач припремник. Изабран је у звање истраживач сарадник 2020. године. Током рада у оквиру наведеног пројекта Милан Рајковић је стекао искуство и овладао молекуларним техникама (екстракција ДНК и РНК, гел електрофореза, ланчана реакција полимеризације, одређивање полиморфизма у дужини рестрикционих фрагмената), генотоксиколошким методом комет тест (електрофореза појединачних ћелија) и методом за спектрофотометријско одређивање параметара оксидативног стреса. Одлуком Изборног већа Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (бр. 01-215/8), 21. 9.2022. изабран је у звање асистента за ужу научну област Паратитологија на Катедри за паразитологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

У периоду 2018-2020 био је учесник на пројекту билатералне сарадње између Републике Србије и Републике Француске у оквиру фондације „Павле Савић“ под називом „Функционална испитивања резистенције на макроцикличне лактоне у паразита *Ascaris suum*“ ев. бр. 451-03-01963/2017-09/02 руководиоца проф. др Саше Траиловића преко кога је боравио и под менторством др *Claude-a Charvet-a* радио на Националном институту за истраживања у пољопривреди (*Institut national de la recherche agronomique – INRA*), Лабораторији за паразитологију у оквиру истраживачког тима „Мултирезистенција и фактори патогенезе нематода“ руководиоца истраживачке групе др *Cédric-a Neveu-a*. Од 2019. године, Милан Рајковић је учесник *COST* акције CA15132 “*The Comet assay as a human biomonitoring tool (hcomet)*” у оквиру које је успешно завршио радионицу „Основне технике у комет тесту“ на Институту за генетичко инжењерство и биотехнологију Универзитета у Сарајеву (Босна и Херцеговина). У периоду од 2018–2022. године, Милан Рајковић је учествовао у осам пројеката иновационих ваучера финансираних од стране Фонда за иновациону делатност, где је у два пројекта био и руководиоца. Објавио је укупно 28 библиографских јединица, од чега 12 радова у међународним часописима категорије M20 и то: два (2) рада у међународним часописима изузетних вредности (M21a), шест (6) радова у врхунским међународним часописима (M21),

један (1) рад у истакнутом међународном часопису (M22); три (3) рада у међународним часописима (M23), један (1) рад у националном часопису међународног значаја (M24), један (1) рад у врхунском часопису националног значаја (M51), тринаест (13) саопштења са међународних и националних скупова, од чега једно (1) предавање по позиву са међународног скупа штампано у изводу (M32) и једно (1) ново техничко решење примењено на међународном нивоу (M81). У коауторству са доц. др Даницом Богуновић објавио је и помоћни универзитетски уџбеник Паразитологија 1 – практикум.

Од 13 радова категорије M20 објављених у досадашњој каријери, Милан Рајковић је први аутор на четири рада. Укупни импакт фактора радова објављених у међународним часописима са SCI листе износи 30,975, са 80 цитата, док Хиршов индекс (h-index) износи 5.

Прилог 1

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Милан Рајковић

Број индекса: 2017/5010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*

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

У Београду, 21.02.2025. године

Потпис аутора

M. Rajković

Прилог 2

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милан Рајковић

Број индекса: 2017/5010

Студијски програм: Докторске академске студије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Наслов рада: Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*

Ментор 1: др Урош Главинић, доцент

Ментор 2: др Даница Богуновић, доцент

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 21.02.2025. године

Потпис аутора

M. Rajković

Прилог 3

Изјава о коришћењу

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

Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

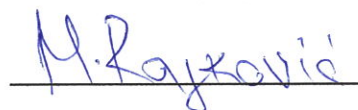
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду, 21.02.2025. године

Потпис аутора



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.