

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

10 Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду на
11 264. Седници, одржаној 25.12.2024. године.

12
13 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

16 **Напомена:** редослед чланова Комисије је такав да се прво наводе наставници са ФВМ а затим чланови
17 из других институција, сем у случају када је ментор дисертације из друге институције. Тада се ментор из
18 друге институције уписује под редним бројем 2, односно после ментора са ФВМ који је под редним бројем
19

- 20 1. Др Зоран Станимировић, редовни професор, биологија, 2007, Факултет
21 ветеринарске медицине Универзитета у Београду
22
23 2. Др Саша Траиловић, редовни професор, фармаркологија и токсикологија, 2013,
24 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
25
26 3. Др Тамара Илић, редовни професор, паразитологија, 2021, Факултет ветеринарске
27 медицине Универзитета у Београду
28
29 4. Др Дарко Давитков, доцент, клиничка дијагностика, патологија и терапија животиња,
30 2021, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
31
32 5. Др Зоран Дебељак, научни сарадник, епизоотиологија, 2018, Ветеринарски
33 специјалистички институт „Краљево“ у Краљеву
34

35
36 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

- 37
38 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Милан, Живојин, Рајковић
39
40 2. **Датум рођења, општина, Република:** 06. 01. 1992., Неготин, Република Србија
41
42 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**
43
44 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**
45

46 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

47
48 Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно
49 инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*
50

51
52 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
53 **шема, графикана и сл.):**

54
55 Докторска дисертација Милана Рајковића под називом „Молекуларна, паразитолошка и
56 клиничка испитивања ефекта терапије паса природно инфицираних нематодом
57 *Dirofilaria immitis*„ написана је на 107 страна текста и садржи следећа поглавља: Увод (2
58 стране), Преглед литературе (21 страна), Циљеви и задаци истраживања (1 страна),
59 Материјал и методе (16 страна), Резултати (24 стране), Дискусија (12 страна),
60 Закључци (2 стране) и Списак литературе (29 страна). Насловне стране докторске

1 дисертације које обухватају назив на српском и енглеском језику, имена ментора и
2 чланова Комисије, захвалницу, кратак садржај на српском и енглеском језику и садржај,
3 дати су на 13 страна које нису нумерисане, а на крају се налазе биографија и изјаве о
4 ауторству, истовестности штампане и електронске верзије, и коришћењу. У писању
5 дисертације коришћене су 352 референце. Дисертација је документована са 18 табела
6 (4 табеле у поглављу Материјал и методе истраживања и 14 табела у поглављу
7 Резултати), 11 слика (2 слике у поглављу Преглед литературе, 7 слика у поглављу
8 Материјал и методе истраживања, и 2 слике у поглављу Резултати) и 19 графикана (у
9 поглављу Резултати).

10
11 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
12 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до**
13 **500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-**
14 **није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка**
15 **референци-навести број референци у докторској дисертацији):**
16

17 У **Уводу** је описан проблем кардиопулмоналне диофилариозе паса, почев од
18 раширености *Dirfilaria immitis*, патогенезе, клиничке слике обољења, метода које се
19 користе за постављања дијагнозе, до протокола лечења. Наводи се да раширеност овог
20 паразита у многоме зависи од климе и топографије, прелазних домаћина – вектора,
21 комараца. *Dirfilaria immitis* у организму домаћина може довести до озбиљних оштећења
22 крвних судова и последичне појаве тромбозе. Инфекција са *D. immitis* може довести до
23 појаве оксидативног стреса и оштећења ћелијских макромолекула као што су липиди,
24 протеини и ДНК. Стога, процена степена оштећења ДНК може бити значајан маркер.
25 Када је реч о клиничкој слици основни симптоми укључују кашаљ, нетолеранцију на
26 појачану физичку активност, диспнеју, кахексију, ређе хемоптизу, а у неким случајевима
27 и гастроинтестиналне и неуролошке знаке, изузетно изненадну смрт. Дијагноза
28 кардиопулмоналне диофилариозе поставља се на основу анамнестичких података,
29 клиничког прегледа, паразитолошких анализа (модификовани Нотов тест - *Knott's test* и
30 брзи имунохроматографских тестови), хематолошких и биохемијских анализа, као и
31 применом радиографских и ехокардиографских метода. Кандидат наводи и да су
32 последњих година развијене различите молекуларне методе (PCR и qPCR) које могу
33 послужити у постављању прецизне дијагнозе ове болести и наводи неколико
34 биомаркера из крви (на пример, *NT-proBNP* и *D-dimer*) који се могу користити у
35 дијагностичке и прогностичке сврхе. Након тога, кандидат описује терапијски протокол.
36 У израду ове докторске дисертације кандидат је кренуо са циљем спровођења
37 свеобухватног клиничко-паразитолошког испитивања кардиопулмоналне
38 диофилариозе применом паразитолошких и молекуларних метода детекције
39 узрочника, уз праћење ефекта терапије на промену хематолошких и биохемијских
40 параметара, концентрације биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimera*, затим параметара
41 оксидативног стреса и степена оштећења ДНК ћелија домаћина.
42

43 **Преглед литературе** је подељен у једанаест потпоглавља. У првом потпоглављу
44 кандидат наводи таксономски статус узрочника кардиопулмоналне диофилариозе
45 паса – нематоду *D. immitis* и описује основне морфолошке карактеристике адултних
46 облика. У другом потпоглављу кандидат описује развојни циклус паразита. Трећи део је
47 посвећен ендосимбиотској бактерији *Wolbachia pipientis*, где кандидат говори о значају
48 ове бактерије за правилан развој *D. immitis*. У четвртном потпоглављу кандидат наводи
49 могуће векторе овог патогена на различитим континентима. У петом потпоглављу
50 кандидат описује епизоотиолошку ситуацију у свету и наводи да се у Републици Србији
51 преваленција креће од 17–28%. У шестом делу овог поглавља кандидат детаљно
52 описује патогенезу кардиопулмоналне диофилариозе паса и наводи главне
53 патоморфолошке и патофизиолошке промене које настају током инфекције. У седмом
54 потпоглављу кандидат описује поремећај равнотеже у стварању слободних радикала и
55 ензима антиоксидативне заштите, као и утицај оксидативног стреса и оштећења ДНК
56 паса код инфекција изазваних нематодом *D. immitis* и другим паразитима. У осмом
57 потпоглављу кандидат детаљно описује клиничку слику кардиопулмоналне
58 диофилариозе паса и наводи да се обољење може јавити супклинички, али може бити
59 праћено и веома озбиљном клиничком сликом. Наведени су најчешћи симптоми:
60 клинички знаци обољења респираторног и кардиоваскуларног система, као што су

повремени кашаљ, замор и благи губитак телесне масе, тахипнеја или диспнеја, дистензија и пулсација југуларне вене, асцитес и други знакови слабости десне стране срца. Описане су и промене које се могу приметити током општег клиничког, ултразвучног и радиографског прегледа код инфицираних јединки. У овом потпоглављу је описана и класификација стадијума кардиопулмоналне диروفилариозе у складу са степеном испољене клиничке слике код оболелих паса. У деветом потпоглављу описане су различите методе које се користе у дијагностици, али и прогнози кардиопулмоналне диروفилариозе паса. Такође се наводи да протокол дијагностике кардиопулмоналне диروفилариозе код паса подразумева употребу различитих метода за испитивање присуства антигена утеруса женке или микрофиларија у крви, промена параметара биохемије, анализа црвене и беле крвне лозе, тромбоцита, као и морфолошких промена захваћених органа употребом радиолошке и ултразвучне дијагностике. У дисертацији се помиње да се у циљу детекције узрочника могу користити паразитолошке методе као што су модификовани Нотов тест, затим „брзи“ имунохроматографски тестови, уз наглашавање да се ланчана реакција полимеризације (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), конвенционална и квантитативна, препоручују као тестови специфични за диференцијалну дијагностику различитих врста из рода *Dirofilaria*. Такође, у овом потпоглављу кандидат описује и биомаркере из крви *NT-proBNP* и *D-dimer*. Наводи се њихов значај у постављању дијагнозе, али и прогнозе различитих кардиоваскуларних обољења, како у хуманој, тако и у ветеринарској медицини. У десетом потпоглављу говори се о терапијским протоколима и лековима који се користе у лечењу кардиопулмоналне диروفилариозе паса, али и о механизмима дејства лекова примењиваних у оквиру „*slow kill*“ протокола. Једнаесто потпоглавље је посвећено мерама профилаксе кардиопулмоналне диروفилариозе код паса.

У **Циљевима и задацима истраживања**, кандидат наводи да су циљеви истраживања ове докторске дисертације били: (1) испитивање присуства *D. immitis* код паса познатих власника, применом молекуларних и паразитолошких метода, (2) праћење клиничке слике кроз анализу нивоа параметара оксидативног стреса, степена оштећења ДНК, хематолошких и биохемијских параметара и концентрације биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimera* и (3) процена утицаја паразита на домаћина и ефикасности примењене терапије код паса природно инфицираних нематодом *D. immitis*, пре, током и након примене терапијског протокола.

До постављеног циља дошло се реализацијом следећих задатака: (1) Формирање репрезентативног узорка паса (34 јединке) код којих је методама модификованог Нотовог теста, применом брзих серолошких тестова и PCR методе, потврђено присуство *D. immitis*; (2) 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-dimera* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина **пре почетка терапије**; (3) 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-dimera* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина **у току примене терапије (трећег месеца од почетка терапије)**; (4) 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-dimera* и испитивање параметара оксидативног стреса и степена оштећења ДНК инфицираног домаћина **на крају примене терапије (шест месеци од почетка терапије)**; (5) статистичка обрада, анализа и презентација добијених резултата.

Материјал и методе. Кроз целокупно поглавље кандидат је примењене методе описао са свим неопходним детаљима и уз навођење релевантних референци. У истраживање су била укључена 34 природно инфицирана пса и то 19 мужјака и 15 женки, позитивни на „брзом“ имунохроматографском тесту који доказује присуство антигена утеруса женке *D. immitis* и без знакова других системских болести и поремећаја, осим оних који су последица инфекције са *D. immitis*. Сви пси укључени у истраживање клинички су прегледани и подвргнути терапији која је укључивала доксициклин у дози од 10 mg/kg

1 два пута дневно током 30 дана и ивермектин у дози од 6-12 µg/kg сваке две недеље
2 током шест месеци. Клинички преглед и спровођење терапије паса вршено је од стране
3 надлежног лиценцираног ветеринара у оквиру амбуланти, уз поштовање свих
4 стандарда добре ветеринарске праксе и начела добробити и заштите животиња. На
5 основу клиничког прегледа, пси су класификовани према тежини испољене клиничке
6 слике и подељени у три групе (Г₁ - асимптоматски пси, Г₂ – пси са испољеном средњом
7 клиничком сликом и Г₃ – пси са тешком клиничком сликом) према Америчком удружењу
8 за борбу против срчаног црва.

9 Крв је од паса узоркована у стерилне епрувете са антикоагулансом, за анализу
10 хематолошких параметра, извођење модификованог Нотовог теста,
11 имунохроматографског теста, молекуларних анализа и комет тест, као и у епрувете за
12 брзо издвајање серума, за одређивање биохемијских параметара и *NT-proBNP*
13 биомаркера. За одређивање параметара оксидативног стреса и *D-dimera* крв је
14 узоркована у епрувете са литијум-хепарином.

15 Присуство ларвених облика *D. immitis* (микрофиларија) у крви паса доказивано је
16 применом методе модификованог Нотовог теста, а присуство антигена утеруса женке
17 *D. immitis* доказивано је помоћу „брзог“ имунохроматографског теста (Anigen Rapid
18 Heartworm Ag 2.0 Test Kit, Bionote Inc, Јужна Кореја). Изолација ДНК из крви вршена је
19 помоћу комерцијалног сета „Кара express extract kit“ (Sigma-Aldrich, САД) по
20 протоколима произвођача. За испитивање присуства врсте *D. immitis* изведене су PCR
21 реакције са прајмерима: ROR91 F: 5'-GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC-3' и ROR92
22 R: 5'-CAA AGG CGT ATT TAC CGC CAC-3', који су дизајнирани да амплификују
23 специфични фрагмент 16S rRNA гена величине око 440 парова база. Све реакције
24 ланчане полимеризације су изведене у PCR апарату *Gradient PCR-T100TM Thermal*
25 *Cycler* (Bio-Rad, Hercules, САД). Продукти PCR амплификације су раздвојени
26 електрофорезом на агарозном гелу. За квантификацију ДНК *D. immitis* коришћен је
27 комерцијални сет *FastGene IC Green qPCR Master Mix Universal* (NIPPON Genetics
28 EUROPE GmbH) уз употребу пара прајмера специфичног за фрагмент *cox1* гена *D.*
29 *immitis* величине 203 пара база и то *S0582 F: 5` AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA*
30 *3`* и *S0583 R: 5` ACA GGC ACT GAC AAT ACC AAT 3`*. За нормализацију добијених
31 вредности за ДНК *D. immitis* као ендогена контрола коришћене су вредности добијене за
32 ген β актин (*housekeeping gene*) код паса, употребом специфичних прајмера који
33 амплификују секвенцу величине 276 парова база (*S0588 Actin F2: 5` ACC ACT GGT ATT*
34 *GTC ATG GAC TCT G 3`* и *S0589 Actin R2: 5` GCT CTT CTC CAG GGA GGA CGA 3`*). Све
35 qPCR амплификације изведене су на апарату *Rotor-Gene Q 5plex* (Qiagen, Valencia, CA,
36 САД).

37 Основне хематолошке анализе рађене су на аутоматском хематолошком анализатору
38 *Phoenix NCC-30 VET* (NeoMedica bioscience technology, Ниш, Србија), док су
39 биохемијски параметри одређивани на аутоматском биохемијском анализатору *A15 –*
40 *Random access automatic analyzer* (Biosystems reagents and instruments inc., Шпанија).
41 Одређивање концентрације *NT-proBNP* и *D-dimer* изведено је на флуоресцентном
42 имуноесеј анализатору (*Vcheck V200*, Bionote, Јужна Кореја) коришћењем уређаја за
43 тестирање *Vcheck canine NT-proBNP* (*Vcheck canine NT-proBNP*, Bionote, Јужна Кореја)
44 и *Vcheck canine D-dimer* (*Vcheck canine D-dimer*, Bionote, Јужна Кореја) према упутству
45 произвођача.

46 Активност ензима супероксид дисмутаза (SOD) у плазми одређивана је
47 спектрофотометријски, коришћењем адреналина као супстрата, на апарату *UV/VIS*
48 *Spectrophotometer BK-S390* (BIOBASE, Кина). Метода се базира на способности SOD да
49 у алкалној средини (pH 10,2) спречи аутооксидацију адреналина у адренохром.
50 Активност каталазе је одређивана применом UV-кинетичке методе, уз присуство
51 водоник пероксида, на спектрофотометру (*UV/VIS Spectrophotometer BK-S390*,
52 BIOBASE, Кина). Разлагање H₂O₂ је процењивано праћењем смањења апсорбације на
53 таласној дужини 240 nm. Активност је изражена у јединици U/ml плазме. Активност
54 ензима глутатион С-трансферазе (GST) је одређена спектрофотометријски праћењем
55 времена стварања комплекса глутатиона и 1-хлоро-2,4-динитробензена на таласној
56 дужини 340 nm на апарату *UV/VIS Spectrophotometer BK-S390* (BIOBASE, Кина).
57 Концентрација малондиалдехида (MDA) је одређивана спектрофотометријски (*UV/VIS*
58 *Spectrophotometer BK-S390*, BIOBASE, Кина), у реакцији са тиобарбитурном киселином.
59 За откривање оштећења ДНК ћелија домаћина услед присуства паразита коришћен је
60 комет тест. За комет тест коришћена је пуна крв узоркована од инфицираних паса у

1 епрувете са антикоагулансом. Основни принцип комет теста је откривање оштећења
2 ДНК ћелија праћењем миграције молекула ДНК у агарозном гелу. Комете су посматране
3 употребом микроскопа *Zeiss AXIO Imager M1* (Carl Zeiss, Немачка) коришћењем
4 флуоресцентне светлости таласне дужине 510-560 nm. Од сваке јединке, односно од
5 сваког узорка је анализирано 100 насумично одабраних ћелија. За семиквантитативну
6 анализу података, вредност ДНК оштећења је срачуната формулом (тотал комет скор=
7 $0 \times A + 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D + 4 \times E$; где су • А – број ћелија без оштећења, односно мање од
8 5%; Б – са оштећењем ниског степена, 5 до 20%; Ц – са оштећењем средњег степена,
9 20 до 40%; Д – са оштећењем високог степена, 40 до 95%; Е – са тоталним оштећењем
10 ДНК, односно преко 95%) и изражена преко тотал комет скор (ТСС).

11 Процена статистичке значајности између вредности праћених параметара вршена је
12 употребом ANOVA теста и *post-hoc Dunn* теста за старост, телесну тежину, PCR, qPCR,
13 Нотов тест, *in vivo* TCS, *ex vivo* TCS и параметре оксидативног стреса (SOD, CAT, GST,
14 MDA). За хематолошке и биохемијске параметре, *NTproBNP* и *D-dimer* подаци су
15 поређени између група током времена користећи *Kruskal-Wallis* тест, праћен *Dunn*
16 тестом, а унутар групе током времена користећи *Friedman* тест, праћен *Dunn* тестом.
17 Значајна разлика је пронађена на нивоима значајности $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$.
18 Статистичка анализа експерименталних резултата обављена је користећи статистички
19 софтвер *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad, San Diego, CA, САД).

20
21 **Резултати.** Анализирајући старост паса укључених у ово истраживање међу
22 експерименталним групама установљено је постојање статистички значајних разлика,
23 при чему су пси са тешком клиничком сликом (Γ_3) били значајно старији у односу на псе
24 са испољеном средњом клиничком сликом односно групу Γ_2 ($p < 0,05$), као и у односу на
25 групу Γ_1 коју су чинили пси без испољених симптома болести ($p < 0,001$). Када се
26 упореде пси са средњом клиничком сликом (Γ_2) и асимптоматски пси (Γ_1) може се
27 видети да су пси са средњом клиничком сликом били значајно старији у односу на
28 асимптоматске псе ($p < 0,001$). Просечна телесна маса паса укључених у истраживање
29 није се статистички значајно разликовала ($p > 0,05$), нити између периода терапије у
30 појединачним групама, нити међу групама у различитим периодима терапије.

31 Резултати модификованог Нотовог теста у овој студији показали су да је 73,5% (25/34)
32 природно инфицираних паса (код којих је доказано присуство антигена) имало присутне
33 микрофиларије у циркулацији на презентацији (D_0), са просечним бројем од $6285,29 \pm$
34 $4637,81$ микрофиларија по милилитру крви. Деведесетог дана (D_{90}), 35,29% (12/34) паса
35 је остало позитивно у Нотовом тесту, са просечним бројем од $518,82 \pm 879,46$
36 микрофиларија по милилитру крви. На крају терапије (D_{180}) код свих паса (0%) Нотов
37 тест је био негативан и нису утврђене микрофиларије у циркулацији. Посматрано по
38 групама, број позитивних паса на присуство циркулишућих микрофиларија пре терапије
39 (D_0) био је 9/11, 13/14, 9/9, а на средини (D_{90}) 4/11, 5/14, 2/9 у групама Γ_1 , Γ_2 , и Γ_3 , док су
40 након терапије (D_{180}) сви пси били негативни. Код паса у групи Γ_1 , значајно већи број
41 животиња позитивних на присуство микрофиларија уочен је пре терапије (D_0) у
42 поређењу са D_{180} ($p < 0,05$), док значајних разлика није било у поређењу са D_{90} ($p >$
43 $0,05$), као и када се упореде D_{90} и D_{180} ($p > 0,05$). У групи Γ_2 , био је присутан значајно
44 већи број позитивних паса пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$), као и
45 деведесетог дана терапије (D_{90}) у поређењу са D_{180} ($p < 0,01$). У овој групи, значајних
46 разлика у броју паса позитивних на присуство микрофиларија није било између D_0 и D_{90}
47 ($p > 0,05$). Код паса у групи Γ_3 значајно већи број паса позитивних на присуство
48 микрофиларија установљен је пре терапије (D_0) у односу на средину терапије – D_{90} ($p <$
49 $0,01$), као у периоду D_0 у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи број паса позитивних на
50 присуство микрофиларија испитиван 90. дана (D_{90}) и 180. дана терапије (D_{180}) није се
51 значајно разликовао ($p > 0,05$). Значајно већи просечан број микрофиларија у
52 милилитру имали су пси у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1 пре терапије (D_0). У истом
53 периоду терапије нису уочене значајне разлике у просечном броју микрофиларија
54 између паса из група Γ_1 и Γ_2 , као и између паса из група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$). Значајних
55 разлика у просечном броју микрофиларија међу групама није било ни на средини (D_{90}),
56 ни на крају терапије – D_{180} ($p > 0,05$). У свим групама (Γ_1 , Γ_2 и Γ_3) значајно већи број
57 микрофиларија уочен је пре терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,001$), као и у односу на
58 D_{180} ($p < 0,001$), док значајних разлика у броју микрофиларија није било између D_{90} и D_{180}
59 ($p > 0,05$).

1 Резултати *end point* PCR анализе у овој студији су показали да је 92% (31/34) природно
2 инфицираних паса било позитивно на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis* на
3 презентацији (Д₀), док је 90. дана терапије (Д₉₀) 32,35% (11/34) паса остало позитивно.
4 На крају терапијског циклуса (Д₁₈₀) сви пси укључени у ово истраживање били су
5 негативни на циркулишућу ДНК микрофиларија *D. immitis*. По групама Г₁, Г₂ и Г₃, пре
6 терапије (Д₀) позитивно је било 81,82% (9/11), 92,86% (13/14) и 100% (9/9), док је
7 деведесетог дана терапије (Д₉₀), 36,36% (4/11), 35,71% (5/14) и 22,22% (2/9) било
8 позитивно, редом. На крају терапије (Д₁₈₀), у свакој групи сви пси су били негативни на
9 присуство циркулишуће ДНК микрофиларија *D. immitis*.

10 У групи Г₁, значајно већи број позитивних узорака на циркулишућу ДНК микрофиларија
11 *D. immitis* био је у узорцима пре терапије (Д₀) у односу на Д₁₈₀ ($p < 0,001$), док није било
12 разлика између Д₀ и Д₉₀ ($p > 0,05$), као ни између Д₉₀ и Д₁₈₀ ($p > 0,05$). У групи Г₂, значајно
13 већи број позитивних паса је откривен у Д₀ у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,01$), као и са Д₁₈₀ ($p <$
14 $0,001$), али и у узорцима узетим Д₉₀ у поређењу са Д₁₈₀ ($p < 0,05$). У групи Г₃ утврђен је
15 значајно већи број PCR позитивних паса у Д₀ у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,01$) и Д₁₈₀ ($p <$
16 $0,001$), али разлика није било између узорака добијених на средини (Д₉₀) и на крају
17 терапије – Д₁₈₀ ($p > 0,05$). Поређењем резултата присуства ДНК микрофиларија *D.*
18 *immitis* у крви паса, међу експерименталним групама у истом периоду лечења нису
19 пронађене значајне разлике ни у једном од периода ($p > 0,05$). Методом qPCR
20 испитивани су узорци крви свих паса укључених у ово истраживање. Налаз је био
21 позитиван код 31/34 (92%) паса на презентацији (Д₀). Сви пси са позитивним налазом
22 конвенционалног PCR теста (n=31) били су позитивни. Након 90. дана терапије (Д₉₀),
23 код 11 паса је квантификована ДНК микрофиларија *D. immitis*. На крају терапије (Д₁₈₀)
24 сви пси укључени у ово истраживање били су негативни на присуство ДНК
25 микрофиларија *D. immitis*. Пси у групи Г₁ имали су значајно већу количину циркулишуће
26 ДНК микрофиларија *D. immitis* у узорцима пре терапије (Д₀) у односу на Д₉₀ ($p < 0,05$),
27 као и у односу на Д₁₈₀ ($p < 0,05$). У групи Г₂, значајно већа количина ДНК микрофиларија
28 *D. immitis* је откривена у Д₀ у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,01$), као и у поређењу са Д₁₈₀ ($p <$
29 $0,01$). Код паса у групи Г₃ утврђена је значајно већа количина ДНК микрофиларија *D.*
30 *immitis* у Д₀ у поређењу са Д₉₀ ($p < 0,001$), као и у поређењу са Д₁₈₀ ($p < 0,001$). У свим
31 групама, када се упореде резултати добијени Д₉₀ и Д₁₈₀ нису уочене значајне разлике у
32 количини амплификоване ДНК микрофиларија ($p > 0,05$). На крају, поређењем
33 резултата количине ДНК микрофиларија *D. immitis* у крви паса међу експерименталним
34 групама у истом периоду лечења нису пронађене значајне разлике ни у једном од
35 периода ($p > 0,05$).

36 Анализа резултата основних параметара црвене крвне лозе код паса укључених у
37 истраживање није показала значајне разлике међу групама ни у једном од момената
38 узорковања (Д₀, Д₉₀, Д₁₈₀), када су у питању број еритроцита, хематокрит, просечан
39 садржај хемоглобина (MCH) и просечна концентрација хемоглобина у еритроцитима –
40 MCHC ($p > 0,05$). Осим тога, у Д₀ периоду нису установљене значајне разлике међу
41 групама ($p > 0,05$) ни за концентрацију хемоглобина, као ни за MCV. Међутим, значајно
42 нижу концентрацију хемоглобина на средини терапије (Д₉₀) имали су пси у групи Г₃ у
43 односу на псе у групи Г₁ ($p < 0,05$), док између паса у групама Г₁ и Г₂, као и између паса у
44 групама Г₂ и Г₃ није било значајних разлика у концентрацији овог параметра ($p > 0,05$).
45 Значајно нижа запремина еритроцита (MCV) уочена је, такође, на средини терапије
46 (Д₉₀) у групи Г₂ у односу на псе у групи Г₃ ($p < 0,05$), док између паса у групама Г₁ и Г₂,
47 као и између паса у групама Г₁ и Г₃ није било значајних разлика у концентрацији овог
48 параметра ($p > 0,05$). На крају терапије (Д₁₈₀) значајних разлика међу групама није било
49 ни у једном од испитиваних параметара црвене крвне лозе ($p > 0,05$). Унутар сваке
50 групе (Г₁, Г₂ и Г₃), није било значајних разлика између испитиваних периода терапије за
51 број еритроцита, хемоглобин и MCHC ($p > 0,05$). Хематокрит се такође није разликовао
52 између испитиваних периода терапије код паса у групи Г₂, међутим пси у групама Г₁ и Г₃
53 имали су значајно веће вредности хематокрита у Д₁₈₀ у односу на Д₀ ($p < 0,05$). Што се
54 тиче просечне запремине еритроцита (Mean Corpuscular Volume – MCV) значајне
55 разлике између испитиваних периода терапије уочене су само код паса у групи Г₃, код
56 којих су већу запремину еритроцити имали 90. дана терапије у односу на моменат пре
57 почетка терапије – Д₀ ($p < 0,05$). Значајан пораст просечног садржаја хемоглобина
58 (Mean Corpuscular Hemoglobin – MCH) уочен је у Д₉₀ моменту (90. дана терапије) у
59 односу на Д₀ ($p < 0,05$) код паса у групи Г₁.

1 Анализом резултата основних параметара беле крвне лозе нису уочене значајне
2 разлике међу групама за број лимфоцита, број *MID* ћелија и број тромбоцита ($p > 0,05$).
3 Осим тога, значајних разлика међу групама није било ни за број леукоцита пре терапије
4 – D_0 ($p > 0,05$). Међутим, значајно већи број леукоцита уочен је 90. дана терапије (D_{90})
5 код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$), као и у односу на групу Γ_2 ($p <$
6 $0,05$). На крају терапије (D_{180}), значајно већи број леукоцита уочен је код паса у групи Γ_3
7 у односу на псе са средњом клиничком сликом – Γ_2 ($p < 0,05$). Број гранулоцита пре
8 терапије (D_0) није се значајно разликовао међу групама ($p > 0,05$). На средини терапије
9 (D_{90}) значајно већи број гранулоцита уочен је код паса у групи Γ_3 у односу на псе у
10 групама Γ_1 и Γ_2 ($p < 0,05$). На крају терапије број гранулоцита се није разликовао међу
11 групама ($p > 0,05$). Када су упоређени резултати добијени унутар сваке групе, нису
12 уочене значајне разлике између испитиваних периода терапије за број леукоцита,
13 гранулоцита и лимфоцита ($p > 0,05$). Број *MID* ћелија се, такође, није разликовао између
14 испитиваних периода терапије код паса у групи Γ_1 и групи Γ_3 . Међутим, пси у групи Γ_2
15 имали су значајно већи број *MID* ћелија у D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$). Што се тиче
16 броја тромбоцита, није било разлика између испитиваних периода терапије у свакој
17 групи ($p > 0,05$).

18 Резултати основних биохемијских параметара су показали да нема значајних разлика
19 међу групама у концентрацији креатинина, укупних протеина, триглицерида, у
20 активности аспартат аминотрансферазе (*AST*), аланин аминотрансферазе (*ALT*), гама-
21 глутамил трансферазе (*GGT*) и креатинин киназе – *CK* ($p > 0,05$). Значајних разлика међу
22 групама није било ни у концентрацији уреје пре терапије ($p > 0,05$). Међутим, значајно
23 већа концентрација уреје уочена је 90. дана терапије (D_{90}) код паса у групи Γ_3 у односу
24 на псе у групи Γ_2 ($p < 0,05$), док на крају терапије није било значајних разлика у
25 концентрацији овог параметра међу свим групама ($p > 0,05$). Концентрација албумина
26 пре терапије (D_0) није се значајно разликовала међу групама ($p > 0,05$), међутим 90.
27 дана терапије уочена је значајно већа концентрација код паса у групи Γ_1 у односу на псе
28 у групи Γ_3 ($p < 0,05$). На крају терапије (D_{180}) значајно већа концентрација албумина
29 уочена је код паса у групи Γ_2 у односу на псе у групи Γ_3 ($p < 0,05$). Значајних разлика пре
30 терапије међу групама није било у концентрацији холестерола ($p > 0,05$). Међутим,
31 значајно већа концентрација холестерола уочена је 90. дана терапије код паса са
32 тешком клиничком сликом (Γ_3) у односу на псе са средњом клиничком сликом – Γ_2 ($p <$
33 $0,05$), као и у односу на асимптоматске псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$), док на крају терапије
34 (D_{180}) није било значајних разлика у концентрацији овог параметра међу групама ($p >$
35 $0,05$). Значајних разлика пре терапије међу групама није било ни у активности алкалне
36 фосфатазе ($p > 0,05$). Међутим, значајно већа активност алкалне фосфатазе уочена је
37 90. дана терапије (D_{90}) код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групама Γ_1 и Γ_2 ($p < 0,05$),
38 док на крају терапије (D_{180}) није било значајних разлика у концентрацији овог параметра
39 међу групама ($p > 0,05$). Пре терапије (D_0) значајно већу активност лактат
40 дехидрогеназе имали су пси из групе Γ_2 у односу на псе у групи Γ_1 ($p < 0,05$). У осталим
41 периодима терапије није било значајних разлика у активности лактат дехидрогеназе
42 међу групама ($p > 0,05$). Када су упоређени резултати добијени унутар сваке групе, није
43 било значајних разлика између испитиваних периода терапије за концентрацију уреје,
44 креатинина, триглицерида, затим активности *ALP*, *GGT*, *LDH* и *CK* ($p > 0,05$).
45 Концентрација укупних протеина се такође није разликовала између испитиваних
46 периода терапије код паса у групи Γ_2 и групи Γ_3 ($p > 0,05$), али су пси у групи Γ_1 имали
47 значајно већу концентрацију укупних протеина у D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$).
48 Концентрација албумина није се разликовала између испитиваних периода терапије код
49 паса у групи Γ_2 и групи Γ_3 ($p > 0,05$). Међутим, пси у групи Γ_1 имали су значајно већу
50 концентрацију албумина у моменту D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,05$). Што се тиче
51 холестерола, концентрација се није разликовала између свих испитиваних периода
52 терапије код паса у групи Γ_1 и групи Γ_2 . Међутим, код паса у групи Γ_3 уочено је значајно
53 смањење концентрације холестерола на крају терапије (D_{180}) у односу на концентрацију
54 измерену на средини терапије – D_{90} ($p < 0,05$). Код паса у групи Γ_1 уочен је значајан пад
55 у активности *AST* на средини терапије (D_{90}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p <$
56 $0,05$), као и на крају терапије (D_{180}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p < 0,05$). Код
57 паса у групама Γ_2 и Γ_3 није било значајних разлика у активности овог ензима између
58 свих испитиваних периода терапије ($p > 0,05$). Код паса у групи Γ_3 уочен је значајан пад
59 у активности *AST* на крају терапије (D_{180}) у односу на период пре терапије – D_0 ($p < 0,05$).

1 Код паса у групама Г₁ и Г₂ није било значајних разлика у активности овог ензима између
2 свих испитиваних периода терапије ($p > 0,05$).

3 Концентрације *NT-proBNP*, пре терапије (Д₀) у крви паса из Г₁ и Г₂ група, кретале су се у
4 оквирима утврђених референтних вредности за здраве псе ($< 900,00$ pmol/l, и то: 500,00
5 pmol/l (500,00–692,60) у групи Г₁, док је у групи Г₂ концентрација била 736,70 pmol/l
6 (500,00–1038,38). Насупрот, пси у групи Г₃ су пре терапије имали концентрације *NT-*
7 *proBNP* више од горње границе референтног опсега и то 1354,20 pmol/l (500,00–
8 2641,70). Деведесетог дана терапије (Д₉₀) установљено је повећање концентрације *NT-*
9 *proBNP* у свим групама, али се у групи Г₁ концентрација кретала у оквирима
10 референтног опсега и износила је 622,90 pmol/l (500,00–1019,60). Пси у групи Г₂
11 достигли су патолошке нивое *NT-proBNP* са концентрацијом од 1132,05 pmol/l (832,48–
12 1514,98), док су се код паса у групи Г₃ патолошке концентрације *NT-proBNP* задржале
13 1027,40 pmol/l (673,20–1688,90), али су биле нешто ниже него пре третмана (Д₀). На
14 крају терапије (Д₁₈₀) све групе достигле су патолошке нивое концентрација *NT-proBNP*
15 тако да је код паса у Г₁ концентрација била 966,90 pmol/l (500,00–1190,40), код паса у Г₂
16 1807,00 pmol/l (802,53–2497,03), док је код паса у Г₃ установљена концентрација од
17 2241,30 pmol/l (1346,40–2716,85). Пси у групи Г₁ имали су значајно већу ($p < 0,05$)
18 концентрацију *NT-proBNP* на крају терапије (Д₁₈₀) у поређењу са Д₀, док поређењем
19 резултата између Д₀ и Д₉₀ ($p > 0,05$), као и Д₉₀ и Д₁₈₀ нису уочене значајне разлике у
20 концентрацији овог биомаркера ($p > 0,05$). Анализом резултата концентрације *NT-*
21 *proBNP* у групи Г₂ утврђена је значајно већа концентрација у Д₁₈₀ у односу на Д₀ ($p <$
22 $0,01$), али без значајних разлика између Д₀ и Д₉₀ ($p > 0,05$), као ни између Д₉₀ и Д₁₈₀ ($p >$
23 $0,05$). У групи Г₃ концентрација *NT-proBNP* била је значајно већа 180. дана у односу на
24 90. дан терапије, али без значајности између Д₀ и Д₉₀ ($p > 0,05$), као ни између Д₀ и Д₁₈₀
25 ($p > 0,05$). На презентацији (Д₀), установљена је значајно већа концентрација *NT-*
26 *proBNP* код паса у групи Г₃ у поређењу са псима из групе Г₁ ($p < 0,05$), али без значајних
27 разлика између паса из групе Г₁ и паса из групе Г₂ ($p > 0,05$), као ни између паса из
28 група Г₂ и Г₃ ($p > 0,05$). На средини терапије (Д₉₀) није уочена значајна разлика између
29 експерименталних група ($p > 0,05$), док су на крају терапије (Д₁₈₀), уочене значајно веће
30 концентрације *NT-proBNP* у групи Г₃ у поређењу са групом Г₁ ($p < 0,01$), као и у групи Г₂
31 у поређењу са групом Г₁ ($p < 0,05$), али без значајности између групе Г₂ и групе Г₃ ($p >$
32 $0,05$).

33 Концентрације *D-dimera* пре третмана (Д₀) у крви паса биле су у оквиру утврђених
34 референтних вредности ($< 0,2$ µg/ml) за све три експерименталне групе (Г₁, Г₂ и Г₃) и то:
35 0,10 µg/ml (0,10–0,10); 0,20 µg/ml (0,10–0,40) и 0,20 µg/ml (0,1–0,65), редом. Неки пси у
36 групама Г₁, Г₂ и Г₃ су имали патолошке вредности, јер су максималне концентрације
37 измерене у овим групама биле 0,30; 0,90 и 1,10 µg/ml, редом. Деветесетог дана
38 терапије (Д₉₀) концентрација *D-dimera* се повећала у свакој групи, а само у групи Г₁ је
39 остала у оквирима референтног опсега за здраве псе и износила је 0,20 µg/ml (0,10–
40 0,40). Пси у групама Г₂ и Г₃ достигли су патолошке нивое *D-dimera* у овом периоду
41 терапије са концентрацијама од 0,65 µg/ml (0,18–0,95) и 0,90 µg/ml (0,60–1,60), редом.
42 На крају третмана (Д₁₈₀), у свим експерименталним групама концентрација *D-dimera* се
43 смањила, али је код паса у групама Г₂ и Г₃ остала изнад горње границе референтног
44 опсега и износила је 0,40 µg/ml (0,10–0,53) и 0,40 µg/ml (0,35–0,85). У групи Г₁
45 концентрација *D-dimera* се смањила у оквиру референтних вредности за здраве псе на
46 0,1 µg/ml (0,10–0,10). Код паса из групе Г₁ нису установљене значајне разлике између
47 испитиваних периода терапије ($p > 0,05$), док су код паса у групи Г₂, утврђене значајно
48 веће концентрације *D-dimera* 90. дана терапије (Д₉₀) у односу на Д₀ ($p < 0,05$), без
49 значајних разлика између Д₀ и Д₁₈₀ ($p > 0,05$), као и између Д₉₀ и Д₁₈₀ ($p > 0,05$). У групи
50 Г₃ концентрације *D-dimera* су поново биле значајно веће у Д₉₀ у односу на Д₀ ($p < 0,05$),
51 али без значајности између Д₀ и Д₁₈₀ ($p > 0,05$), као и између Д₉₀ и Д₁₈₀ ($p > 0,05$). На
52 презентацији (Д₀) у различитим групама, *Kruskal-Wallis* тест није показао значајне
53 разлике између резултата испитиваних група ($p > 0,05$). На средини третмана, уочена је
54 значајно већа концентрација у групи Г₃ у поређењу са групом Г₁ ($p < 0,05$), али без
55 значајности између групе Г₁ у односу на групу Г₂ ($p > 0,05$), као и између групе Г₂ у
56 односу на Г₃ ($p > 0,05$). На крају третмана (Д₁₈₀) уочене су значајно веће концентрације
57 *D-dimera* у групи Г₃ у поређењу са групом Г₁ ($p < 0,001$), као и у групи Г₂ у односу на
58 групу Г₁ ($p < 0,05$), али без значајности између група Г₂ и Г₃ ($p > 0,05$).

59 Активност супероксид дисмутазе (*SOD*) код паса из групе Г₁ имала је значајан пораст
60 током времена, имајући у виду значајно већу активност *SOD* у овој групи паса на крају

1 терапије (D_{180}) у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и у односу на D_{90} ($p < 0,001$). У овој групи
2 паса уочена је и значајно виша активност овог ензима на средини терапије D_{90} у односу
3 на D_0 ($p < 0,001$). Активност *SOD* код паса у групи Γ_2 , била је значајно већа 90. дана
4 терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и 180. дана терапије у односу на D_0 ($p <$
5 $0,001$). Између D_{90} и D_{180} није било значајних разлика у активности *SOD* ($p > 0,05$). У
6 групи Γ_3 активност *SOD* поново је била значајно већа на средини терапије (D_{90}) у односу
7 на D_0 ($p < 0,001$), као и на крају терапије (D_{180}) у односу на D_0 ($p < 0,001$). У овој групи
8 паса уочена је значајно виша активност овог ензима на крају терапије (D_{180}) у односу на
9 D_{90} ($p < 0,01$). Поређењем активности супероксид дисмутазе (*SOD*) на презентацији (D_0)
10 у различитим групама, добијени резултати нису показали значајне разлике међу
11 испитиваним групама ($p > 0,05$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}),
12 уочена је значајно већа концентрација у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), али
13 без значајности између групе Γ_1 и групе Γ_2 ($p > 0,05$), као ни између групе Γ_2 и групе Γ_3 (p
14 $> 0,05$). На крају третмана (D_{180}) уочена је значајно већа активност супероксид
15 дисмутазе у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,01$), као и са групом Γ_3 ($p < 0,001$),
16 али без значајности између група Γ_2 и Γ_3 ($p > 0,05$).

17 Каталаза (*CAT*) код паса из групе Γ_1 имала је значајан пораст активности током
18 времена. Значајно већа активност *CAT* у овој групи паса уочена је на крају терапије
19 (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
20 уочене значајне разлике у активности овог ензима између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$). У групи Γ_2 ,
21 значајно већа активност каталазе уочена је 90. дана терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p <$
22 $0,01$), као и 180. дана терапије у односу на D_0 ($p < 0,001$). Значајно већа активност *CAT*
23 била је и у D_{180} у односу на D_{90} ($p < 0,05$). У групи Γ_3 активност *CAT* поново је била
24 значајно већа на средини терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и на крају терапије
25 (D_{180}) у односу на D_0 ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је значајно виша активност овог
26 ензима на крају терапије (D_{180}) у односу на D_{90} ($p < 0,05$). На презентацији (D_0) у
27 различитим групама, добијени резултати показали су значајно већу активност у групи Γ_1
28 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p < 0,001$).
29 Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је значајно већа активност у
30 групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), као и у групи Γ_2 у односу на групу Γ_3 ($p <$
31 $0,05$). Значајне разлике у активности овог ензима нису установљене међу групама Γ_1 и
32 Γ_2 ($p > 0,05$). На крају третмана (D_{180}) уочена је значајно већа активност каталазе у групи
33 Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,01$), али без значајних разлика између групе Γ_1 и групе
34 Γ_2 ($p > 0,05$), као ни између групе Γ_2 и групе Γ_3 ($p > 0,05$).

35 Активност глутатион С-трансферазе (*GST*) код паса из групе Γ_1 , била је у значајном
36 порасту током времена. Значајно већа активност *GST* у овој групи паса уочена је на
37 крају терапије (D_{180}) у односу на D_0 ($p < 0,001$), као и у односу на D_{90} ($p < 0,001$). У овој
38 групи паса нису уочене значајне разлике у активности овог ензима између D_0 и D_{90} ($p <$
39 $0,05$). Анализирајући резултате активности *GST* код паса у групи Γ_2 , утврђене су
40 значајно веће концентрације 90. дана терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p < 0,05$), као и 180.
41 дана терапије у односу на D_0 ($p < 0,001$). Значајно већа активност *GST* била је и у D_{180} у
42 односу на D_{90} ($p < 0,001$). У групи Γ_3 активност *GST* поново је била значајно већа на
43 средини терапије (D_{90}) у односу на D_0 ($p < 0,01$), као и на крају терапије (D_{180}) у односу
44 на D_0 ($p < 0,001$). У овој групи паса уочена је значајно виша активност овог ензима на
45 крају терапије (D_{180}) у односу на D_{90} ($p < 0,01$). Поређењем активности *GST* на
46 презентацији (D_0) у различитим групама, добијени резултати показали су значајно већу
47 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
48 ($p < 0,001$). Такође, значајно већу активност *GST* имали су и пси у групи Γ_1 у односу на
49 псе у групи Γ_2 ($p < 0,01$). Анализирајући резултате на средини терапије (D_{90}), уочена је
50 значајно већа концентрација у групи Γ_1 у поређењу са групом Γ_3 ($p < 0,001$), као и у групи
51 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
52 крају третмана (D_{180}) уочена је значајно већа активност *GST* у групи Γ_1 у поређењу са
53 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
54 Γ_3 ($p > 0,001$).

55 За разлику од ензима антиоксидативне заштите, резултати концентрације малон
56 диалдехида (*MDA*) код паса из групе Γ_1 показују значајно смањење концентрације овог
57 маркера током времена. Значајно већу концентрацију *MDA* пси у овој групи имали су
58 пре терапије (D_0) у односу на D_{180} ($p < 0,001$), као и на средини терапије D_{90} у односу на
59 D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера
60 између D_0 и D_{90} ($p > 0,05$). У групи Γ_2 , утврђене су значајно веће концентрације пре

1 терапије (D_0) у односу на D_{90} ($p < 0,01$), као и 180. дана терапије у односу на D_0 ($p <$
2 $0,001$). Значајно већа концентрација *MDA* била је и у D_{90} у односу на D_{180} ($p < 0,001$). У
3 групи Γ_3 концентрација *MDA* поново је била значајно већа пре терапије (D_0) у односу на
4 D_{180} ($p < 0,001$), као и на средини терапије (D_{90}) у односу D_{180} ($p < 0,001$). У овој групи
5 паса нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера између D_0 и D_{90} ($p >$
6 $0,05$). На презентацији (D_0), значајно већа концентрација *MDA* је установљена у групи Γ_3
7 у односу на групу Γ_1 ($p < 0,001$), као и у односу на групу Γ_2 ($p < 0,01$). Значајних разлика
8 у концентрацији *MDA* између паса у групи Γ_1 и групи Γ_2 није било ($p > 0,05$). На средини
9 терапије (D_{90}), уочена је значајно већа концентрација у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_1
10 ($p < 0,001$), као и у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,001$), али међу псима у групи Γ_1 и групи
11 Γ_2 нису уочене значајне разлике у концентрацији овог маркера ($p > 0,05$). На крају
12 третмана (D_{180}) уочен је исти тренд статистичких значајности као и на средини терапије
13 те је већа концентрација уочена код паса у групи Γ_3 у односу на псе у групи Γ_1 ($p <$
14 $0,001$), као и у односу на псе у групи Γ_2 ($p < 0,001$), док између паса из групе Γ_1 и групе
15 Γ_2 значајних разлика у концентрацији *MDA* није било ($p > 0,05$).

16 Анализом резултата добијених у *in vivo* комет тесту уочено је временски зависно
17 смањење степена оштећења ДНК паса инфицираних нематодом *D. immitis*. Код паса у
18 групи Γ_1 , значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима био је пре терапије (D_0) у
19 поређењу са D_{180} ($p < 0,001$). У групи Γ_2 , као и у групи Γ_3 , значајно веће оштећење ДНК
20 утврђено је у D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,001$), као и у поређењу са D_{180} ($p < 0,001$). У
21 овим групама значајно већи степен оштећења уочен је 90. дана (D_{90}) у односу на D_{180} ,
22 односно 180. дан терапије ($p < 0,05$). На презентацији (D_0), значајно веће оштећење
23 ДНК установљено је у групи Γ_3 у поређењу са групом Γ_2 ($p < 0,05$), као и у групи Γ_1 ($p <$
24 $0,001$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК између паса из групе Γ_1 и групе Γ_2
25 није било ($p > 0,05$). Анализирајући резултате добијене на средини терапије (D_{90}),
26 значајно већи степен оштећења ДНК установљен је код паса у групи Γ_3 у односу на псе
27 из групе Γ_1 ($p < 0,01$), као и у односу на псе из групе Γ_2 ($p > 0,01$). Значајне разлике у
28 степену оштећења ДНК између паса из групе Γ_1 и групе Γ_2 у овом периоду терапије нису
29 установљене ($p > 0,05$). На крају терапије (D_{180}) уочен је значајно већи степен оштећења
30 ДНК код паса у групи Γ_3 у поређењу са псима из групе Γ_1 ($p < 0,05$), као и са псима из
31 групе Γ_2 ($p < 0,05$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК између паса из групе Γ_1
32 и групе Γ_2 у овом периоду терапије није било ($p > 0,05$).

33 Анализом резултата добијених и *ex vivo* комет тесту, уочено је временски зависно
34 повећање отпорности леукоцита паса инфицираних нематодом *D. immitis* на оштећења
35 изазвана познатим мутагеном водоник-пероксидом. Код паса у групи Γ_1 , уочен је
36 значајно већи степен оштећења ДНК у леукоцитима узоркованим пре терапије (D_0) у
37 поређењу са средином – D_{90} ($p < 0,001$), као и са крајем терапије – D_{180} ($p < 0,001$).
38 Значајних разлика у степену оштећења ДНК изазваних познатим мутагеном између D_{90}
39 и D_{180} није било ($p > 0,05$). Код паса у групи Γ_2 , уочен је значајно већи степен оштећења
40 ДНК у леукоцитима узоркованим пре терапије (D_0) у поређењу са D_{90} ($p < 0,001$), као и
41 са D_{180} ($p < 0,001$). Значајних разлика у степену оштећења ДНК између D_{90} и D_{180} није
42 било ($p > 0,05$). Код паса у групи Γ_3 уочен је значајно већи степен оштећења ДНК у
43 леукоцитима узоркованим у D_0 у поређењу са D_{90} ($p < 0,001$), али и са D_{180} ($p < 0,05$).
44 Значајних разлика у степену оштећења ДНК између D_{90} и D_{180} није било ($p > 0,05$).
45 Поређењем резултата степена оштећења ДНК у леукоцитима инфицираних паса
46 изазваних познатим мутагеном између експерименталних група у сваком испитиваном
47 периоду терапије, нису уочене значајне разлике ($p > 0,05$).

48 У поглављу **Дискусија**, добијени резултати који се односе на присуство праћеног
49 паразита паразитолошким и молекуларним методама, хематолошке и биохемијске
50 параметре, биомаркера *NT-proBNP* и *D-dimera*, параметре оксидативног стреса и
51 степен оштећења ДНК ћелија домаћина услед присуства паразита, су критички
52 размотрени, тумачени и поређени са резултатима других истраживача. Отворен је низ
53 питања која се односе на специфичност примењених дијагностичких метода као и
54 утицај инфекције и терапије на здравствени статус паса праћен кроз наведене
55 параметре.

56 У **Списку литературе** докторске дисертације наведене су 352 референце.

57
58
59
60

1
2 VI **ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА** (навести закључке који су приказани у докторској
3 дисертацији):
4

- 5 1. Код паса природно инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis* старост јединки је
6 статистички значајно утицала на тежину клиничке слике, док телесна маса паса није
7 имала утицај на интензитет симптома кардиопулмоналне диروفилариозе.
- 8 2. Примењени „slow kill“ протокол који подразумева продужену примену ивермектина и
9 доксициклина, показао се успешним у елиминацији микрофиларија *D. immitis* код
10 паса природно инфицираних овим паразитом.
- 11 3. Примењени конвенционални PCR и qPCR показали су се осетљивијим у детекцији
12 микрофиларија *D. immitis*, односно њихове ДНК, у односу на модификовани Нотов
13 тест, па се qPCR може предложити као метода избора за квантификацију паразита
14 што је значајно за праћење тока инфекције и ефекта примењене терапије.
- 15 4. Хематолошки параметри били су незнатно промењени код инфицираних паса, док је
16 примењена терапија довела до враћања промењених концентрација у опсеге
17 референтних интервала.
- 18 5. Активности ензима *AST*, *ALT* и *LDH* биле су више од горње границе референтног
19 интервала пре почетка терапије паса. Примењена терапија довела је до смањења
20 активности ензима *AST* и *ALT* већ на средини терапије, за разлику од *LDH* који је
21 остао повишен. Већина осталих биохемијских параметара везаних за функцију
22 поједних ткива и органа није била значајно промењена.
- 23 6. Нивои концентрације биомаркера *NT-proBNP* у серуму инфицираних паса били су
24 виши код јединки са тежом клиничком сликом кардиопулмоналне диروفилариозе.
25 Пси из свих група су на крају терапије достигли патолошке концентрације *NT-proBNP*
26 (веће од 900 pmol/l), док су пси са средњом и тешком клиничком сликом имали
27 концентрације које указују на постојање кардиоваскуларног обољења (веће од 1800
28 pmol/l).
- 29 7. Концентрација *D-dimera* пре почетка терапије код свих паса се кретала унутар
30 утврђених референтних интервала. Деведесетог дана од почетка терапије пси са
31 средњом и тешком клиничком сликом имали су повишене вредности концентрације
32 овог биомаркера, док су се након завршетка терапије (180. дана) код ових паса
33 вредности концентрације смањиле, али су и даље биле изнад референтних
34 интервала, што указује на присуство васкуларних промена.
- 35 8. Смањење концентрације малондиалдехида (*MDA*) и пораст активности
36 антиоксидативних ензима (*SOD*, *CAT* и *GST*) након завршене терапије указује на то
37 да је примењена терапија довела до смањења оксидативног стреса и повећања
38 антиоксидативне заштите код испитиваних паса.
- 39 9. Степен оштећења ДНК утврђен применом *in vivo* комет теста био је у корелацији са
40 тежином испољених клиничких симптома код паса. Оштећење ДНК се смањивало
41 током спровођења терапије као последица смањења интензитета инфекције и
42 оксидативног стреса.
- 43 10. Хронична инфламација настала као последица инфекције нематодом *D. immitis*,
44 према резултатима *ex vivo* комет теста, довела је до смањења отпорности леукоцита
45 на генотоксичне агенсе. Отпорност леукоцита на спољашње мутагене се повећала
46 након примењене терапије, односно елиминисања микрофиларија и смањења
47 оксидативног стреса.
- 48 11. Резултати добијени у *in vivo* и *ex vivo* комет тесту указују на оправданост примене
49 ових метода у праћењу утицаја инфекције нематодом *D. immitis* на организам
50 домаћина.
- 51 12. Примењени „slow kill“ протокол, који подразумева продужену примену ивермектина и
52 доксициклина показао се ефикасним у елиминацији микрофиларија *D. immitis* код
53 природно инфицираних паса, што је последично довело до смањења оксидативног

1 стреса, степена оштећења ДНК и повећања отпорности леукоцита код инфицираних
2 паса.

3
4 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** (навести
5 да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима
6 истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):
7

8 Резултати докторске дисертације кандидата Милана Рајковића под насловом:
9 „Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно
10 инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*” су у складу са постављеним циљевима и
11 задацима, а закључци су логично изведени из добијених резултата.
12

13 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:**
14

15 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
16 **теме?**
17

18 Да.

19
20 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
21 **дисертацију?**
22

23 Да.

24
25 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**
26

27 Допринос докторске дисертације кандидата Милана Рајковића под насловом:
28 „Молекуларна, паразитолошка и клиничка испитивања ефекта терапије паса природно
29 инфицираних нематодом *Dirofilaria immitis*” је у добијању нових значајних података о
30 ефектима инфекције *Dirofilaria immitis* на праћене параметре здравственог стања паса.
31 Затим у томе што је први пут тестиран „slow kill” терапијски протокол на динамику
32 кретања параметара оксидативног стреса и антиоксидативне заштите, као и степена
33 оштећења ДНК у леукоцитима, али и у праћењу отпорности леукоцита на дејства
34 мутагена применом *ex vivo* комет теста. Такође, уведена је примена qPCR методе за
35 праћење степена инфекције односно ефикасности терапије. У дисертацији на основу
36 резултата препоручени су маркери (*NT-proBNP* и *D-dimer*, степен оштећења ДНК и
37 квантификација микрофиларија) за праћење динамике инфекције и опоравка
38 животиња у зависности од терапије, који обезбеђују детаљан увид у здравствено стање
39 паса и стратификацију ризика од кардиоваскуларних компликација и превазилажења
40 озбиљних проблема до којих инфекција може довести. Наведеним доприносима
41 омогућен је увид у ефикасност примењеног протокола, уз отварање могућности за
42 будућа испитивања неких новијих терапијских приступа кардиопулмоналне
43 диروفилариозе паса.
44

45 **4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио**
46 **неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да или**
47 **не):**
48

49 Не.
50
51
52
53
54
55
56
57
58

1 IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ
2 ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА
3 НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања,
4 наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику
5 о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању
6 научноистраживачких резултата истраживача):
7

8 Рад у врхунском међународном часопису (M21):
9

10 **Rajković, M.**, Glavinić, U., Bogunović, D., Vejnović, B., Davitkov, D., Đelić, N., Stanimirović,
11 Z. (2023). "Slow kill" treatment reduces DNA damage in leukocytes of dogs naturally infected
12 with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 322, 110008. (IF = 2,6)
13
14

15
16 X ПРЕДЛОГ:
17

18 На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три
19 понуђених могућности):

20 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
21
22
23

24 ДАТУМ

25 03. 02. 2025.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Зоран Станимировић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Саша Траиловић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Тамара Илић, редовни професор
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Дарко Давитков, доцент
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Зоран Дебељак, научни сарадник
Ветеринарски специјалистички институт
„Краљево“ у Краљеву