

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Kristina A. Spariosu

**ISPITIVANJE FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI**  
**LEUKOCITA KOD PASA**  
**PRIRODNO INFICIRANIH PROTOZOOM**  
***BABESIA CANIS***

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Kristina A. Spariosu

**EVALUATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY  
OF LEUKOCYTES IN DOGS  
NATURALLY INFECTED WITH PROTOZOOON  
*BABESIA CANIS***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

## Članovi komisije

### ***Mentor 1***

Dr Milica Kovačević Filipović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

### ***Mentor 2***

Dr Svetlana Milanović, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Vanja Krstić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Milena Radaković, naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Anđelo Beletić, naučni saradnik i specijalista medicinske biohemije,  
Univerzitetski klinički centar Srbije, Centar za medicinsku biohemiju

Mesto i datum odbrane

---

Istraživanja sprovedena u ovoj studiji finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru projekta „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja” (OI 175061).

# ISPITIVANJE FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI LEUKOCITA KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH PROTOZOOM *BABESIA CANIS*

## Sažetak

Babezioza pasa je vektorski-prenosivo oboljenje izazvano protozoama roda *Babesia*. U Srbiji, najčešći uzročnik babezioze pasa je *Babesia canis*. Bolest može proteći asimptomatski ili klinički manifestno kao nekomplikovana ili komplikovana babezioza. U zavisnosti od toga da li su zadovoljeni klinički i laboratorijski kriterijumi za sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), psi sa nekomplikovanom babezozom mogu biti SIRS pozitivni ili negativni, pri čemu ne dolazi do poremećaja funkcije organa. Komplikovana babezioza podrazumeva prisustvo SIRS praćeno poremećajem funkcije organa. Intenzitet odgovora akutne faze na infekciju *B. canis* zavisi od različitih faktora poput imunskog odgovora psa, koinfekcije ili neinfektivnih komorbiditeta, broja infektivnih krpelja i količine sporozoita oslobođenih iz pljuvačne žlezde krpelja, kao i virulencije soja *B. canis*. Tokom odbrane od patogena, leukociti prepoznaju specifične domene na njegovoj površini i aktiviraju mehanizme urođenog i stečenog imuniteta. Očuvanost funkcionalne aktivnosti leukocita ogleda se kroz sposobnost neutrofilnih granulocita i monocita/makrofaga da fagocituju uzročnika i iniciraju sekreciju matriks metaloproteinaza (MMP) i stvaranje reaktivnih kiseonikovih radikala, odnosno kroz lučenje citokina koji će aktivirati T pomagačke limfocite i dalje omogućiti odgovor B limfocita, kao i bolju aktivaciju makrofaga. Pokazano je da odgovor akutne faze tokom infekcije pasa *B. canis* karakteriše poremećaj redoks homeostaze i značajno povišenje nivoa IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$  *in vivo*, međutim, u literaturi nisu dostupni podaci u vezi sa funkcionalnom aktivnošću leukocita pasa kod ovog oboljenja.

U prvi deo studije je bilo uključeno 24 psa, kojima je krv uzorkovana na prezentaciji (akutna infekcija *B. canis*) i nakon dve nedelje (klinički oporavak). U drugi deo studije je bilo uključeno sedam akutno obolelih pasa i sedam zdravih pasa, koji su služili kao kontrole. Na osnovu kliničkih pokazatelja i rezultata rutinskih laboratorijskih testova, psi su klasifikovani u SIRS pozitivne i SIRS negativne pacijente, bez poremećaja funkcije organa i organskih sistema. Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita je ispitana u uzorcima krvi testovima fagocitoze i oksidativnog praska, odnosno određivanjem aktivnosti MMP-9 u plazmi metodom zimografije na gelu poliakrilamida. Procena funkcionalne aktivnosti ukupnih leukocita i T limfocita zasnivala se na određivanju koncentracije IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$  u plazmi pomoću komercijalnih ELISA testova, nakon inkubacije (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pune krvi uz dodatak različitih koncentracija solubilnih antigena *B. canis*, koji se koriste za vakcinaciju pasa protiv babezioze. Pokazatelj funkcije B limfocita/plazmocita predstavljala je koncentracija  $\gamma$  globulina u serumu, dobijena elektroforetskim razdvajanjem proteina na gelu agaroze. Proteini akutne faze (nivo ceruloplazmina, haptoglobina i paraoksonaze 1), parametri oksidativnog stresa (koncentracija malondialdehida i slobodnih tiolnih grupa) i antioksidativne zaštite (aktivnost katalaze i glutation peroksidaze) određeni su spektrofotometrijski u uzorcima eritrocita i seruma pasa na prezentaciji i oporavku.

Dobijeni rezultati su pokazali prisustvo anemije i trombocitopenije kod svih, odnosno leukopeniju i SIRS kod polovine pasa na prezentaciji. Tokom dvonedeljnog oporavka, utvrđeno je da su se testirani parametri vratili u okvire referentnih vrednosti, čime je isključena mogućnost da je tokom infekcije došlo do oštećenja organa. Analiza funkcionalne aktivnosti leukocita sprovedena nakon inkubacije (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) periferne krvi bez i uz stimulaciju solubilnim antigenima *B. canis* pokazala je da je fagocitna aktivnost neutrofilnih granulocita u bazalnim uslovima i nakon stimulacije izraženija kod akutno obolelih pasa. Analogne razlike u intenzitetu oksidativnog praska su bile uočene nakon stimulacije. Prisustvo SIRS nije bilo povezano sa opisanim razlikama. Utvrđeno je da T limfociti obolelih pasa sekretuju veću količinu IFN- $\gamma$  u bazalnim uslovima i nakon stimulacije, kao i da je nivo

ovog citokina bio najviši kod SIRS pozitivnih pasa. Ukupni leukociti su lučili veću količinu MCP-1 u bazalnim uslovima i nakon stimulacije solubilnim antigenima *B. canis*. Prisustvo SIRS nije bilo povezano sa opisanim razlikama. Stvaranje IL-8 je bilo podjednako u svim uslovima i izmerene koncentracije se nisu razlikovale u uzorcima obolelih i zdravih pasa. Oporavak je bio praćen porastom koncentracije  $\gamma$  globulina u serumu, koji se nije razlikovao između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa. Oporavak je takođe bio praćen porastom koncentracije malondialdehida i aktivnosti katalaze u eritrocitima, dok se aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima i koncentracija slobodnih tiola u serumu nisu promenile tokom ovog perioda. Nivo proMMP-9 i MMP-9 u krvi obolelih pasa je bio viši u poređenju sa zdravim psima, u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* stimulacije, odnosno bio je najviši kod SIRS pozitivnih pasa. Porast nivoa serumske proMMP-9 tokom oporavka je bio u korelaciji sa brojem leukocita, nezavisno da li su oboleli psi imali SIRS. Sveobuhvatno posmatrano, rezultati upućuju na zaključak da je aktivnost neutrofilnih granulocita i limfocita kod SIRS pozitivnih i negativnih pasa sa nekomplikovanom babeziosom pojačana, ali da se stepen oštećenja tkiva ne razlikuje između ove dve grupe, najverovatnije zahvaljujući tome što su zaštitni mehanizmi bili adekvatno očuvani.

**Ključne reči:** fagocitoza, interferon  $\gamma$ , interleukin 8, matriks metaloproteinaze, monocitni hemoatraktantni protein 1, oksidativni prasak, redoks homeostaza, sindrom sistemskog inflamatornog odgovora

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Patološka fiziologija

**UDK broj:** 616-092:591.69:636.7

## EVALUATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH PROTOZOON *BABESIA CANIS*

### *Summary*

Babesiosis is a vector-borne disease caused by protozoa *Babesia* spp. In Serbia, *Babesia canis* is considered to be the main causative agent of canine babesiosis. The infection can be asymptomatic, but it is usually followed by clinical manifestation, through uncomplicated or complicated form. Based upon clinical and laboratory criteria for systemic inflammatory response syndrome (SIRS), dogs with uncomplicated babesiosis can be classified as SIRS positive or SIRS negative, both without organ dysfunction. Unlike uncomplicated, complicated babesiosis includes SIRS with organ dysfunction. The level of the acute phase response depends on the dogs' immune response, coinfection/comorbidity, the number of infectious ticks and sporozoites in ticks' saliva, as well as the virulence of the *B. canis* variant. When fighting the pathogen, leukocytes recognize specific patterns on its surface, which leads to the activation of innate and adaptive immune response mechanisms. Functional activity of leukocytes reflects through the ability of neutrophils and monocytes/macrophages to perform phagocytosis and initiate the release of matrix metalloproteinases (MMP) and reactive oxygen species, and through the secretion of cytokines that will activate T helper and consecutively B lymphocytes, as well as macrophages. It has been previously shown that in canine babesiosis disturbed redox homeostasis and *in vivo* increased levels of IL-8, MCP-1 and IFN- $\gamma$  occur during the acute phase response, but there is no evidence regarding functional activity of leukocytes in dogs infected with *B. canis*.

For the first part of the study, residual blood was collected from 24 dogs at presentation (acute *B. canis* infection) and after two weeks (recovery). The second part of the study included seven dogs with acute *B. canis* infection and seven healthy dogs. Dogs with uncomplicated babesiosis were classified as SIRS positive and SIRS negative based on clinical examination and laboratory results. Functional activity of neutrophils was evaluated after performing phagocytosis and oxidative burst tests *in vitro*, as well as polyacrylamide gel zymography for MMP-9 detection. Using commercial ELISA kits, functional activity of monocytes and T lymphocytes was evaluated by measuring the concentration of IL-8, MCP-1 and IFN- $\gamma$  after incubation (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) of blood samples stimulated with different concentrations of soluble antigens of *B. canis* that are used to vaccinate dogs against babesiosis. Sera levels of  $\gamma$  globulins, that were detected using agarose electrophoresis, reflected the functional activity of B lymphocytes/plasmocytes. Levels of the acute phase proteins (ceruloplasmin, haptoglobin and paraoxonase 1) as well as markers of oxidative stress (concentration of malondialdehyde and free thiol groups) and antioxidant protection (activity of catalase and glutathione peroxidase) were evaluated in erythrocyte and sera samples, using spectrophotometry.

The results showed that all of the dogs had anemia and thrombocytopenia, while half of them had leukopenia and SIRS at presentation. After clinical recovery, almost all of the tested parameters returned to reference intervals, excluding the possibility of organ dysfunction as a consequence of *B. canis* infection. After incubation (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) under basal conditions and with addition of soluble antigens of *B. canis*, the number of neutrophils that performed phagocytosis was higher in acutely infected dogs. Under stimulated conditions, similar results were shown for oxidative burst in neutrophils of acutely infected dogs. These results were not different between SIRS positive and negative dogs. T lymphocytes of acutely infected dogs released higher levels of IFN- $\gamma$  in both basal and stimulated conditions, and these concentrations were highest in the SIRS positive group. Leukocytes released higher levels of MCP-1 in both basal and stimulated conditions, but they were not different between SIRS positive and negative dogs. Concentration of IL-8 did not differ between treatments nor groups. Level of  $\gamma$  globulins showed increasement during the recovery period, but it

was not different between SIRS positive and negative dogs. Concentration of malondialdehyde and activity of catalase in the erythrocytes increased, while the activity of glutathione peroxidase in the erythrocytes and sera levels of free thiol groups didn't change through the recovery period. The level of proMMP-9 and MMP-9 was higher in infected dogs' blood in basal condition and upon *in vitro* stimulation. SIRS positive dogs had the highest levels of proMMP-9 and MMP-9. Increased levels of sera proMMP-9 through the recovery period reflected the increase in number of leukocytes, regardless to the presence of SIRS. Overall, these results indicate increased activity of neutrophil granulocytes and lymphocytes from SIRS positive and negative dogs with uncomplicated babesiosis, while the level of tissue damage doesn't differ between tested groups, most likely because the protective mechanisms were adequately preserved.

**Key words:** interferon  $\gamma$ , interleukin 8, matrix metalloproteinases, monocyte chemoattractant protein 1, oxidative burst, phagocytosis, redox homeostasis, systemic inflammatory response syndrome

**Scientific field:** Veterinary medicine

**Scientific subfield:** Pathophysiology

**UDK number:** 616-092:591.69:636.7



### ***Lista skraćenica koje su korišćene u tekstu***

ALB, albumin;  
ALP, alkalna fosfataza;  
ALT, alanin aminotransferaza;  
AMY, amilaza;  
APC, antigen prezentujuća ćelija (*antigen presenting cell*);  
APP, protein akutne faze (*acute phase protein*);  
APR, reakcija akutne faze (*acute phase reaction*);  
AST, aspartate aminotrasferaza;  
AU, *arbitrary unit*;  
BCR, B ćelijski receptor (*B cell receptor*);  
BIL-T, ukupni bilirubin;  
CAT, katalaza (*catalase*);  
CBB, *Comassie brilliant blue*;  
CD, *cluster of differentiation*;  
CER, ceruloplazmin;  
CHOL, holesterol;  
CK, kreatin kinaza;  
CLP, zajednički limfoidni progenitor (*common lymphoid progenitor*);  
CMP, zajednički mijeloidni progenitor (*common myeloid progenitor*);  
Con A, konkanavalin A (*concanavalin A*);  
CRE, kreatinin;  
CRP, C reaktivni protein;  
CSF, faktor koji stimulise nastanak kolonije (*colony-stimulating factor*);  
Cyt B, citohalazin B (*cytochalasin B*);  
DAMP, molekularni obrazac povezan sa smrću/opasnošću (*death/danger-associated molecular pattern*);  
DMEM, *Dulbecco's modified Eagle medium*;  
DTNB, *5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid*;  
EDTA, etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina (*ethylenediaminetetraacetic acid*);  
ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*;  
FCS, *fetal calf serum*;  
GGT, gama-glutamil transferaza;  
GPCR, G-protein kuplovani receptor (*G-protein-coupled receptor*);  
GPI, glikofosfatidil-inozitol;  
GPx, glutation peroksidaza;  
GR, glutation reduktaza;  
HCT, hematokrit;  
HDL, lipoprotein velike gustine (*high density lipoprotein*);  
HGB, hemoglobin;  
HPT, haptoglobin;  
HRE, *high-resolution electrophoresis*;  
HSC, hematopoetska matična ćelija (*hematopoietic stem cell*);  
IFE, *immunofixation electrophoresis*;  
IFN, interferon;  
Ig, imunoglobulin;  
IL, interleukin;  
IRF, faktor regulacije interferona (*interferon regulatory factor*);  
ITS, *insulin-transferrin-selenium*;  
LIF, faktor koji indukuje leukocitozu (*leukocytosis-inducing factor*);  
LIP, lipaza;

LPS, lipopolisaharid;  
LYM, limfocit;  
MCHC, prosečna vrednost koncentracije hemoglobina u zapremini eritrocita (*mean cellular hemoglobin concentration*);  
MCP-1, monocitni hemoatraktantni protein 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*);  
MCV, prosečna zapremina eritrocita (*mean corpuscular volume*);  
MDA, malondialdehid;  
MHC, glavni histokompatibilni kompleks (*major histocompatibility complex*);  
MMP, matriks metaloproteinaza;  
MODS, sindrom višestruke disfunkcije organa (*multiple organ dysfunction syndrome*);  
MON, monocit;  
MPO, mijeloperoksidaza;  
MT-MMP, matriks metaloproteinaza membranskog tipa (*membrane type matrix metalloproteinase*);  
NBT, *Nitroblue tetrazolium*;  
NEUT, neutrofil;  
NK ćelije, ćelije prirodne ubice (*natural killer cells*);  
PAMP, molekularni obrazac povezan sa patogenom (*pathogen-associated molecular pattern*);  
PBS, *phosphate buffered saline*;  
PCR, *polymerase chain reaction*;  
PD-L1, ligand 1 za programiranu smrt (*programmed death ligand 1*);  
PHA, fitohemaglutinin (*phytohemagglutinin*);  
PLT, trombocit (*platelet*);  
PON, paraoksonaza;  
PPD, p-fenilendiamin (*p-phenylenediamine*);  
PRR, receptor za prepoznavanje obrasca (*pattern recognition receptor*);  
P/S/A, penicilin/streptomycin/amfotericin B;  
RBC, eritrocit (*red blood cells*);  
RNS, reaktivna jedinjenja azota (*reactive nitrogen species*);  
ROS, reaktivna jedinjenja kiseonika (*reactive oxygen species*);  
SAA, serum amiloid A;  
SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*;  
SEP, serumna elektroforeza (*serum electrophoresis*);  
SHPS-1, *protein tyrosine phosphatase substrate 1*;  
SIRS, sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (*systemic inflammatory response syndrome*);  
SOD, superoksid dismutaza;  
TBA, tiobarbiturna kiselina;  
TBH, tercijarni butil hidroperoksid;  
TCA, trihlorsirćetna kiselina;  
TCR, T ćelijski receptor (*T cell receptor*);  
TG, trigliceridi;  
TGF- $\beta$ , faktor transformacije rasta  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* );  
Th ćelija, pomagačka T ćelija (*T helper cell*);  
THIOLS, tioli;  
TIMP, tkivni inhibitor metaloproteinaze (*tissue inhibitor of metalloproteinase*);  
TLR, *Toll-like receptor*;  
TNF, faktor nekroze tumora (*tumor necrosis factor*);  
UP, ukupni proteini;  
URE, urea;  
WBC, leukocit (*white blood cells*).

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Babezioza pasa izazvana protozooom <i>Babesia canis</i> – karakteristike etiološkog agensa i klinička slika oboljenja .....	3
2.2. Urođeni i stečeni imunski odgovor .....	4
2.3. Uloga različitih vrsta leukocita u imunskom odgovoru domaćina .....	5
2.4. Receptori važni za funkciju leukocita i prepoznavanje patogena.....	8
2.5. Uloga citokina u imunskom odgovoru.....	9
2.6. Mehanizam fagocitoze i oksidativnog praska u neutrofilnim granulocitima i monocitima/makrofagima .....	12
2.7. Osnovni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi.....	13
2.8. Uloga proteina akutne faze u antioksidativnoj zaštiti .....	15
2.9. Uloga matriks metaloproteinaza u inflamatornom odgovoru.....	17
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA .....	21
4. MATERIJAL I METODE .....	22
4.1. Dizajn studije .....	22
4.2. Odabir pacijenata .....	22
4.3. Uzorkovanje krvi .....	23
4.3.1. <i>In vitro</i> stimulacija leukocita u punoj krvi .....	24
4.3.2. <i>In vitro</i> stimulacija izolovanih leukocita.....	24
4.4. Hematološke i biohemijske analize .....	24
4.5. Evaluacija krvnih razmaza .....	25
4.6. Molekularna dijagnostika uzročnika babezioze pasa.....	25
4.7. Ispitivanje funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita.....	25
4.7.1. Test fagocitoze partikula zimozana .....	25
4.7.2. Test oksidativnog praska.....	25
4.8. Određivanje koncentracije citokina .....	26
4.9. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite .....	26
4.9.1. Određivanje koncentracije malondialdehida .....	26
4.9.2. Određivanje koncentracije ukupnih tiola .....	26
4.9.3. Određivanje aktivnosti katalaze.....	27
4.9.4. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze .....	27
4.10. Određivanje nivoa proteina akutne faze .....	27
4.10.1. Određivanje koncentracije ceruloplazmina .....	27
4.10.2. Određivanje koncentracije haptoglobina.....	28

4.10.3.	Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1 .....	28
4.11.	Agarozna elektroforeza proteina .....	28
4.12.	Zimografija .....	28
4.13.	Western blot .....	29
4.14.	Statistički testovi .....	29
5.	REZULTATI .....	30
5.1.	Vrednosti rutinskih laboratorijskih parametara i proteina akutne faze na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka pasa inficiranih <i>B. canis</i> .....	30
5.2.	Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita testovima fagocitoze i oksidativnog prasaka <i>in vitro</i> .....	32
5.3.	Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita na osnovu nivoa izlučenih citokina <i>in vitro</i> .....	34
5.4.	Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa prirodno inficiranih <i>B. canis</i> .....	37
5.5.	Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	39
5.6.	Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnih $\gamma$ globulina i ostalih proteinskih frakcija u serumu pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka .....	41
5.7.	Rezultati ispitivanja prisustva i aktivnosti želatinolitičkih matriks metaloproteinaza .....	43
6.	DISKUSIJA .....	50
6.1.	Promene laboratorijskih parametara i proteina akutne faze na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka pasa inficiranih <i>B. canis</i> .....	50
6.2.	Uticaj akutne infekcije <i>B. canis</i> na sposobnost fagocitoze i oksidativni prasak neutrofilnih granulocita.....	51
6.3.	Uticaj akutne infekcije <i>B. canis</i> na lučenje IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$ .....	52
6.4.	Uticaj SIRS na funkcionalnu aktivnost leukocita kod pasa akutno inficiranih <i>B. canis</i> .....	53
6.5.	Oksidativni stres i antioksidativna zaštita u krvi pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka.....	53
6.6.	Koncentracija $\gamma$ globulina i ostalih proteinskih frakcija u serumu pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka.....	54
6.7.	Prisustvo i aktivnost želatinolitičkih MMP u krvi pasa akutno inficiranih <i>B. canis</i> .....	55
7.	ZAKLJUČCI.....	58
8.	LITERATURA .....	59

## 1. UVOD

„If you don't have a dog – at least one, there is not necessarily anything wrong with you, but there may be something wrong with your life.“

Vincent Van Gogh

Kroz istoriju, menjali su se oblici društva u kojima je čovek živeo. Pas je bio deo svakog tog društva i nastavlja da bude njegova bitna gradivna jedinica. Napretkom medicine, kako humane, tako i veterinarske, sa mnogim bolestima se ređe srećemo upravo zahvaljujući merama profilakse. Edukacija držalaca životinja o značaju preventivnih mera, pre svega redovne vakcinacije i upotrebe preparata protiv ekto i endoparazita, deo su svakodnevice svakog veterinara. Međutim, uprkos tome, pojedine bolesti ne posustaju. Babezioza pasa je jedina od tih bolesti.

Babezioza pasa je vektorski-prenosivo oboljenje prisutno širom sveta, prouzrokovano protozoama roda *Babesia*. U Srbiji je najčešći uzročnik babezioze pasa velika babezija – *Babesia canis*, koju prenosi krpelj *Dermacentor reticulatus*. Bolest pokazuje sezonski karakter i vezana je za period najveće aktivnosti krpelja, a to su rano proleće i jesen. U retkim slučajevima, infekcija može biti asimptomatična. Babezioza pasa najčešće protiče u nekomplikovanoj, klinički manifestnoj formi sa simptomima koji uključuju blede sluznice, groznicu, anoreksiju, hipotenziju i letargiju. Uobičajen laboratorijski nalaz podrazumeva blagu normocitno-normohromnu, neregenerativnu anemiju, trombocitopeniju, normalan broj leukocita ili leukopeniju sa neutro- i limfopenijom. Komplikovana forma babezioze se javlja ređe i rezultat je jake sistemske inflamacije, odnosno sindroma sistemskog inflamatornog odgovora. Posledica komplikovane forme babezioze mogu biti septični šok, sindrom višestrukog otkazivanja organa i smrt.

Leukociti su ćelijska komponenta urođenog i stečenog imuniteta. Neutrofilni granulociti i monociti/makrofagi, prva linija odbrane urođenog imuniteta, prepoznaju domene na mikroorganizmima posredstvom specifičnih receptora, aktiviraju se i luče citokine neophodne za dalju aktivaciju i sazrevanje pomagačkih limfocita (Th). Infekcija intraeritocitnim protozoama aktivira Th ćelije tipa 1 koje stimulišu stvaranje slobodnih kiseonikovih radikala u neutrofilima i makrofagima. Ovim procesom dolazi do uginuća fagocitovanog patogena. Takođe, aktiviraju se i Th ćelije tipa 2, koje prevashodno stimulišu B limfocite na diferencijaciju u plazma ćelije koje sintetišu antitela. Kod pasa, kod kojih je utvrđena prirodna infekcija protozom *B. canis*, pokazano je da odgovor akutne faze karakteriše značajno povišenje nivoa interleukina 8, monocitno-hemoatraktantnog proteina 1 i interferona  $\gamma$ . U literaturi nisu dostupni podaci o funkcionalnoj aktivnosti leukocita sa aspekta sposobnosti neutrofila i monocita/makrofaga da uspešno sprovedu hemotaksu i fagocitozu, izazovu oksidativni prasak i sekretuju citokine tokom infekcije protozom *B. canis*. Takođe, ne postoje podaci o sposobnosti proliferacije T limfocita i sekrecije citokina stimulisane antigenima specifičnim za pojedine patogene i sposobnosti B limfocita da se transformišu u plazma ćelije i sintetišu imunoglobuline.

Protozoe poseduju različite mehanizme preživljavanja u ćelijama monocitno-makrofagnog sistema: sprečavanje fuzije fagozoma i lizozoma, inhibicija NADPH oksidaze i/ili neutralizacija slobodnih kiseonikovih radikala. Protozoe roda *Plasmodium* remete sposobnost hemotakse neutrofila domaćina i izazivaju sekvestraciju i apoptozu limfocita unutar limfnih čvorova. S obzirom na to da je limfopenija čest nalaz kod babezioze pasa, postoji mogućnost da infekcija ovom protozom dovodi do sličnih promena, ali za sada ne postoje podaci o tome. Osim interferencije sa efektorskim funkcijama, protozoe mogu da modifikuju i sekreciju citokina iz ćelija urođenog imuniteta i da na taj način posredno promene odnos Th1 i Th2 i utiču na ćelijski i humoralni imunski odgovor.

Pojačanu aktivnost leukocita, pre svega neutrofila i monocita, prati rizik nastanka oksidativnog stresa. Oksidativni stres usled narušene redoks homeostaze u korist prooksidantnih činilaca je fenomen koji često prati sistemsku inflamaciju. Kod pasa prirodno inficiranih protozom *B. canis* pokazan je povišen nivo lipidne peroksidacije kroz povišenu koncentraciju malondialdehida u eritrocitima i serumu, kao i narušena antioksidativna zaštita kod akutno inficiranih jedinki. Međutim, nije poznato da li se i na koji način se ovi parametri menjaju nakon kliničkog oporavka.

Matriks metaloproteinaze (MMP) su endopeptidaze koje učestvuju u razgradnji i remodelovanju ekstracelularnog matriksa. Njihova aktivnost je povišena kada je prisutna inflamacija. Kao posledica stimulisanog endotela, raste aktivnost MMP-2. Neutrofilni sintetišu i luče MMP-9 koja zajedno sa drugim proteazama izaziva povećanu permeabilnost krvnih sudova. Pokazano je da aktivnost pojedinih MMP raste kod sepse, ali nije poznato na koji način se aktivnost MMP-2 i MMP-9 menja prilikom *B. canis* infekcije, a samim tim ni da li postoji povezanost sa nastankom sepse.

Zbog svega navedenog, u ovoj distertaciji je ispitivana funkcionalna aktivnost leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *B. canis* kroz utvrđivanje sposobnosti neutrofilnih granulocita da obave fagocitozu, oksidativni prasak i luče MMP-2/9; određivanje koncentracije citokina *in vitro* nakon inkubacije (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pune krvi bez i sa prisustvom solubilnih antigena *B. canis*; utvrđivanje da li je nivo promena aktivnosti leukocita veći kod SIRS pozitivnih u odnosu na SIRS negativne i zdrave pse. Dodatno, evaluirani su oksidativni stres i aktivnost MMP-2/9 u krvi pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Babezioza pasa izazvana protozom *Babesia canis* – karakteristike etiološkog agensa i klinička slika oboljenja

Babezioza pasa je učestalo i klinički značajno oboljenje prouzrokovano protozoama roda *Babesia* (Irwin, 2009). Krajem 19. veka, rumunski naučnik Viktor Babeš je otkrio da se u eritrocitima krava i ovaca sa hemoglobinurijom nalaze do tada nepoznati mikroorganizmi (Uilenberg, 2006). Nedugo zatim, u Italiji su u eritrocitima pasa otkriveni uzročnici sličnih karakteristika (Roncalli, 2001). Ceo rod je nazvan *Babesia* i danas je zastupljen širom sveta, a domaćini mogu biti preživari, ekvide, kanide, felide i ljudi (Schnittger i sar., 2012).

Predstavnici roda *Babesia* se primarno prenose posredstvom svojih vektora krpelja (Irwin, 2009). Ubodom u kožu, krpelj pljuvačkom unosi u krvotok domaćina infektivnu formu babezije – sporozoit. U eritrocitima sisara, babezija nastavlja svoj životni ciklus kroz naredni razvojni oblik – merozoit. Izgled merozoita predstavlja osnovu dijagnostikovanja akutne babezioze analizom krvnog razmaza periferne krvi domaćina, što je već od prvobitnog prepoznavanja uzročnika bilo značajno za klasifikaciju babezija na osnovu morfoloških karakteristika.

*Babesia* spp. pripadaju redu Piroplasmida i kolu Apicomplexa. Od otkrića do danas, nomenklatura unutar roda je doživela promene. Na osnovu veličine i izgleda merozoita u eritrocitu psa, razlikuju se velika (prečnik 3-5  $\mu\text{m}$ ) i mala (1-3  $\mu\text{m}$ ) babezija, ranije nazvane *Babesia canis* odnosno *Babesia gibsoni* (Boozer i Macintire, 2003). Otkrivanjem novih vrsta, zaključeno je da postoji nekoliko velikih i malih babezija. U velike babezije koje su patogene za pse spadaju *B. canis*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli* (Carret i sar., 1999) i nova vrsta otkrivena u Severnoj Karolini, koja je po svojim karakteristikama najbližija *Babesia bigemina* odnosno babeziji specifičnoj za goveda (Birkenheuer i sar., 2004). U grupu malih babezija pasa spadaju *B. gibsoni*, *Babesia conradae* (Kjemtrup i Conrad, 2006) i *Babesia microti*-like (Zahler i sar., 2000). Najčešći uzročnik babezioze pasa u Srbiji je *B. canis* (Davitkov i sar., 2015).

Vektor *B. canis* je krpelj *Dermacentor reticulatus*, koji u Evropi ima široku geografsku distribuciju i ispoljava afinitet prema umerenim i vlažnim podnebljima (Petney i sar., 2012). U okolini Beograda, *D. reticulatus* je najaktivniji u proleće i na temperaturi oko 10°C (Milutinović i Radulović, 2002). Osim prirodne infekcije ubodom, zabeležena je babezioza pasa nakon ingestije krpelja (Short, 1973). Premda je za potpun razvojni ciklus babezije neophodan krpelj, utvrđeni su pojedinačni slučajevi *B. gibsoni* i zaražavanja pasa prilikom transfuzije krvi poreklom od inficiranog psa (Sainz i sar., 2015), kao i pljuvačkom nakon ujeda (Birkenheuer i sar., 2005). Mierzejewska i sar. (2014) su prvi opisali slučaj vertikalne transmisije *B. canis*.

Nakon što se pas inficira, bolest može proteći asimptomatično ili klinički manifestno (Beck i sar., 2009). Infekciju *Babesia* spp. prate apatija, malaksalost, anoreksija, blede do ikterične sluznice i loše opšte stanje. Telesna temperatura je povišena, uvećani su limfni čvorovi i slezina. Karakterističan laboratorijski nalaz je umerena do jaka anemija i trombocitopenija. Anemija je posledica kombinovane intra- i ekstravaskularne hemolize, kada oštećenje eritrocita nastaje zbog direktnog uticaja parazita, kao i usled oslabljene osmotske rezistencije i oksidativnog, odnosno sekundarnog imunski-posredovanog oštećenja membrane eritrocita (Irwin, 2009). Psi prirodno inficirani *B. canis* mogu imati umerenu do tešku kliničku sliku. Laboratorijski nalaz uključuje blagu do umerenu normocitno-normohromnu, neregenerativnu anemiju, leukopeniju sa neutropenijom i/ili limfopenijom i trombocitopeniju. Analiza biohemijskih parametara upućuje na hipoalbuminemiju, povišenu aktivnost enzima jetre (ALT, AST, ALP), prerenalnu i renalnu azotemiju. Bolest uglavnom protiče akutno i uz primenu terapije ima povoljnu prognozu (Solano-Gallego i sar., 2016).

Klinički manifestna babezioza se javlja u nekomplikovanoj ili komplikovanoj formi (Irwin, 2009). Nekomplikovana forma bolesti može biti neseptična i septična. Hipotenzija, kongestija kapilara (Schetters, 2019) i povećana propustljivost krvnih sudova (Matijatko i sar., 2009) okosnica su sistemske inflamacije usled infekcije *B. canis*, sa tendencijom prelaska u sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS). Patogeneza SIRS uključuje interakcije između endotelnih ćelija i leukocita (Bermejo-Martin i sar., 2018). Komplikovana forma je rezultat prerastanja SIRS u sindrom višestruke disfunkcije organa (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) (Matijatko i sar., 2009).

Nekomplikovana i komplikovana babezioza se razlikuju i po intenzitetu odgovora akutne faze, što zavisi od različitih činilaca: imunskog odgovora jedinke, koinfekcija i/ili komorbiditeta, broja krpelja koji su infestirali psa, broja sporozoita oslobođenih iz pljuvačne žlezde krpelja i virulencije soja *B. canis* (Irwin, 2016).

## 2.2. Urođeni i stečeni imunski odgovor

Imunski sistem je kompleksna odbrambena mreža koju čine ćelije i njihovi produkti, tkiva i organi, a koja se aktivira prilikom kontakta sa patogenom. S obzirom na to da su višćelijski organizmi pod stalnom pretnjom patogena koji se međusobno razlikuju po svojim dimenzijama, građi, virulentnosti i tropizmu, imunski sistem je tokom evolucije prerastao u multifunkcionalnu mrežu ćelija, molekula i signalnih puteva (Kimbrell i Beutler, 2001).

Nakon što je Luj Paster ukazao na značaj vakcinacije, pojedini naučnici su počeli da zastupaju stav da se zaštita koju su stekle vakcinisane osobe pre svega zasniva na ćelijskom odgovoru. Druga struja naučnika je tu ulogu pripisivala solubilnim molekulima. Proučavajući učešće ćelija u imunskom odgovoru domaćina, Eli Mečnikov je zaključio da su leukociti, pre svega neutrofilni granulociti i monociti, sposobni da „pojednu“ mikroorganizme i strani materijal. Time je postavio hipotezu da su ćelije glavni efektori imuniteta. Neposredno nakon toga, von Behring i Kitasato su eksperimentalno dokazali da je ubrizgavanjem seruma životinja imunizovanih protiv difterije moguće sprovesti dalju imunizaciju (Beutler i Reitschel, 2003).

Danas je poznato da su za efikasan imunski odgovor neophodne i ćelijska i humoralna komponenta. Sredinom 20. veka, leukociti, poreklom od morske prasadi inficirane tuberkulozom, ubrizgavani su zdravoj morskoj prasadi, kod kojih se ispoljila kasna reakcija preosetljivosti, a da prethodno nisu bili u kontaktu sa samim uzročnikom tuberkuloze (Landsteiner i Chase, 1942). Par godina kasnije, ovo je utvrđeno i kod ljudi (Lawrence, 1949). Time je ćelijski imunitet opet postao interesantan naučnicima. Istraživanja u ćelijskoj kulturi su pokazala da limfociti učestvuju i u celularnom i u humoralnom imunskom odgovoru. Takođe, neposredno nakon tog otkrića, determinisano je postojanje dva tipa ovih ćelija: T limfociti, koji vode poreklo iz timusa i B limfociti, koji vode poreklo iz Fabricijeve burze (ptice) ili kostne srži (sisari) (Claman i sar., 1966). Dalja istraživanja su u serumu pokazala prisustvo imunoglobulina kao aktivne komponente imuniteta, koja može da neutrališe ili precipitira toksine i izazove aglutinaciju mikroorganizama (Hill i sar., 1966).

Urođeni imunitet obuhvata evolutivno starije molekulske i ćelijske mehanizme, koji prvi reaguju na kontakt sa mikroorganizmom. On efikasno brani organizam od patogena time što ih ili u potpunosti sprečava da ostvare štetno dejstvo ili usporava njihovo delovanje, dok se ne pokrenu mehanizmi stečenog imuniteta. Komponente urođenog imuniteta čine fizičke i hemijske barijere i DNK-kodirani receptori (Kimbrell i Beutler, 2001). Zajedničkim delovanjem omogućavaju efikasno prepoznavanje patogena i aktiviranje mehanizama koji pokreću fagocitozu i oksidativni prasak. Komplement je solubilna komponenta urođenog imuniteta, koja stimuliše lučenje citokina i inicira kaskadnu reakciju. On pojačava reakciju ćelijskog imuniteta time što inicira opsonizaciju koja vodi u lizu i finalno uklanjanje patogena (Dunkelberger i Song, 2010).



Stečeni imunitet uključuje mehanizme koji prepoznaju patogene na osnovu prethodno ostvarenog kontakta. Zasniva se na aktivnosti T i B limfocita koji se, za razliku od leukocita uključenih u odgovor urođenog imuniteta, pokreću nakon nekoliko dana, ali je njihov odgovor specifičniji i usmeren ka konkretnom antigenu patogena (Chaplin, 2010).

Za potpun i efikasan imunski odgovor, neophodno je da urođena i stečena komponenta međusobno komuniciraju, što se postiže kontaktom između ćelija i posredstvom solubilnih medijatora, odnosno citokina i hemokina (Rot i von Andrian, 2004). Citokini se vezuju za receptore na ćelijama koje treba da odgovore i na taj način im signaliziraju da preusmere svoju aktivnost na sintezu novih medijatora ili diferencijaciju ćelija. Hemokini privlače ćelije na mesto gde treba da ostvare svoju ulogu.

### 2.3. Uloga različitih vrsta leukocita u imunskom odgovoru domaćina

Efikasan imunski odgovor se zasniva na interakciji i signalizaciji između ćelija urođenog imuniteta koje prve stupaju u kontakt sa patogenom, antigen-prezentujućih ćelija (APC) koje saopštavaju informaciju i limfoidnih ćelija koje dalje koordiniraju odgovor stečenog imuniteta i proizvode ćelije pamćenja koje štite od narednih infekcija (Owen i sar., 2013a).

U primarnim limfnim organima (kostna srž i timus) se odvija diferencijacija u T i B limfocite. Sekundarni limfni organi (slezina i limfni čvorovi) koordiniraju interakciju između antigena i antigen-specifičnih ćelija i njihovo sazrevanje u efektorske i ćelije pamćenja (Owen i sar., 2013a). Putem krvotoka i limfotoka, ovi organi su povezani u funkcionalnu celinu.

Sve specijalizovane ćelije krvi vode poreklo od hematopoetske matične ćelije (*hematopoietic stem cell*, HSC) (Mikolla i Orkin, 2006). Ove ćelije se nalaze u malom broju u kostnoj srži gde se odvija njihova proliferacija, diferencijacija i sazrevanje u funkcionalne ćelije krvi, dok se diferencijacija T ćelija odvija u timusu. Ukoliko ne postoji pretnja delovanjem patogena, HSC je uglavnom u stanju mirovanja i svega se par ovih ćelija deli. Asimetričnim deobama se postiže istovremena samoobnova, dok pojedine ćelije ćerke gube sposobnost samoobnavljanja i diferenciraju se u progenitorske ćelije, od kojih će nastati odgovarajuće linije ćelija krvi.

Tokom diferencijacije, HSC gubi svoju sposobnost samoobnove i postaje ćelija progenitor: zajednički mijeloidni progenitor (*common myeloid progenitor*, CMP) ili zajednički limfoidni progenitor (*common lymphoid progenitor*, CLP) (Shizuru i sar., 2005). Eritrociti, granulociti, monociti i makrofagi nastaju od CMP, a T i B limfociti i NK ćelije vode poreklo od CLP.

**Neutrofilni granulociti** čine 40-80% leukocita u cirkulaciji (Božić, 2012). Nakon diferencijacije u kostnoj srži, oslobađaju se u periferni krvotok gde borave 7-10h pre migracije u tkiva. U tkivima je životni vek neutrofila ograničen na nekoliko dana. Neutrofilni granulociti su ćelije koje prve migriraju na mesto infekcije/inflamacije pod uticajem medijatora inflamacije. Kao odgovor na infekciju, njihov broj u cirkulaciji i tkivima raste, a kostnoj srži se šalje signal za ubranu proliferaciju i oslobađanje novih mijeloidnih ćelija (Owen i sar., 2013a). Proces nastanka novih neutrofila regulišu citokini i faktori rasta, pre svega interleukin 3 (IL-3) i faktori koji stimulišu nastanak kolonije (*colony-stimulating factors*, CSFs). Ubrzano otpuštanje neutrofila iz kostne srži u cirkulaciju regulišu interleukin 1 (IL-1), faktor nekroze tumora (*tumor necrosis factor*, TNF) i faktor koji indukuje leukocitozu (*leukocytosis-inducing factor*, LIF) (Weiser, 2012).

Neutrofili vode poreklo od multipotentne progenitorske ćelije koja se diferencira u unipotentne progenitorske ćelije od kojih nastaju granulociti, odnosno monociti. Ove ćelije se ne mogu morfološki definisati i najviše podsećaju na limfocite. Prve prepoznatljive ćelije su mijeloblasti. Mijeloblasti imaju samo primarne granule, dok naredni stadijum – mijelocit, sadrži i sekundarne granule, koje ukazuju na to u koji će se tip granulocita ćelija transformisati. Mijeloblasti, progranulociti i mijelociti

još uvek mogu da se dele, za razliku od narednih stadijuma (metamijelociti, štapićasti i segmentirani neutrofilni) koji to ne mogu (Kovačević Filipović i Radovanović, 2012). Sazrevanje se zasniva na progresivnoj kondenzaciji jedra i promeni oblika od štapićastog kod mladih neutrofila do segmentiranog kod zrelih neutrofila (Weiser, 2012).

Sposobnost neutrofila da fagocituju strane čestice, pre svega mikroorganizme, zavisi od prisustva receptora na/u ćelijskoj membrani, signalnih puteva i sadržaja njihovih granula. Komponente granula su proteini sa antimikrobnim i/ili proteolitičkim dejstvom, molekuli koji učestvuju u respiratornom prasku, enzimi koji razgrađuju ekstracelularni matriks i solubilni medijatori inflamacije (Faurischou i Borregaard, 2003). Postoji tri tipa granula: primarne (azurofilne, mijeloperoksidaza-pozitivne), sekundarne (specifične) i tercijarne (želatinazne) granule. Primarne granule sadrže mijeloperoksidazu (MPO),  $\alpha$  defenzine i serin proteaze (elastaza, katepsin G, proteinaza 3) (Borregaard i Cowland, 1997; Nauseef i sar., 1992). Sekundarne granule su rezervoari laktoferina, alkalne fosfataze, lizozima i citohroma b (Faurischou i Borregaard, 2003). Kolagenaze i želatinaze se delimično nalaze u latentnoj formi u sekundarnim i u većoj količini u tercijarnim granulama (Borregaard i Cowland, 1997). Pored granula, neutrofilni imaju i sekretorne vezikule, multilaminarna i multivezikularna telašca (Faurischou i Borregaard, 2003). Oslobođanje sadržaja granula zavisi od brojnih molekula i stimulacije neutrofila preko receptora, pri čemu svoj sadržaj najpre oslobađaju sekretorne vezikule, a primarne granule to čine poslednje. Neutrofilni pasa imaju sličnu građu, sadržaj granula i vezikula kao neutrofilni ljudi (Bertram, 1985).

Posebnu grupu fagocitnih ćelija čine APC u koje spadaju monociti, makrofagi i dendritične ćelije. Mijeloidne APC predstavljaju ćelijsku vezu između urođenog i stečenog imunskog sistema. One primarno ostvaruju kontakt sa patogenom na mestu infekcije, a potom o tome informišu T limfocite u limfnim čvorovima. Na prisustvo patogena, APC reaguju i sekrecijom medijatora koji privlače i aktiviraju druge imunske ćelije. Ove ćelije fagocituju mikroorganizam, razlažu patogene proteine do peptida i ekspimiraju peptidne antigene u okviru molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa (*major histocompatibility complex*, MHC) II klase. Njihovo prezentujuće dejstvo intenzivirano je ekspresijom i kostimulatornih molekula, koji su neophodni za potpunu aktivaciju T limfocita (Owen i sar., 2013a).

**Monociti** su heterogena grupa ćelija i čine 0-13% leukocita u krvi, dok se u tkivima nalaze u formi makrofaga i dendritičnih ćelija (Božić, 2012). Tokom hematopoeze u kostnoj srži, GM progenitori se diferenciraju u promonocite, koji se po dospeću u cirkulaciju dalje diferenciraju u zrele monocite (Hettinger i sar., 2013).

Autori svrstavaju monocite u dve grupe: inflamatorni i patrolirajući monociti (Hanna i sar., 2015; Yang i sar., 2014). Inflamatorni monociti reaguju na infekciju tako što za kratko vreme dođu do tkiva i stimulatorno utiču na imunski odgovor domaćina. Patrolirajući monociti su prisutni u cirkulaciji i predstavljaju manju grupu rezervoara monocita koji se po potrebi usmeravaju na migraciju ka tkivima. Za razliku od inflamatornih monocita, patrolirajući monociti imaju suprimirajuće dejstvo na imunski odgovor.

**Makrofagi** mogu da borave u tkivima u stanju mirovanja i po potrebi učestvuju u njihovoj reparaciji i regeneraciji. Druga grupa makrofaga učestvuje u urođenom imunskom odgovoru i kao posledica kontakta sa patogenima ili usled oštećenja tkiva, podleže morfološkim i funkcionalnim promenama. Analogno monocitima, ovi makrofagi predstavljaju inflamatorne makrofage. Oni deluju kao efikasni fagociti, koji čiste tkivo od patogena i njihovih produkata, odnosno kao APC, koje informišu i aktiviraju T limfocite. Aktivirani, inflamatorni makrofagi uspešno uklanjaju potencijalne patogene zbog toga što imaju veću sposobnost fagocitoze, a takođe pojačavaju sekreciju inflamatornih i citotoksičnih medijatora i aktiviraju T ćelije (Owen i sar., 2013a).

**Limfociti** su glavni ćelijski regulatori stečenog imuniteta koji čine 10-34% leukocita u krvi (Božić, 2012). Na osnovu fenotipskih i funkcionalnih razlika, limfociti se dele na T limfocite, B limfocite i NK ćelije. Mikroskopskim pregledom razmaza krvi nije moguće precizno razlikovati T i B limfocite. Ove ćelije se razlikuju na osnovu klastera diferencijacije (*cluster of differentiation*, CD), proteina koji se nalaze na površini ćelija. Pored CD molekula, na površini T limfocita se nalazi antigen-specifični T ćelijski receptor (*T cell receptor*, TCR), a B limfociti ekspimiraju B ćelijski receptor (*B cell receptor*, BCR) (Abram i Lowell, 2009).

Dok ne dođu u kontakt sa antigenom, T i B limfociti su u mirovanju i predstavljaju antigen naivne ćelije. Nakon kontakta sa antigenom, naivni limfociti proliferišu i pretvaraju se u efektorske i ćelije pamćenja. Efektorske T ćelije učestvuju u primarnom odgovoru, a ćelije pamćenja se transformišu u efektorske ćelije u sekundarnom imunskom odgovoru, kada nakon ponovnog susreta sa istim antigenom generišu brži i jači odgovor (Owen i sar., 2013a).

T limfociti vode poreklo iz timusa i na svojoj površini ekspimiraju TCR i CD molekule. T ćelijski receptor je specifičan po tome što prepoznaje antigen samo kada je razložen na manje peptide koji su prezentovani u okviru molekula MHC I ili II klase. T limfociti su podeljeni na pomagačke (Th) ćelije i citotoksične (Tc) ćelije, koje se međusobno razlikuju po prisustvu CD4 i CD8 molekula na svojoj površini. Koje će se Th ćelije aktivirati, zavisi od vrste patogena (Smith-Garvin i sar., 2009).

T pomagačke ćelije tipa 1 (Th1) sekretuju citokine koji stimulišu diferencijaciju i aktivaciju makrofaga i citotoksičnih T (Tc) ćelija, dovodeći do primarno citotoksičnog imunskog odgovora na prisustvo intracelularnih patogena. Diferencijaciju Th1 ćelija stimulišu interleukin 12 (IL-12) i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). T pomagačke ćelije tipa 2 (Th2) aktiviraju B ćelije koje se dalje diferenciraju u plazma ćelije koje luče antitela. U diferencijaciji Th2 ćelija učestvuju interleukin 4 (IL-4) i 5 (IL-5) (Dong i Flavell, 2000; Romagnani, 1991). T pomagačke ćelije tipa 17 (Th17) proliferišu uz učešće interleukina 17 (IL-17) i 23 (IL-23) i stimulišu diferencijaciju aktiviranih makrofaga i neutrofila. One učestvuju u ćelijski-posredovanom imunitetu i odbrani organizma od gljivica (Korn i sar., 2009). T pomagačke ćelije folikularnog tipa (Tfh) učestvuju u humoralnom imunskom odgovoru i kontrolišu nastanak B ćelija u germinativnim centrima (King, 2009).

B limfociti (B ćelije) ptica vode poreklo iz Fabricijeve burze, dok je kod sisara kostna srž glavno mesto sazrevanja B limfocita. B limfocit prepoznaje i vezuje antigen zahvaljujući BCR membranskom receptoru, koji je po svojoj građi imunoglobulin. Aktivirani B limfociti se diferenciraju u efektorske plazma ćelije. Plazmociti gube sposobnost ekspimiranja BCR i visoko su specijalizovani za lučenje antitela (Owen i sar., 2013a).

**Imunski odgovor domaćina na infekciju protozoama:** U imunski odgovor protiv protozoa uključeni su granulociti, monociti/makrofagi, dendritične ćelije i Th1 limfociti. Protozoe mogu da modifikuju ćelijski i humoralni odgovor domaćina tako što utiču na sekreciju citokina iz ćelija urođenog imuniteta, odnosno menjaju odnos Th1 i Th2 (Mahanta i sar., 2018).

Mehanizmi kojima protozoe preživljavaju u ćelijama monocitno-makrofagnog sistema se baziraju na sprečavanju fuzije fagozoma i lizozoma, inhibiciji NADPH oksidaze i/ili neutralizaciji slobodnih kiseonikovih radikala (Mauel, 1984). Infekcija pojedinim vrstama roda *Plasmodium*, koji kao i rod *Babesia* pripada kolu Apicomplexa, praćena je paralizom neutrofila usled smanjene sposobnosti hemotakse prema izvoru povišene koncentracije IL-8, sekvestracijom i apoptozom limfocita unutar limfnih čvorova (Leoratti i sar., 2012; Wykes i sar., 2014). Dostupna literatura nije ponudila podatke koji potvrđuju da *B. canis* infekcija dovodi do sličnih promena.

## 2.4. Receptori važni za funkciju leukocita i prepoznavanje patogena

Ćelijski receptori su molekuli smešteni na/u ćelijskoj membrani i služe za komunikaciju ćelija, prepoznavanje patogena i proizvoda inflamacije. Oni učestvuju u aktiviranju G-proteina, signalnih puteva  $Ca^{2+}$ , proteinskih i lipidnih kinaza, kao i u reorganizaciji citoskeleta (Futosi i sar., 2013).

Iako se dugo smatralo da urođeni imunski sistem u potpunosti predstavlja nespecifičan odgovor organizma na prisustvo patogena, novija istraživanja su ukazala na postojanje receptora ćelija urođenog imuniteta, koji su specijalizovani za prepoznavanje domena na/u patogenima. Među njima, Toll-like receptori su ključna veza između urođenog i stečenog imuniteta (Rajasekaran i sar., 2017; Thompson i sar., 2011).

**Receptori vezani za G-protein** (*G-protein-coupled receptors*, GPCR) prvenstveno utiču na hemotaksu neutrofilnih granulocita tako da su njihovi agonisti hemoatraktanti. Aktivacija ovih receptora indukuje i sintezu kiseonikovih radikala, egzocitozu intracelularnih granula i vezikula i intenzivira stimulaciju neutrofila pod uticajem drugih agonista (Futosi i sar., 2013).

**Fc-receptori** su zaduženi za prepoznavanje patogena koji su opsonizovani imunoglobulinima i učestvuju u inflamatornim procesima izazvanim taloženjem imunih kompleksa (Bruhns, 2012).

Grupu **adhezivnih receptora** čine selektini i integrini. Selektini su jednolančani transmembranski glikoproteini koji prepoznaju ugljenohidratne delove i stvaraju privremene veze između leukocita i endotelnih ćelija tokom faze kotrljanja i transmigracije. Svi leukociti imaju L-selektine, a među ligandima selektina najznačajniji su PSGL-1, CD44 i ESL-1 (Hidalgo i sar., 2007). Integrini su heterodimerni transmembranski proteini prisutni na svim ćelijama sisara. Integrini leukocita pripadaju  $\beta_2$  familiji integrina, u koje spadaju LFA-1 (CD11a/CD18) na svim cirkulišućim leukocitima i Mac-1 (CD11b/CD18) na mijeloidnim ćelijama (Schymeinsky i sar., 2007).

**Receptori za citokine** su receptori tipa I i II, uključeni u međućelijsku komunikaciju i regulaciju funkcije neutrofila. Receptori tipa 1 imaju 4- $\alpha$ -heliks i konzerviran ekstracelularni WSXWS motiv. U ovu grupu spadaju receptori za IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, G-CSF i GM-CSF. Receptori tipa 2 imaju 6- $\alpha$ -heliks bez WSXWS motiva. Ovoj grupi pripadaju receptori za IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  i inhibitorni IL-10 (Futosi i sar., 2013).

**Receptori za C-tip lektina** su specijalizovani za prepoznavanje tačno određenih struktura mikroorganizama. Najznačajniji receptori ovog tipa na neutrofilima su: Dectin-1 (gljivični  $\beta$ -glukan) (Taylor i sar., 2002; Kennedy i sar., 2007), Mincle (*Malassezia*, mikobakterije) (Yamasaki i sar., 2008; Ishikawa i sar., 2009) i MLD-1 (virusi) (Chen i sar., 2008).

**Toll-like receptori** (*Toll-like receptors*, TLR) se nalaze na/u membranama i pojedinim strukturama u okviru citosola ćelija uključenih u imunski odgovor (tabela 1). Ovi receptori precizno prepoznaju specifične domene na patogenima i pojačavaju inicijalni odgovor neutrofila, monocita i makrofaga (Moresco i sar., 2011).

Toll-like receptori pripadaju tipu I transmembranskih receptora i imaju sposobnost da prepoznaju odgovarajuće molekule u građi patogena tzv. molekulske obrasce povezane sa patogenom (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), čime doprinose aktivaciji mehanizama urođenog imuniteta (Akira i Takeda, 2004; Janeway i Medzhitov, 2002). Nalaze se u ćelijskoj membrani (TLR-1, 2, 4, 5, 6) i endozomu (TLR-3, 7, 8, 9, 12) (Kang i Lee, 2011; Singh i sar., 2012). Receptori prisutni u ćelijskoj membrani prepoznaju PAMP, dok oni koji su lokalizovani u pojedinim ćelijskim organelama primarno detektuju RNK/DNK patogena. Ispitivanja infekcija pojedinim protozoama (*Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*) su pokazala da se kod ovih mikroorganizama

kao PAMP najčešće identifikuje glikofosfatidil-inozitol (GPI) (Almeida i Gazzinelli, 2001; Campos i sar., 2001; Chandra i sar., 2010; Debierre-Grockiego i Schwarz, 2010; Gowda, 2007; Zhu i sar., 2011). Predstavnici roda *Plasmodium* aktiviraju TLR-2, TLR-4 i TLR-9 (Coban i sar., 2005; Coban i sar., 2010; Krishnegowda i sar., 2005; Naik i sar., 2000; Parroche i sar., 2007; Pichyangkul i sar., 2004; Zhu i sar., 2011), dok *Leishmania* spp. kod pasa aktivira TLR-2, TLR-3, TLR-4 i TLR-9 (Martinez-Orellana i sar., 2017b; 2018). Istraživanja ovog tipa nisu sprovedena na rodu *Babesia*.

Aktivacijom TLR otpočinje sinteza IL-12 što dovodi do oslobađanja IFN- $\gamma$  iz Th1 (Gee i sar., 2009). Prva istraživanja uloge TLR kod infekcije protozoama ukazala su na značaj receptora na površini ćelijske membrane (TLR-1, TLR-2, TLR-4 i TLR-6) i njihovo prepoznavanje GPI. U novije vreme, istraživanja su usmerena ka endozomalnim TLR, odnosno detekciji specifične nukleinske kiseline patogena (Ghosh and Stumhofer, 2013).

Tabela 1. Toll-like receptori na ćelijama koje učestvuju u imunskom odgovoru (Fouzder i sar., 2019).

Ćelija	Toll-like receptor
Neutrofilni granulocit	TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
Monocit/makrofag	TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
Mijeloidna dendritična ćelija	TLR 2, 3, 4, 7, 8
Plazmocitoidna dendritična ćelija	TLR 1, 6, 7, 9
Pomagački T limfocit	TLR 2, 3, 5, 9
Regulatorni T limfocit	TLR 2, 5, 8
B limfocit	TLR 1, 3, 6, 7, 9, 10
Mononuklearna ćelija periferne krvi	TLR 2, 4, 5, 7, 8, 9

## 2.5. Uloga citokina u imunskom odgovoru

Citokini su solubilni molekuli preko kojih ćelije komuniciraju. To su proteini molekulske mase manje od 30 kDa koji se vezuju za specifične receptore na membrani ciljnih ćelija, čime stimulišu aktivaciju signalnih puteva i promenu aktivnosti enzima i ekspresije gena. Oni regulišu intenzitet i trajanje imunskog odgovora time što stimulišu ili inhibiraju aktivaciju, proliferaciju i/ili diferencijaciju ćelija. Učestvuju u lučenju drugih citokina ili regulaciji stvaranja antitela i mogu da indukuju apoptozu ciljne ćelije. Citokini doprinose ekspresiji ćelijskih receptora za hemokine, druge citokine ili sebe same. Na osnovu odnosa između ćelije koja je izvor signala i one na koju taj signal treba da deluje, citokini se dele na endokrine (ćelije su međusobno udaljene, tako da se signal prenosi preko krvi), parakrine (ćelije su međusobno bliske) i autokrine (ćelija i luči i reaguje na signal) (Owen i sar., 2013b).

U citokine spadaju familija interleukina 1 (IL-1), hematopoetina (I klasa citokina), interferona (II klasa citokina), faktora nekroze tumora (*tumor necrosis factor*, TNF), interleukina 17 (IL-17) i hemokina.

**Familija interleukina 1** učestvuje u primarnom imunskom odgovoru. Ove citokine sintetišu monociti/makrofagi i dendritične ćelije. Zahvaljujući svojoj proinflamatornoj sposobnosti, pojačavaju propustljivost kapilara na mestu lučenja i stimulišu priliv leukocita na mesto infekcije/inflamacije. Njihovo sistemsko delovanje se ogleda u stimulaciji hepatocita da proizvedu proteine akutne faze (Arend i sar., 2008).

**Grupu hematopoetina** čine solubilni citokini koji stimuliraju proliferaciju T i B ćelija (IL-2), sintezu antitela (IL-6) i diferencijaciju Th ćelija (IL-4 i IL-12) (Griffin, 2008).

**Interferon tipa I** predstavljaju  $\alpha$  i  $\beta$  grupa interferona (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), koje luče aktivirani makrofagi, dendritične ćelije i ćelije inficirane virusima (Sadler i Williams, 2008).

**Interferon tipa II** je grupa citokina čiji je jedini predstavnik IFN- $\gamma$  (Schroder i sar., 2003). Sinteza i lučenje IFN- $\gamma$  je deo urođenog i stečenog imunskog odgovora i njegov značaj se ogleda u proinformatornom delovanju i učešću u eliminaciji intracelularnih patogena. Interferon  $\gamma$  je najpre identifikovan u kulturi aktiviranih T ćelija kao molekul sa svojstvima sličnim tada već poznatim interferonima tipa I, ali šireg opsega dejstva na ćelije i imunski odgovor u kojem učestvuju (Salvin i sar., 1973). Kasnije je pokazano da se od ostalih interferona razlikuje po građi i receptoru za koji se vezuje (Schroder i sar., 2003), a koji je eksprimiran je na svim ćelijama osim na eritrocitima (Mak i sar., 2006).

Glavni izvor IFN- $\gamma$  su CD4<sup>+</sup> Th1, CD8<sup>+</sup> Tc limfociti i NK ćelije (Bach i sar., 1997; Young, 1996), ali to mogu biti i B limfociti i APC, odnosno monociti, makrofagi i dendritične ćelije (Frucht i sar., 2001; Harris i sar., 2000). Proizvodnja IFN- $\gamma$  se odvija uz učešće IL-12 i IL-18, koji intenziviraju ovaj proces, dok su negativni regulatori IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  i glukokortikoidi (Schroder i sar., 2003).

Interferon  $\gamma$  stimuliše Th1 diferencijaciju direktno, odnosno posredno, tako što inhibira povećavanje Th2 populacija (Schroder i sar., 2003). Aktivacija makrofaga i fagocitoze odvija se uz učešće IFN- $\gamma$  i praćena je sintezom i lučenjem proinformatornih citokina. Takođe, IFN- $\gamma$  doprinosi lučenju reaktivnih jedinjenja kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnih jedinjenja azota (*reactive nitrogen species*, RNS) (Schroder i sar., 2003). Interferon  $\gamma$  reguliše ekspresiju MHC molekula klase I i II na različitim ćelijama i prilagođava ekspresiju proteina B7 na APC (Griffin i sar., 2008) i Fc receptora na fagocitima, što pospešuje prepoznavanje opsonizovanih mikroorganizama. Pored navedenog, IFN- $\gamma$  reguliše sintezu imunoglobulina u plazma ćelijama (Griffin i sar., 2008).

**Familija citokina faktora nekroze tumora** reguliše razviće i funkciju efektorskih i homeostazu ćelija kostno-mišićnog, nervnog i imunskog sistema. Faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je solubilni, proinformatorni citokin, koji se luči kao odgovor na oštećenje tkiva i stresogene signale iz okruženja. Primarno ga sintetišu aktivirani makrofagi, a u manjoj meri limfociti, fibroblasti i keratinociti. Faktor nekroze tumora  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), poznatiji kao limfotoksin, sintetišu aktivirani limfociti (Pfeffer, 2003).

**Familija interleukina 17** uključuje citokine novijeg datuma, u koje spadaju IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D i IL-17F. Njihovi receptori su smešteni na neutrofilima i učestvuju u inflamatornom odgovoru (Gaffen, 2009).

**Hemokini** su citokini male molekulske mase (8-15 kDa), koji se luče konstitutivno ili inducibilno. Interakcija između citokina i odgovarajućeg receptora na ćeliji menja ekspresiju adhezivnih molekula i receptora za hemokine, što ima hemotaksu kao posledicu (Rot i von Andrian, 2004). Kao posrednici u hemotaksi, hemokini preko GPCR regrutuju neutrofile, monocite i limfocite (Griffin, 2008). Dodatno, hemokini regulišu hematopoezu, angiopoezu, tkivno remodelovanje i organogenezu (Raman i sar., 2011). Na osnovu broja i pozicije rezidue cisteina na N-terminalnom kraju molekula, hemokini su svrstani u četiri podgrupe:  $\alpha$  (CXC),  $\beta$  (CC),  $\gamma$  (C) i  $\delta$  (CX3C) (Rollins, 1997). Za leukocite su najvažniji  $\alpha$  i  $\beta$  hemokini (Naruse i sar., 1996).

**Interleukin 8** spada u CXC familiju hemokina i glavni je hemoatraktant za neutrofilne granulocite. On se vezuje za svoje CXCR1 i CXCR2 receptore na neutrofilima, T limfocitima, monocitima/makrofagima, eozinofilima, bazofilima, keratinocitima i endotelnim ćelijama (Strieter i sar., 2006). Receptori za IL-8 pripadaju GPCR tipu i oba imaju sposobnost da izazovu promenu koncentracije kalcijuma u citosolu i oslobađanje sadržaja granula neutrofila, ali samo vezivanje za CXCR2 ima za posledicu oksidativni prasak (Mak i sar., 2006).

Interleukin 8 je najpre izolovan iz kulture stimulisanih humanih mononukleara, ali je kasnije pokazano da i druge ćelije mogu da ga luče (Mukaida i Matsushima, 1998). Glavni izvor IL-8 su monociti, alveolarni makrofagi, limfociti, fibroblasti i endotelne ćelije (Gessler i sar., 2003). Proinflamatorni citokini poput TNF, IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  indukuju sekreciju IL-8 iz svih ćelija, dok npr. lipopolisaharidi podstiču isključivo fagocitne i endotelne ćelije na lučenje IL-8 (Zwahlen i sar., 1993). Iako neutrofilni granulociti nisu značajan izvor IL-8, pokazano je da *in vitro* stimulacija lipopolisaharidom ili zimozanom povećava sposobnost neutrofila da proizvodi IL-8 (Altstaedt i sar., 1996). Nakon kontakta sa TNF, IL-1 i/ili bakterijskim endotoksinom, većina ćelija ima sposobnost da sintetiše i luči IL-8, čime se postiže da, ukoliko dođe do povrede tkiva, organizam u svakom momentu može da obezbedi priliv neutrofilnih granulocita na mesto infekcije/inflamacije.

Interleukin 8 reguliše ekspresiju CD11b i CD18 receptora za komplement na površini neutrofilnih granulocita i povećava afinitet CD18 (Detmeres i sar., 1990). Pored hemotakse, IL-8 stimuliše neutrofile na oslobađanje lizozomalnih enzima i respiratorni prasak (Peveri i sar., 1988). Pod uticajem IL-8, raste nivo kalcijuma u citosolu monocita i oslobađaju se ROS (Mak i sar., 2006). Takođe, privlači eozinofile i učestvuje u angiogenezi (Petering i sar., 1999).

**Monocitni hemoatraktantni protein 1** (*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) spada u CC hemokine i reguliše migraciju i infiltraciju monocita i makrofaga, T ćelija pamćenja i NK ćelija (Deshmane i sar., 2009). Preko svog receptora (CCR2) podstiče migraciju monocita kroz krvotok kao odgovor na inflamaciju. Lučenje MCP-1 može biti konstitutivno ili inducibilno usled oksidativnog stresa, delovanja drugih citokina i/ili faktora rasta (Deshmane i sar., 2009). Monociti i makrofagi su glavni izvor MCP-1 (Yoshimura i sar., 1989), ali ga takođe proizvode i endotelne ćelije, fibroblasti, glatkomišićne, mikroglijalne ćelije i astrociti (Deshmane i sar., 2009).

Pored toga što usmerava monocite ka mestu inflamacije (Ajuebor i sar., 1998), MCP-1 se dovodi u vezu i sa T ćelijaskim imunitetom. Eksperimentano je pokazano da su CCR2-deficijentni miševi imali poremećenu migraciju monocita i Th1 odgovor (Boring i sar., 1997; Kuziel i sar., 1997; Traynor i sar., 2002) i bili su prijemčiviji za infekcije intracelularnim patogenima (Kurihara i sar., 1997). Premda ostali hemokini CC podgrupe doprinose diferencijaciji Th1 ćelija (Van Coillie i sar., 1999), MCP-1 učestvuje u polarizaciji Th0 ćelija u Th2 fenotip (Gu i sar., 2000). Ekspresija i povišena koncentracija MCP-1 su u vezi sa intenzivnijim Th2 odgovorom (Chensue i sar., 1995; Handel i sar., 1996; Karpus i sar., 1997), a sam MCP-1 pospešuje sekreciju IL-4 iz T ćelija (Karpus i sar., 1997).

Proinflamatorni citokini i hemokini su neophodni za pokretanje inflamatornog odgovora (Morais Fernandes i sar., 2008) i stvaranje uslova za transendotelnu migraciju leukocita. Od posebnog značaja su TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , zato što stimulišu sintezu i lučenje drugih citokina, poput IL-6 i IL-8 (Kany i sar., 2019). Regulacija prekomernog lučenja ovih molekula je pod kontrolom antiinflamatornih citokina – IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$  (Loisa i sar., 2003). Kod infekcije protozoama *Plasmodium berghei* i *Plasmodium chabaudi* utvrđene su povišene koncentracije TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-18 i MCP-1 i pokazana je njihova povezanost sa komplikovanom formom bolesti i smrtnim ishodom (Deroost i sar., 2013). Nekonrolisana proizvodnja proinflamatornih citokina, odnosno poremećena ravnoteža u pro i antiinflamatornom odgovoru može da odredi tok bolesti i izazove SIRS. Kod pasa koji su akutno inficirani *B. canis* postoji veza između povišene serumske koncentracije MCP-1 i sepse (Galan i sar., 2018). Takođe, isti autori su pokazali i povišenu koncentraciju IL-8 u serumu pasa pozitivnih na *B.*

*canis*, suprotno literaturnim podacima za ponašanje ovog citokina kod infekcije *B. rossi*, kada je došlo do pada nivoa IL-8, što može biti posledica veće virulencije uzročnika i slabijeg proinflatornog odgovora domaćina (Goddard i sar., 2016).

Nakon što dobiju signal da postoji infekcija i/ili tkivno oštećenje, neutrofilu napuštaju cirkulaciju. Proces započinje vezivanjem i kotrljanjem niz inflamirani endotel (Ramaij i Jaeschke, 2007). Zahvaljujući odgovarajućim hemoatraktantima, neutrofilu adheriraju na površinu endotela, nakon čega dolazi do transmigracije između ili kroz endotelne ćelije (Bainton i sar., 1971).

**Hemotaksa** je mehanizam kojim se kontroliše pravac/smer i brzina kretanja ćelija shodno gradijentu koncentracije signalnih molekula (Gangur i sar., 2002; Ono i sar., 2003). Receptori na površini ciljnih ćelija vezuju faktore hemotakse čime se ćelija usmerava ka izvoru signala. Leukociti prepoznaju hemokine posredstvom GPCR lokalizovanih na membrani ćelija. Nakon što se za njega veže odgovarajući hemokin, receptor menja svoju konformaciju i prelazi u aktivno stanje. Leukociti se do izvora signala kreću ameboidnim tipom kretanja, formiranjem protruzija na polu koji je bliži izvoru signala. U zavisnosti od same ćelije i prirode hemoatraktanta, protruzije mogu biti tanke do končaste – filopodije, i nalik listu – lameliopodije. Putem protruzija na vodećem polu, leukociti obgrle svoju metu i privremeno se vezuju za odgovarajući supstrat. Aktin i miozin uzrokuju kontrakciju i reorganizaciju citoskeleta, tako da se ostatak ćelije pomera ka vodećem polu. Distribucija „zauzetih“ receptora je asimetrična, a signal poreklom od hemokina je najjači na onom polu koji je najbliži izvoru (Owen i sar., 2013b).

## 2.6. Mehanizam fagocitoze i oksidativnog praska u neutrofilnim granulocitima i monocitima/makrofagima

Fagocitoza je ćelijski proces koji omogućava trajno uklanjanje mikroorganizama i ćelija zahvaćenih apoptozom iz tkiva domaćina, zahvaljujući fagocitnoj sposobnosti neutrofilnih granulocita i monocita/makrofaga (Owen i sar., 2013c). Fagocitna sposobnost leukocita, odnosno neutrofila, zasniva se na sposobnosti njihovih receptora da prepoznaju specifične patogene ili medijatore inflamacije (C5a komponenta komplekta, IL-8) i započnu proces fagocitoze (Chen i Junger, 2012).

Svi mikroorganizmi imaju PAMP, bez obzira na to da li su patogeni ili ne. Njih prepoznaju receptori za prepoznavanje obrasca (*pattern recognition receptors*, PRR) koji se nalaze na fagocitnim ćelijama (Takeuchi i Akira, 2010). Ovi receptori mogu da identifikuju i mrtve, odnosno ćelije koje umiru, na osnovu molekulskih obrazaca udruženih sa oštećenjem/opasnošću (*damage/danger-associated molecular patterns*, DAMP) (Tang i sar., 2012). Fagocitoza je glavni mehanizam uklanjanja ćelija zahvaćenih apoptozom usled remodelovanja tkiva, zamene starih ćelija novim kao i tumorskih i ćelija inficiranih patogenima, bez obzira na to da li se time aktivira urođeni ili stečeni imunski odgovor. Kao glavni celularni „čistači“ u organizmu, makrofagi koriste svoje receptore i za uklanjanje ćelijskog debris, dotrajalih eritrocita, ćelija koje su umrle usled oštećenja i toksičnih stimulusa (ćelijska nekroza) ili kao posledica apoptoze. Fagocitoza takođe može otpočeti indirektno, tako što fagociti prepoznaju rastvorljive proteine tzv. opsonine, koji su obložili površinu patogena. Opsonini mogu da intenziviraju fagocitozu i da prepoznaju pojedine rastvorljive PAMP (Owen i sar., 2013c).

Vezivanje patogena za fagocite na jedan od navedenih načina pokreće signalne puteve. Polimerizacijom aktina menja se oblik fagocita, tako da mogu da obuhvate stranu ćeliju i internalizuju je. Novonastali fagozom se spaja sa lizozomom, a u neutrofilima i sa primarnim i sekundarnim granulama i formira fagolizozom. Sredina u fagolizozomu je najčešće niske pH vrednosti i bogata antimikrobnim supstancama, poput proteina i peptida, hidrolitičkih enzima i molekula koji posreduju u oksidativnim procesima (Uribe-Querol i Carlos, 2017). U fagolizozomu, patogeni podležu digestiji pod dejstvom proteolitičkih enzima, ROS i RNS (Peyron Maridonneau-Parini i Stegmann, 2001).



Sadržaj primarnih granula neutrofila omogućava aktiviranje fagocitnih mehanizama zavisnih od kiseonika. Oni su inicirani samom fagocitozom ili promjenama ćelijske membrane, a zavise od NADPH oksidaze koja indukuje redukciju molekula kiseonika do superoksidnog anjona. Ovaj proces je poznat kao oksidativni ili respiratorni prasak (Adrian i sar., 2013; Dahlgren i Karlsson, 1999). Oksidativni prasak je jedan od osnovnih odbrambenih mehanizama urođenog imuniteta i predstavlja funkcionalni odgovor neutrofilnih granulocita na fagocitozu i prisustvo solubilnih agonista (Chen i Junger, 2012). Fagocitoza je praćena povećanom potrošnjom kiseonika preko NADPH oksidaze, kada nastaju reaktivni molekuli kiseonika: superoksidni anjonski radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot-}$ ). Superoksid i vodonik-peroksid su ROS koji imaju ključnu ulogu u odbrani od patogena (Kaplan i sar., 2008). Finalni proizvod oksidativnog praska je reaktivni kiseonik koji stupa u reakciju sa nezasićenim mastima, nukleinskim kiselinama, pirimidinskim nukleotidima i proteinima (Richard i sar, 1990; Takeda i sar, 1989). Međutim, s obzirom na to da su proizvodi oksidativnog praska toksični i za ćelije domaćina, neophodno je sadejstvo mehanizama antioksidativne zaštite (Halliwell, 1994).

## 2.7. Osnovni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u krvi

Predstavnici roda *Babesia* oštećuju eritrocite posredstvom različitih mehanizama koji dovode do disbalansa redoks homeostaze (Boozer i Macintire, 2003). Aktivirani neutrofil i monociti eliminišu patogene, što je praćeno povećanom potrošnjom kiseonika (Gougerot-Pocidallo i sar., 1989; Winterbourn i sar., 2016). Oksidativni stres je posledica poremećene ravnoteže između aktivnosti ROS i sistema antioksidativne zaštite (Halliwell, 1994). Kiseonik je finalni akceptor elektrona u mitohondrijalnom transportu, pri čemu nastaju toksični metaboliti koji prelaze u citosol i izazivaju ćelijsko oštećenje (Phillips i sar., 2003). Reaktivna kiseonikova jedinjenja direktno oštećuju ćeliju time što indukuju lipidnu i proteinsku peroksidaciju i promene nukleinskih kiselina (Richard i sar, 1990; Takeda i sar., 1989).

Pored mitohondrija, endogeni izvori ROS mogu biti i endoplazmatski retikulum, peroksizomi i ćelijska membrana (Moldovan i Moldovan, 2004). Reaktivna jedinjenja kiseonika mogu nastati kao odgovor organizma na infekciju, delovanje toksina i ultraljubičastog i/ili jonizujućeg zračenja. Ne mogu se detektovati direktno, zbog toga što je većina ovih molekula kratkoživeća i veoma reaktivna. Oksidativno oštećenje se meri određivanjem koncentracije/aktivnosti sekundarnih proizvoda, derivata aminokiselina, nukleinskih kiselina i lipida (Kohen i Nyska, 2002).

Lipidna peroksidacija najčešće nastaje pod nespecifičnim uticajem hidroksilnog radikala ( $OH^{\cdot-}$ ) i hidroperoksila ( $HO_2^{\cdot-}$ ) (Halliwell i Gutteridge, 1984). Hidroksilni radikal je proizvod Fentonove reakcije, u kojoj slobodno gvožđe ( $Fe^{2+}$ ) reaguje sa vodonik-peroksidom ili Haber-Weissove reakcije, u kojoj superoksid reaguje sa feri jonom ( $Fe^{3+}$ ) i nastaje  $Fe^{2+}$ . Pored redoks ciklusa koji uključuje gvožđe, metali poput bakra, nikla, kobalta i vanadijuma takođe mogu indukovati nastanak  $OH^{\cdot-}$  u ćelijama. Hidroperoksil je protonizovani superoksid i izvor vodonik-peroksida, koji dalje reaguje sa gvoždem ili bakrom i nastaje  $OH^{\cdot-}$ . Hidroperoksil ima veća oksidativna svojstva od superoksida i može da započne lančanu oksidaciju nezasićenih fosfolipida, što za posledicu ima poremećaj funkcije ćelijske membrane (Bielski i sar., 1983; Browne i Armstrong, 2000; Schneider i sar., 2008).

Lipidi su biomolekuli podložni oksidativnom stresu, čijom oksidacijom nastaju brojni sekundarni proizvodi, među kojima je glavni malondialdehid (MDA). Kao izrazito genotoksičan molekul, interakcija MDA sa DNK i proteinima praćena je mutagenim promjenama i nastankom tumora (Del Rio i sar., 2005). Pored MDA, lipidnom peroksidacijom nastaju propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (Esterbauer i Zolliner, 1989; Esterbauer i sar., 1991).

Glavni izvor MDA u ćelijama su nezasićene masne kiseline (Del Rio i sar., 2005). Kao biomarker peroksidacije omega-3 i omega-6 masnih kiselina, određuje se u reakciji tiobarbiturnom kiselinom (Esterbauer i Cheeseman, 1990; Pryor, 1989). Malondialdehid može nastati usled konverzije metil linoleata u endoperoksidaze (Frankel i Neff, 1983; Pryor i Stanley, 1975); sukcesivne geneze hidroperoksida i hidroperoksaldehida kao međuproizvoda (Esterbauer i sar., 1991); u metaboličkim putevima u kojima učestvuju prostaglandini (Hecker i Ullrich, 1989).

*In vitro* studija koju su sproveli Murase i sar. (1996) je ukazala na povećanu koncentraciju methemoglobina i MDA u eritrocitima pasa pozitivnih na *B. gibsoni*. Povišena koncentracija MDA je pokazana kod infekcije *B. bigemina* (Saleh, 2009), *B. divergens* (Dkhil i sar., 2013), *B. gibsoni* (Chaudhuri i sar., 2008) i koinfekcije *B. gibsoni* i *Ehrlichia canis* (Kumar i sar., 2006). Infekcija pasa *B. canis* je praćena povišenim koncentracijama MDA u serumu (Crnogaj i sar., 2010) koja je u korelaciji sa ishodom bolesti (Crnogaj i sar., 2015).

Oštećenje proteina, koje u svojoj osnovi ima oksidativni proces, praćeno je sniženim vrednostima tiola, zbog snižene antioksidativne sposobnosti (Hu, 1994; Reznick i Packer, 1994). Tiol-disulfidna homeostaza je značajan biomarker oksidativnog oštećenja: povišenje disulfidne komponente ukazuje na oksidativni stres, a povišenje nivoa tiola ukazuje da antioksidativni mehanizmi uspešno neutrališu ROS (Bal i sar., 2016; Erel i Neselioglu, 2014).

Tioli su organska komponenta antioksidativne kaskade. Oksidacija tiola je praćena formiranjem reverzibilnih disulfidnih veza, koje se smatraju ranim indikatorom oksidativnog stresa (Erel i Neselioglu, 2014). Dinamika oksidacije tiola i redukcije disulfidnih veza osim indikativnog karaktera oksidativnog stanja ćelije, značajna je i za aktivaciju mehanizama antioksidativne zaštite, detoksikaciju i apoptozu ćelije, kao i za transkripciju i prenošenje ćelijskih signala (Sönmez i sar., 2018). Tioli se kao parametar redoks homeostaze mogu posmatrati zbirno ili evaluacijom pojedinačnih molekula koji imaju slobodnu SH grupu u redukovanom, odnosno disulfidne mostove u oksidovanom obliku (AltIparmak i sar., 2016). Poremećena tiol-disulfidna ravnoteža karakteristična je za dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, tumore i bolesti bubrega kod ljudi (AltIparmak i sar., 2016; Ates i sar., 2016; Dirican i sar., 2016; Yardim-Akaydin i sar., 2004). Kod tajlerioze konja i lajšmanioze pasa je pokazan pad nivoa tiola usled intenzivnijeg nastanka slobodnih radikala (Radaković i sar., 2016; Rubio i sar., 2016).

Antioksidativni sistem omogućava ćeliji da spreči nastanak i/ili popravi oštećenje nastalo delovanjem ROS. Glavni enzimi, koji imaju antioksidativno dejstvo, su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) (Ames i sar., 1993). Superoksid dismutaza generiše vodonik-peroksid i molekularni kiseonik iz superoksidnog radikala, a CAT i GPx preuzimaju i dalje razgrađuju vodonik-peroksid. Pored enzima, antioksidativnu ulogu imaju i vitamini (A, C, E), selen, transferin i laktoferin (Sardesai, 1995).

Katalaza je antioksidativni enzim koji razlaže vodonik-peroksid na kiseonik i vodu i najaktivniji je u peroksizomima (Deisseroth i Dounce, 1970). Na osnovu strukturnih razlika, identifikovane su tri forme ovog enzima. Najčešća je monofunkcionalna forma koja u sebi sadrži hem i karakteristična je za sve aerobne organizme. Bifunkcionalna katalaza-peroksidaza takođe sadrži hem, ali je manje zastupljena. Treća forma je specifična po tome što sadrži mangan umesto hema (Nandi i sar., 2019).

Glutation peroksidaza je citosolni selenoprotein, značajan za očuvanje hemoglobina od oksidativne degradacije u eritrocitima (Mills, 1957). Lipidni peroksidi se uklanjaju mehanizmima koji aktiviraju GPx (Flohe, 1971), čime se sprečava oštećenje ćelijske membrane koje može da nastane usled delovanja ovih metabolita (Hafeman i sar., 1974). Glutation redoks ciklus učestvuje u redukciji intracelularnih hidroperoksidaza. Za maksimalni učinak GPx, neophodno je sadejstvo drugih enzima (glutation reduktaza, glukozo-6-fosfat dehidrogenaza) i kofaktora (redukovani glutation, NADPH,

glukoze-6-fosfat) (Waydert i Cullen, 2009). Postoji pet GPx izoenzima, a za uklanjanje vodonik-peroksida najzaslužniji je GPx-1 (Hann i sar., 1998).

Antioksidativna zaštita od infekcija protozoama u humanoj i veterinarskoj medicini je praćena sniženjem aktivnosti antioksidativnih enzima – malarija kod ljudi (Erel i sar., 1997; D'Souza i sar., 2009), tajlerioza konja i goveda (Asri Rezaei i sar., 2006; Radaković i sar., 2016) i babezioza ovaca (Esmailnejad i sar., 2014). Istraživanja Crnogaj i sar. (2017) su pokazala snižene vrednosti SOD, CAT i GPx u krvi pasa pozitivnih na *B. canis*. Nasuprot tome, Otsuka i sar. (2001) su saopštili povišene vrednosti SOD u eritrocitima pasa inficiranih *B. gibsoni*.

**Mehanizmi antioksidativne zaštite opisani kod protozoa:** Paraziti koda Apicomplexa imaju razvijene antioksidativne mehanizme kojima se štite od ROS nastalih u ćelijama domaćina. Glutaredoksin i tioredoksin sistemi regulišu redoks status ćelije i ponašaju se kao tiolni/disulfidni parovi (Bosch i sar., 2015). Glutathion/glutathion disulfid je glavni redoks par, a tioredoksin par je sporedna komponenta koja kontroliše antioksidativni kapacitet ćelije (Jones i Go, 2010). Glutaredoksin koristi redukcionu sposobnost glutathiona za katalizu disulfidnih redukcija. Tioredoksin reguliše redukciju ribonukleotida i uklanja vodonik-peroksid (Arnér i Holmgren, 2000; Nordberg i Arnér, 2001). Peroksiredoksin, komponenta antioksidativne zaštite, indukuje konverziju peroksida i alkil hidroperoksida u vodu ili odgovarajući alkohol (Hofmann i sar., 2002).

Zahvaljujući posebnom parazitskom antioksidativnom sistemu, *Babesia* spp. odolevaju toksičnom uticaju ROS u eritrocitima sisara (Becker i sar., 2000; Müller i sar., 2003; Regner i sar., 2014). Odbrambeni mehanizmi *B. bovis* uključuju tioredoksin sistem (Regner i sar., 2014), dok je peroksiredoksin sistem pokazan u merozoitima *B. bovis* i *B. gibsoni* (Masatani i sar., 2014; Tanaka i sar., 2009).

## 2.8. Uloga proteina akutne faze u antioksidativnoj zaštiti

Odgovor akutne faze (*acute phase response*, APR) je kompleksan sistem koji se aktivira kao reakcija na traumu, stres, inflamaciju, infekciju i tumore. Glavni nosioci APR su proteini akutne faze (*acute phase proteins*, APPs) koji pomažu mehanizmima urođenog imuniteta u uklanjanju mikroorganizama i reparaciji tkiva (Cray i sar., 2009). Proteini akutne faze se sintetišu u hepatocitima, a njihova povišena ili snižena koncentracija, odnosno aktivnost, služe kao marker infekcije, autoimunih i malignih bolesti (Eckersall, 1995; Kushner i Mackiewicz, 1993). Pojedini APP su značajni markeri redoks homeostaze.

U zavisnosti od toga da li njihov nivo raste ili opada tokom APR, APP su podeljeni na pozitivne i negativne. Albumin je glavni negativni APP, čija snižena koncentracija može nastati usled smanjene sinteze u hepatocitima ili kao posledica gubitka usled gastrointestinalnih ili promena u bubrezima (Schetters i sar., 2009).

Glavni pozitivni APP mogu u toku 48h da povećaju svoju koncentraciju 10-100 puta i uglavnom imaju kratak poluživot (Johnson i sar., 1999). Umereni i sporedni APP sporije povećavaju svoju koncentraciju i ona se može održati u krvi i do nekoliko dana. Koncentracija umerenih proteina povećava se 2-10 puta, dok sporedni APP pokazuju porast manji od dvostrukog. Obe grupe APP često služe i kao markeri hronične inflamacije (Ceron i sar., 2005).

U veterinarskoj medicini, prva istraživanja proteina u serumu životinja sprovedena su sredinom 20. veka, međutim, tek je devedestih godina prošlog veka njihova analiza dobila širu primenu u praksi, nakon što je za pojedine proteine dokazan dijagnostički i prognostički značaj (Ceron i sar., 2005; Murata i sar., 2004; Petersen i sar., 2004).

**Ceruloplazmin (CER)** je umereni pozitivni APP koji se u cirkulaciji održava nekoliko dana. Sintetiše se u hepatocitima i pripada  $\alpha_2$  globulinima (Gutteridge i sar., 1981). Ceruloplazmin je glavni prenosilac bakra u plazmi (Goldstein i sar., 1982) i ima ulogu u zaštiti tkiva od štetnih metabolita koje oslobađaju fagociti tokom inflamacije (Halliwell i Gutteridge, 1990). Svoju antioksidativnu ulogu prvenstveno ostvaruje inhibicijom nastanka reaktivnih derivata bakra i uklanjanjem vodonik-peroksida i superoksida (Samokyszyn i sar., 1989).

Holmberg i Laurell (1947) su pokazali slabu oksidaznu aktivnost CER i afinitet ka polifenolima, aromatičnim poliaminima, askorobatu, hidroksilaminu i tioglikolatu. Osaki i sar. (1966) su istakli fiziološku feroksidaznu ulogu CER i time objasnili vezu između poremećaja u metabolizmu gvožđa i bakra. U vodenim rastvorima, gvožđe može biti u fero i feri valentnom stanju. Pri fiziološkom pH, autooksidacija fero u feri oblik bi kao posledicu imala stabilizaciju gvožđa. Međutim, najčešće dolazi do hidrolize feri soli i nastanka nerastvorljivih hidoksida i oksihidoksida. Evolucijom je uspostavljen mehanizam kojim je omogućen transport gvožđa u feri obliku. Feroksidazna aktivnost CER se zasniva oksidaciji fero jona prilikom vezivanja za transferin. Elektron sa fero jona se preko bakra premešta na kiseonik, pri čemu nastaje molekul vode, a gvožđe prelazi u feri oblik i kao takav se prenosi transferinom.

Postoji nekoliko mehanizama koji objašnjavaju antioksidativnu ulogu CER u serumu. To su uklanjanje superoksida i drugih ROS (Goldstein i sar., 1979), inhibicija Fentonove reakcije konverzijom fero u feri oblik preko feroksidativne aktivnosti (Samokyszyn i sar., 1989), inhibicija oksidacije lipida (Gutteridge i sar., 1980; Stocks i sar., 1974), sprečavanje oštećenja DNK (Gutteridge i sar., 1980) i zaštita ćelije od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima i lizom (Løvstad, 1982). Međutim, pojedina istraživanja su pokazala da CER može stimulisati oksidaciju lipida, pre svega *in vitro*, pri jednakoj koncentraciji fero i feri jona, delimičnoj konverziji fero u feri jon i sniženoj ili fiziološkoj koncentraciji CER u serumu (Ehrenwald i sar., 1994; Swain i sar., 1994).

Ceruloplazmin je važan APP kod pasa (Martinez-Subiela i sar., 2001). Pokazano je da se određivanjem koncentracije CER može pratiti efikasnost terapije protiv lajšmanioze pasa (Martinez-Subiela i sar., 2003). Psi sa akutnom babezozom takođe imaju povišenu koncentraciju CER (Beletić i sar., 2021; Ulutas i sar., 2005).

**Haptoglobin (HPT)** je umereni pozitivni APP koji pripada  $\alpha_2$  globulinima i ima antiinflamatorno, antioksidativno i imunomodulatorsko dejstvo (Quaye, 2008). Sintetiše se u hepatocitima pod uticajem nespecifičnih stimulusa poput inflamacije, primene kortikosteroida i zračenja u terapiji (Jones i Mould, 1984). Formira stabilan kompleks sa hemoglobinom (HGB-HPT) (Travis i sar., 1970) i uklanja ga iz krvi čime sprečava oksidativna oštećenja indukovana viškom gvožđa (Lim i sar., 2001).

Slobodan HPT je pozicioniran bliže anodnoj strani  $\alpha_2$  regiona, dok HGB-HPT zauzima katodnu stranu  $\alpha_2$  regiona (Abbate i sar., 2000). Prilikom elektroforeze seruma poreklom od pacijenata sa različitim patogenezaama bolesti, odnosno seruma u koji je „dodat“ slobodan hemoglobin, detektovana je još jedna traka u okviru  $\alpha_2$  regiona, ispod ili iznad HGB-HPT kompleksa (Abbate i sar., 2000). S obzirom na to da je hemoliza karakterističan nalaz kod pasa inficiranih babezijom, signal je često praćen i širim  $\alpha_2$  regionom na gelu. Tothova i sar. (2020) su detektovali udvojenu  $\alpha_2$  frakciju koja je bila dominantno prisutna kod pasa inficiranih *B. gibsoni* (više od 50%) u odnosu na *B. canis* (15% ukupnog broja). Iako spada u pozitivne APP, Ulutas i sar. (2005) su pokazali da je kod babezioze pasa došlo do smanjenja koncentracije HPT zbog intenzivne hemolize. Nasuprot tome, Matijatko i sar. (2007) su pokazali da je zapaljenski karakter infekcije *B. canis* reflektovan kroz porast koncentracije HPT.

**Paraoksonaza 1 (PON-1)** je predstavnik tročlane familije enzima koji učestvuju u urođenom imunskom odgovoru, zaštiti od lipidne peroksidacije, razgradnji reaktivnih jedinjenja i regulaciji proliferacije i apoptoze ćelija (Ceron i sar., 2014). Paraoksonaza 1 se primarno sintetise u jetri i dominantno je prisutna u serumu, gde je vezana za lipoproteine velike gustine (*high density lipoproteins*, HDL) (Mackness i sar., 1991). Paraoksonaza 2 (PON-2) je celularna, a paraoksonaza 3 (PON-3) komponenta seruma i u odnosu na PON-1 zastupljena je u znatno manjoj meri (Draganov i sar., 2000).

Paraoksonaza 1 je negativni APP (Novak i sar., 2010) i biomarker oboljenja jetre (Mogarekar i Talekar, 2013). Antioksidativna uloga PON-1 se ogleda kroz povišenu aktivnost, odnosno sprečavanje lipidne peroksidacije (James, 2007). Paraoksonaza 1 hidrolizuje vodonik-peroksid, koji u prisustvu jona gvožđa može da nagradi hidroksilni radikal (Halliwell i Gutteridge, 1984). Kod trovanja organofosfatima, PON-1 ima zaštitnu ulogu. Psi akutno inficirani babezijom pokazali su nižu aktivnost PON-1 u odnosu na zdrave pse (Kuleš i sar., 2016; Milanović i sar., 2020).

Paraoksonaza 1 ima afinitet prema različitim supstratima, na osnovu čega se može govoriti o paraoksonaznoj (supstrat: paraokson), arilesteraznoj (supstrat: fenil acetat, 4-nitrofenil acetat) ili laktonaznoj (supstrat: 5-tiobutil butirolakton) aktivnosti (Ceron i sar., 2014). Analiziranjem razlika u aktivnosti PON-1 kod pasa sa oksidativnim oštećenjem i zdravih pasa, najveća značajnost u rezultatima pokazana je kada se koristio 4-nitrofenil acetat kao supstrat (Tvarijonavičute i sar., 2012).

**Značaj primene tehnike agarozne elektroforeze u identifikovanju proteinskih frakcija:** Metoda elektroforeze proteina seruma (*serum protein electrophoresis*, SEP) se primenjuje u humanoju i veterinarskoju dijagnostici poslednjih pedeset godina. Služi za potvrdu akutnih i hroničnih zapaljenskih procesa, kao i humoralnog imunskog odgovora. Vizuelni prikaz SEP je elektroforezogram na kojem su jasno izdvojene frakcije albumina,  $\alpha$  ( $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ ),  $\beta$  ( $\beta_1$  i  $\beta_2$ ) i  $\gamma$  globulina (Kaneko, 1997). Apsolutne koncentracije (g/L) pojedinačnih frakcija izračunavaju se množenjem njihove relativne zastupljenosti (%) i koncentracije ukupnih proteina u serumu. U okviru globulinskih frakcija, služeći se preciznijim i osetljivijim metodama, moguće je pozicionirati konkretnu proteinsku traku u okviru frakcije (npr. *high-resolution electrophoresis*, HRE; *immunofixation electrophoresis*, IFE) (Abbate i sar., 2000). Promenjena koncentracija  $\alpha_1$  globulina može biti posledica promena u nivou  $\alpha_1$  antitripsina i/ili  $\alpha_1$  kiselog glikoproteina;  $\alpha_2$  frakcija uključuje  $\alpha_2$  makroglobulin, CER i HPT;  $\beta$  globulini obuhvataju transferin, serum amiloid A (SAA), fibrinogen i C reaktivni protein (CRP);  $\gamma$  globuline prvenstveno čine imunoglobulini G (IgG) (Kaneko, 1997). Kod pasa su od dijagnostičkog značaja povišeni CRP i SAA kao glavni APP, a među umerenim APP indikativni su  $\alpha_1$  kiseli glikoprotein, CER i HPT (Cray i sar., 2009). Psi inficirani *B. canis* imaju snižene ukupne proteine i albumin i povišene globulinske frakcije. Tohtova i sar. (2019) su pokazali značajno povišenu  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  i  $\beta_2$  frakciju, a Asawakarn i sar. (2021) su to potvrdili samo za  $\beta_2$  frakciju proteina u serumu pasa pozitivnih na *B. canis*.

## 2.9. Uloga matriks metaloproteinaza u inflamatornom odgovoru

Matriks metaloproteinaze (MMP) su grupa strukturno i funkcionalno sličnih endopeptidaza, koje se nalaze u ćelijama u latentnom obliku i po potrebi izlučuju u ekstracelularni prostor (Fingleton, 2017). Primarna uloga MMP je razgradnja ekstracelularnog matriksa i njegovih komponenata, pre svega kolagena, laminina i fibronektina. Osim toga, MMP učestvuju u odgovoru imunskog sistema tako što regulišu aktivnost citokina, hemokina i hormona (Manicone i McGuire, 2008).

Matriks metaloproteinaze spadaju u metaloproteinaze koje imaju  $Zn^{2+}$  u svom aktivnom centru (Sternlicht i Werb, 2001). Strukturni domeni MMP uključuju signalni peptid, propeptid i katalički domen. Domen propeptida sadrži reziduu cisteina koja je vezana za  $Zn^{2+}$ , čime se enzim održava u neaktivnoj konformaciji sve dok se ova veza ne raskine. Raskidanje veze između propeptidnog i

katalitičkog domena proteolitičkim uklanjanjem ili oksidacijom prodomena omogućava prelazak iz latentne u aktivnu formu (Khokha i sar., 2013; Page i sar., 2007; Parks i sar., 2004; Visse i Nagase, 2003). Aktivnost MMP je pod kontrolom tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) (Nagase i sar., 2006) i  $\alpha 2$  makroglobulina (Curry i sar., 1990).

Matriks metaloproteinaze su numerisane prema redosledu otkrivanja, a klasifikovane na osnovu svog afiniteta prema supstratu kao (Nagase i sar., 2006):

1. Kolagenaze – razgrađuju kolagene tipa I, II i III (MMP-1, -8, -13),
2. Želatinaze – razgrađuju želatin (MMP-2, -9),
3. Stromelizini – razgrađuju kolagen tipa IV i fibronektin (MMP-3, -10, -11),
4. Matrilizini – razgrađuju želatin i fibronektin (MMP-7, -26),
5. Membranske (MT) MMP – razgrađuju želatin, fibronektin i laminin (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25),
6. Heterogena grupa MMP (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -28).

Matriks metaloproteinaze učestvuju u regulisanju zapaljenskog odgovora (Fingleton, 2017). Služeći se *in vitro* i mišjim modelima, povišena ekspresija MMP je pokazana kod velikog broja bolesti ljudi koje u svojoj osnovi imaju zapaljenski proces (Parks i sar., 2004). Akutnu i hroničnu inflamaciju karakteriše eksudacija proteina plazme, regrutovanje leukocita i aktivacija medijatora inflamacije poreklom iz ćelija i plazme. Usled aktivacije endotelnih ćelija, dolazi do degradacije ekstracelularnog matriksa i reorganizacije tkivnih struktura (Masciantonio i sar., 2017). Povišen nivo MMP se dovodi u vezu sa inflamatornim oboljenjima vezivnog tkiva (Cawston i sar., 1984) i tumorima (Stetler-Stevenson i sar., 1993). Kako je inflamacija od suštinskog značaja za odbranu domaćina i oporavak tkiva, značaj MMP ogleda se u tome da pospešuju ovaj proces. Endotelne ćelije i trombociti su glavni izvor MMP-2, a leukociti MMP-9 (Auf dem Keller i sar., 2013; Momi i sar., 2009; Opdenakker i sar., 2001). Pod uticajem MMP-2 i MMP-9 povećava se vaskularna permeabilnost usled čega dolazi do transmigracije leukocita (Sternlicht i Werb, 2001). U toku inflamacije, nivo ovih enzima u plazmi uglavnom raste (Manicone i McGuire, 2008), s tim da se MMP-2 pripisuje anti, a MMP-9 proinflamatorno dejstvo (Yazdan-Ashoori i sar., 2011).

Većina MMP nalazi se u formi zimogena u posebnim strukturama u ćelijama, sa izuzetkom MT-MMP. Proteolitička aktivnost MMP i učešće u regulaciji inflamacije zavisi od same ekspresije MMP, kao i lokalizacije i dostupnosti odgovarajućih supstrata (Manicone i McGuire, 2008). Matriks metaloproteinaze razlažu proteine i time menjaju aktivnost supstrata, njegovu lokalizaciju i funkciju. Jedna MMP može imati više od jednog supstrata, a različite MMP mogu imati isti supstrat (Sternlicht i Werb, 2001). Matriks metaloproteinaze regulišu inflamatorne procese tako što:

1. razgrađuju i remodeluju ekstracelularni matriks,
2. moduliraju aktivnost citokina i hemokina, i
3. postavljaju koncentracioni gradijent za hemokine, na osnovu čega se leukociti dalje usmeravaju prema mestu povrede ili infekcije (Sternlicht i Werb, 2001).

Proteolizom citokina i hemokina, MMP mogu da aktiviraju, inhibiraju ili promene karakter primarne funkcije medijatora. Studije u vezi sa interakcijom TNF- $\alpha$  i MMP su pokazale da MMP-1, -2, -3, -9, -12, -14, -15 i -17 pojačavaju učinak ovog proinflamatornog citokina (Black i sar., 1997; English i sar., 2000; Mohan i sar., 2002; Moss i sar., 1997). Želatinaze MMP-2 i MMP-9 aktiviraju IL-1 $\beta$  (Schonbeck i sar., 1998), dok MMP-3 može i da aktivira i da inhibira ovaj citokin (Ito i sar., 1996). Matriks metaloproteinaza 9 potencira privlačeće dejstvo IL-8 (Van der Steen i sar., 2000). Pokazano je da domen MMP-2, hemopeksin, razgrađuje MCP-3 koji u ovom procesu gubi svojstvo agonista hemotakse i postaje antagonist (McQuibban i sar., 2000). Proteoliza i inaktivacija MCP-1 se dešava i pod uticajem MMP-1, MMP-3, MMP-13 i MT1-MMP (McQuibban i sar., 2002). Ostali MCP molekuli (MCP-1, MCP-2 i MCP-4) su supstrati samo za MMP-1 i MMP-3 (McQuibban i sar., 2002).

Pored citokina i hemokina, značajnu ulogu u inflamaciji imaju egzogeni medijatori poput bakterijskih proizvoda – endotoksini, lipopolisaharid, koji potenciraju imunski odgovor domaćina. U literaturi nije zabeleženo da ovi proizvodi mogu biti supstrati za MMP, ali mogu da aktiviraju njihovu ekspresiju u ćelijama domaćina (Elkington i sar., 2005). Istraživanja su pokazala da pojedine protozoe proizvode sopstvene metaloproteinaze i to: *Plasmodium falciparum* sintetise falcilizin (Murata i Goldberg, 2003), *Leishmania* spp. gp63 (McGwire i sar., 2003), a mikroneme *Toxoplasma gondii* luče toksolizin (Laliberte i Carruthers, 2011). Ne postoje literaturni podaci koji potvrđuju postojanje metaloproteinaza kod *Babesia* spp.

**Uloga MMP-2 i MMP-9 u homeostazi tkiva i inflamatornom odgovoru:** Matriks metaloproteinaza 2 je proteolitički enzim koji se u latentnom obliku luči iz ćelija u ekstracelularni prostor (Sternlicht i Werb, 2001). Glavni izvori MMP-2 su endotelne i vaskularne glatkomišične ćelije, kardiomiociti, fibroblasti i makrofagi, a prema novijim istraživanjima, ova uloga se pripisuje i trombocitima (Momi i sar., 2009). Matriks metaloproteinaza 2 se od ostalih MMP razlikuje po građi katalitičkog centra, zbog čega se u većoj meri eksprimira konstitutivno, a manje pod uticajem stimulusa (Manicone i McGuire, 2008). Matriks metaloproteinaza 2 razgrađuje denaturisani kolagen tipa IV i V i elastin u bazalnoj membrani, čime doprinosi ubrzanju transendotelnoj migraciji leukocita tokom inflamacije (Sternlicht i Werb, 2001). Takođe, MMP-2 učestvuje u regulaciji angiogeneze, kada pod uticajem aktiviranog proteina C raste ekspresija MMP-2 u endotelnim ćelijama (Yazdan-Ashoori i sar., 2011). Dodatno, MMP-2 posreduje u razgradnji i remodelovanju tkiva zahvaćenih kontaktnim i metastatskim napredovanjem tumora (Manicone i McGuire, 2008). Kod infekcije protozoama, povišeni nivoi proMMP-2 su pokazani u serumima pasa inficiranih *L. chagasi* (Melo i sar., 2011), dok su aktivne forme MMP-2 detektovane u cerebrospinalnoj tečnosti i zdravih i pasa inficiranih *L. chagasi* (Marangoni i sar., 2011).

Matriks metaloproteinaza 9 je enzim zaslužan za migraciju ćelija i remodelovanje ekstracelularnog matriksa razlaganjem kolagena u bazalnoj membrani. Svojom aktivnošću doprinosi imunskom sistemu time što stvara uslove za kretanje leukocita ka mestu infekcije/inflamacije i reguliše aktivaciju i inhibiciju citokina i hemokina (Sternlicht i Werb, 2001).

Matriks metaloproteinaza 9 je najpre identifikovana u neutrofilnim granulocitima (Sopata i Dancewics, 1974), a potom u monocitima i makrofagima (Mainardi i sar., 1984). U neutrofilima, MMP-9 je smeštena u tercijarnim granulama (Chakrabarti i sar., 2006). Za razliku od MMP-2 koju konstitutivno luče svi leukociti osim neutrofila (Hibbs i sar., 1985; Van den Steen i sar., 2000), ekspresija MMP-9 je indukovana posredstvom citokina (Opdenakker i sar., 1991). Pozitivni regulatori proizvodnje MMP-9 su IL-1, lektini i endotoksin (Opdenakker i sar., 1991), a negativni IL-4 (Concoran i sar., 1992), IL-10 (Lacraz i sar., 1995) i IFN- $\beta$  (Stüve i sar., 1997). Dubois i sar. (2002) su pokazali značaj MMP-9 u sepsi na primeru MMP-9 deficijentnih miševa rezistentnih na endotoksični šok.

Pod kontrolisanim uslovima, monociti proizvode slobodnu MMP-9 ili u kompleksu sa TIMP-1 (Opdenakker i sar., 2001). Odnos između proizvedenog enzima i inhibitora određuje da li će MMP-9 preći u aktivnu formu. Usled infekcije ljudi protozomom *P. falciparum*, monociti/makrofagi fagocituju trofozoite koji u sebi sadrže hemozoin. Prato i sar. (2005) su pokazali da takvi monociti indukuju povišenu aktivnost MMP-9, koja dalje utiče na sintezu TNF- $\alpha$  iz cirkulišućih ili prekursora vezanih za ćeliju (Gearing i sar., 1995; Shubayev i Myres, 2002). Povratno, TNF- $\alpha$  kao proinflamatorni citokin, indukuje sintezu MMP-9 (Bond i sar., 1998; Nagase, 1997).

Proizvodnja MMP-9 u limfocitima zavisi od toga da li je ćelija aktivirana ili ne, kao i od istovremene proizvodnje TIMP-1 u ovim ćelijama (Opdenakker, 2001). Faktor transformacije rasta  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) (Zhou i sar., 1993), IL-2 (Montgomery i sar., 1993; Weeks i

sar., 1993) i drugi citokini i hemokini (Johnatty i sar., 1997) intenziviraju sintezu MMP-9, a IFN- $\beta$  (Stüve i sar., 1996) suprimira ekspresiju MMP-9 u limfocitima.

**Značaj primene tehnike zimografije u detekciji matriks metaloproteinaza:** Zimografija je jednostavna, osetljiva, merljiva funkcionalna proba, pogodna za analizu MMP i TIMP. Ovim postupkom se elektroforetski razdvajaju enzimi pod denaturišućim, neredukujućim uslovima. Razdvajanje se odvija u poliakrilamidnom gelu koji sadrži supstrat sa kojim kopolimerizuje. U zavisnosti od vrste supstrata i specifičnosti njegove interakcije sa traženom MMP, u laboratorijama se izvode (Snoek-van Beurden i Von den Hoff, 2005):

1. Želatinska zimografija se primenjuje za detekciju MMP-2 i MMP-9 u latentnoj i aktivnoj formi. Ovom metodom se mogu detektovati i MMP-1, MMP-8 i MMP-13. Izuzetno je osetljiva, pa se tako MMP-2 može detektovati već u količini od 10 pg.
2. Kazeinska zimografija je metoda za detekciju MMP-1, MMP-7, MMP-11, MMP-12 i MMP-13, a u većim koncentracijama i MMP-9. U poređenju sa želatinskom zimografijom, kazeinska se pokazala kao manje osetljiva.
3. Kolagenska zimografija se primarno primenjuje za detekciju MMP-1 i MMP-13, ali i MMP-2 i MMP-9. Nativna kolagena vlakna su nepodesna za sjedinjavanje sa poliakrilamidnim gelom, ali dodavanjem SDS, raskida se vlaknasta struktura i omogućava proteinima da putuju kroz gel.
4. Reverzna zimografija služi za detekciju TIMP. Pored želatina, u gel se dodaje i neka MMP, obično MMP-2. Finalni izgled gela je negativ gela supstratne zimografije tj. inhibitori se vide kao plave trake na prozirnem gelu.
5. *In situ* zimografija omogućava lokalizaciju matriks metaloproteinaza u tkivnom uzorku. U suštini, to je supstratna zimografija prilagođena primeni zamrznutih uzoraka. Supstrat je deponovan u zamrznutom delu nefiksiranog tkivnog preparata. Tokom inkubacije, aktivirane MMP će razložiti supstrat, što se može detektovati svetlosnim ili fluorescentnim mikroskopom. Ovom metodom se detektuju samo aktivne forme enzima, ali aktivacijom latentnih oblika moguće je vizuelizovati obe forme.



### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio da se utvrdi kako prirodna infekcija pasa protozom *B. canis* utiče na funkcionalnu aktivnost ukupnih leukocita, neutrofila i limfocita u perifernoj krvi pasa, kao i da se ispita da li se taj uticaj razlikuje između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih jedinki čiji je zdravstveni status okarakterisan sa kliničkog stanovišta, analizom hematoloških i biohemijskih parametara, stepenom inflamacije i oksidativnog stresa, kao i nivoima izlučenih želatinaza.

Na osnovu postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci istraživanja:

1. Prilikom dijagnostike oboljenja (prezentacija), a na osnovu kliničkih i hematoloških parametara, formirati grupe SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa;
2. Odrediti da li postoji poremećaj funkcije organa analizom biohemijskih parametara na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka; odrediti nivo proteina akutne faze kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa;
3. *In vitro* analizama ispitati funkcionalnu aktivnost: neutrofila, testiranjem njihove sposobnosti fagocitoze, oksidativnog praska i lučenja želatinaza; ukupnih leukocita, određivanjem nivoa izlučenih IL-8 i MCP-1; T limfocita, određivanjem nivoa izlučenog IFN- $\gamma$ ;
4. Utvrditi funkcionalnu aktivnost B limfocita, odnosno plazmocita, na osnovu koncentracije  $\gamma$  globulina u serumu na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka;
5. Odrediti stepen oksidativnog stresa na osnovu koncentracije malondialdehida u eritrocitima i slobodnih tiolnih grupa u serumu, kao i stepen antioksidativne zaštite na osnovu aktivnosti katalaze i glutation peroksidaze u eritrocitima pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka;
6. Odrediti serumsku aktivnost želatinaza na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Dizajn studije

U ovu studiju su bili uključeni psi kod kojih je dijagnostikovana akutna infekcija protozomom *B. canis* i zdravi, kontrolni psi. Prilikom postavljanja dijagnoze akutne babezioze, bilo je neophodno da budu ispunjeni sledeći kriterijumi:

1. klinička slika i simptomi koji ukazuju na akutnu babeziozu – inapetencija, letargija, bledilo vidljivih sluznica, povišena telesna temperatura,
2. prisustvo razvojnih oblika *Babesia* spp. na razmazu periferne krvi, i
3. pozitivan PCR test na prisustvo *B. canis*.

Psi sa akutnom babezozom koji su imali mikrofilarije u visećoj kapi i/ili pozitivan Knott test, kao i psi sa dijagnostikovanim alergijama, endokrinološki i onkološki pacijenti nisu bili uključeni u studiju. Psi su dobili dve doze imidokarb-dipropionata (6 mg/kg TM, sc), prvog i 15. dana od postavljanja dijagnoze, nakon čega su se svi uspešno oporavili.

Istraživanje se sastojalo iz dve faze. Tokom prve faze istraživanja, uzorci krvi su uzimani prvog i 15. dana od postavljanja dijagnoze. Kod ovih pasa, određena je kompletna krvna slika iz uzoraka pune krvi, kao i vrednosti biohemijskih parametara iz uzoraka seruma. Nakon određivanja hematoloških parametara, deo viška pune krvi je iskorišćen za pripremu uzoraka ispranih eritrocita, iz kojih su određene koncentracije hemoglobina i MDA, kao i aktivnosti CAT i GPx. Drugi deo viška krvi je upotrebljen za molekularnu dijagnostiku i potvrdu *B. canis*. Ostatak seruma je iskorišćen za određivanje koncentracije ukupnih tiola, CER i HPT i aktivnosti PON-1, kao i za izvođenje agarozne elektroforeze proteina i određivanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 metodama zimografije i Western blota.

Tokom druge faze istraživanja, prikupljena je krv pasa sa simptomima akutne babezioze i zdravih, kontrolnih pasa. Kompletna krvna slika je određena iz uzoraka pune krvi. Jedan deo krvi je upotrebljen za procenu funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita, monocita i limfocita. U tu svrhu su sprovedeni test fagocitoze zimošana i test oksidativnog praska i određena je koncentracija IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$ , kao i aktivnost MMP-2 i MMP-9 u uzorcima plazme koja je izdvojena nakon što je krv inkubirana (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), pod uslovima bez i sa dodatkom stimulatora. Drugi deo krvi je iskorišćen za izolaciju leukocita i stimulaciju mitogenima, nakon čega su izdvojeni supernatanti u kojima je određena aktivnost MMP-2 i MMP-9 metodom zimografije.

### 4.2. Odabir pacijenata

U prvi deo istraživanja je bilo uključeno 24 psa akutno inficiranih protozomom *B. canis*, od čega 16 mužjaka i osam ženki, među kojima je bilo 19 rasnih pasa i pet mešanaca, uzrasta od šest meseci do 11 godina (medijana godinu dana). Uzorci su uzimani prvog i 15. dana (parni uzorci), na osnovu čega su formirane grupe „prezentacija“ i „oporavak“. Psi na prezentaciji su grupisani dalje u septične (SIRS pozitivni) i neseptične (SIRS negativni). Da bi pas bio svrstan u grupu SIRS pozitivnih, bilo je neophodno da zadovolji dva kriterijuma (DeClue, 2017):

1. telesna temperatura niža od 37,2 ili viša od 39,2°C,
2. frekvencija rada srca iznad 140 otkucaja/min,
3. broj udisaja iznad 40 udisaja/min,
4. broj leukocita ispod  $5 \times 10^9/L$  ili iznad  $19,5 \times 10^9/L$ , sa više od 5% štapićastih neutrofila.

Ukoliko je pas na prezentaciji imao jedan ili nijedan od navedenih simptoma, grupisan je u SIRS negativne pse.

U drugi deo istraživanja je bilo uključeno 14 pasa, od kojih sedam sa akutnom babezozom (grupa: *B. canis* pozitivni psi) i sedam zdravih, kontrolnih pasa (grupa: zdravi psi). Među akutno inficiranim psima bilo je pet mužjaka i dve ženke, od kojih šest rasnih pasa i jedan mešanac, uzrasta od šest meseci do osam godina (medijana pet godina). Psi akutno inficirani *B. canis* su dodatno grupisani u septične (SIRS pozitivni) i neseptične (SIRS negativni) na osnovu već navedenih kriterijuma. Grupu kontrolnih pasa su činila dva mužjaka i pet ženki, odnosno četiri rasna psa i tri mešanca, starosti od pet do 13 godina (medijana devet godina). Kontrolni psi na dan uzorkovanja krvi nisu pokazivali simptome akutne infekcije babezijom, a pregledom krvnih razmaza nije ustanovljeno prisustvo razvojnih oblika babezije.

Vlasnici pasa koji su uključeni u istraživanje su potpisali saglasnost da se uzorci krvi i seruma poreklom od njihovih ljubimaca mogu koristiti u naučne svrhe, a dobijeni rezultati mogu biti publikovani. Etički komitet Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu je odobrio ogled na osnovu dozvole Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj: 323-07-03455/2015-05/3; 323-07-04497/2019-05).

#### 4.3. Uzorkovanje krvi

Za prvi deo istraživanja su prikupljeni parni uzorci krvi poreklom od istih pasa na prezentaciji i oporavku. Uzorci krvi su uzimani u EDTA i u epruvetama sa gel separatorom. Uzorci pune krvi su korišćeni za hematološke analize, izradu krvnih razmaza i molekularnu dijagnostiku, kao i za pripremu uzoraka hemolizata namenjenih određivanju parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Krv u epruvetama sa separatorom je centrifugovana na 3000g u trajanju od 10 minuta, nakon čega je izdvojen serum. Deo seruma je upotrebljen za biohemijske analize neposredno nakon izdvajanja. Drugi deo seruma je uskladišten na -20°C do pristupanja analizama vrednosti APP, izvođenju agarozne elektroforeze i detekciji MMP-2 i MMP-9 metodama zimografije i Western blota.

*Izolacija eritrocita i priprema hemolizata:* Uzorci krvi su centrifugovani na 800g, 10 minuta, nakon čega je odstranjena krvna plazma sa tankim slojem leukocita (*buffy coat*). Talog eritrocita je pomešan u jednakoj zapremini sa fiziološkim rastvorom i dva puta opran pod istim uslovima (800g, 10 minuta). Nakon poslednjeg ispiranja, tečnost iznad taloga je odstranjena, a talog eritrocita podeljen na zapremine od po 10  $\mu$ L i uskladišten na -20°C do pristupanja određivanju koncentracije hemoglobina i MDA i aktivnosti CAT i GPx.

Za drugi deo istraživanja, uzorkovana je krv akutno inficiranih i zdravih pasa. Krv je prikupljena u heparinskim epruvetama. Nakon što su određeni hematološki parametri, deo pune krvi je izložen uticaju stimulatora. Nakon 1h inkubacije, za svaki uzorak i uslov, sprovedeni su test fagocitoze zimozana i oksidativnog praska. Nakon 24h inkubacije, krv je centrifugovana na 3000g u trajanju od 15 minuta. Izdvojena plazma je uskladištena na -20°C do pristupanja analizi koncentracije oslobođenih citokina i aktivnosti MMP-2 i MMP-9. Drugi deo krvi je upotrebljen za izolaciju leukocita na gradijentu gustine.

*Izolacija leukocita:* U sterilnu epruvetu je preneta odgovarajuća zapremina gradijenta gustine (*Lymphocyte Separation Medium*, 1,077 g/ml, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), a potom je na nju, uz rubove epruvete, naneta jednaka količina krvi, tako da ne dođe do naglog mešanja kontaktnih površina tečnosti. Tako pripremljen uzorak je centrifugovan na 700g, 30 minuta bez kočnice. Nakon završenog centrifugovanja, izdvojila su se tri sloja: donji – talog eritrocita, srednji – leukociti (*buffy coat*) i gornji – plazma sa gradijentom. Gornji sloj je odstranjen pipetiranjem, a sloj leukocita je izdvojen u novu epruvetu i opran (1200g, pet minuta) u medijumu (RPMI 1640, Capricorn Scientific) sa dodatkom 20% komercijalnog seruma (*Fetal calf serum*, FCS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Kako bi se u potpunosti očistio od

eritrocita, nakon prvog centrifugovanja, odličen je supernatant, a talog leukocita pomešan sa puferom za lizu eritrocita (9 NH<sub>4</sub>Cl : 1 Tris, pH 7,2) i inkubiran 10 minuta na 4°C, uz povremeno mešanje. Nakon što je završena liza eritrocita, postupak ispiranja je ponovljen dva puta pod istim uslovima, s tim da je poslednje ispiranje bilo bez FCS. Izolovani leukociti su upotrebljeni za uzgoj i stimulaciju mitogenima u ćelijskoj kulturi i određivanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u izdvojenim supernatantima.

#### 4.3.1. *In vitro* stimulacija leukocita u punoj krvi

Uzorci pune krvi su izloženi dejstvu mitogenih stimulatora i komponenata vakcine protiv babezioze (Pirodog®, France). Svaki uzorak krvi je podeljen na šest delova, u pojedinačnoj zapremini od 500 µL sa dodatkom rastvora penicilina, streptomocina i amfotericina B (P/S/A) (PAA, Pasching, Austria). Prvi uslov je podrazumevao uzorak krvi bez stimulatora, drugi krv sa dodatkom 5 µL konkanavalina A (*concanavalin A*, ConA) (konc. 1 ng/mL), treći krv sa dodatkom 5 µL rastvarača za vakcinu, četvrti krv sa dodatkom 5 µL 10× razblažene vakcine, peti krv sa dodatkom 5 µL 100× razblažene vakcine i šesti uslov je bio uzorak krvi sa dodatkom 5 µL 1000× razblažene vakcine. Uzorci su inkubirani preko noći na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 24h, uzorci su centrifugovani na 3000g, 15 minuta i sobnoj temperaturi, a izdvojena plazma uskladištena na -20°C do pristupanja određivanju koncentracije IL-8, MCP-1 i IFN-γ i aktivnosti MMP-2 i MMP-9.

#### 4.3.2. *In vitro* stimulacija izolovanih leukocita

Za ispitivanje uticaja mitogena na aktivnost MMP, korišćeni su leukociti prethodno izolovani na gradijentu gustine. Broj leukocita u finalnom talogu je određen brojanjem u Neubauer komorici tako da je 50×10<sup>3</sup> ćelija zasejano u 200 µL medijuma (*Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM, Gibco) sa dodatkom 2% ITS (*insulin-transferrin-selenium*), 2% glutamina i 1% rastvora P/S/A. Svaki uzorak je postavljen u pet uslova, a svaki uslov u duplikatu. Leukociti su bili izloženi mitogenom uticaju lipopolisaharida (*lipopolysaccharide*, LPS) (1 ng/100 µL kulture), ConA (konc. 5 µg/mL), citohalazina B (*cytochalasin B*, CytB) (konc. 1 µg/mL) i fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin*, PHA) (5%/100 µL kulture). Peti uslov je podrazumevao leukocite koji su bili bez dodatka mitogena. Uzorci su inkubirani 1h i 24h, na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 1h i 24h, iz svakog uslova je alikvotirano po 20 µL izdvojenog supernatanta. Ovi uzorci su uskladišteni na -20°C do pristupanja analizi aktivnosti MMP-2 i MMP-9.

#### 4.4. Hematološke i biohemijske analize

Kompletna analiza krvi za prvi deo istraživanja je urađena na komercijalnom hematološkom aparatu Abacus (Diatron, Wien, Austria), a za drugi deo istraživanja na aparatu Idexx ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Inc, Westbrook, Maine, USA). Parametri koji su analizirani za potrebe studije su: broj eritrocita (RBC), hematokrit (HCT) i koncentracija hemoglobina (HGB), prosečna zapremina eritrocita (*mean cellular volume*, MCV) i prosečna vrednost koncentracije hemoglobina u zapremini eritrocita (*mean cellular hemoglobin concentration*, MCHC), broj leukocita (WBC), neutrofilnih (NEUT), eozinofilnih i bazofilnih granulocita, limfocita (LYM) i monocita (MON), broj trombocita (PLT). Set biohemijskih parametara određen je na biohemijskom aparatu Tehnikon RA-XT (Bayer, Dublin, Ireland), služeći se komercijalnim reagensima ELITech Group Solutions (Puteaux, France). Određena je koncentracija ukupnih proteina (UP) i albumina (ALB), glukoze (GLU), uree (URE), kreatinina (CRE), holesterola (CHOL), triglicerida (TG), ukupnog bilirubina (BIL-T), gvožđa, aktivnost alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), alkalne fosfataze (ALP), gama-glutamil aminotransferaze (GGT), amilaze (AMY), lipaze (LIP) i kreatin kinaze (CK).

#### 4.5. Evaluacija krvnih razmaza

Krvni razmazi su napravljeni iz kapilarne i pune krvi i bojani Romanovsky tipom bojenja. Za brzu potvrdu prisustva *Babesia* spp. pravljeni su razmazi kapilarne krvi dobijeni iz ušne vene psa. Nalaz merozoita babezije unutar eritrocita psa je bio potvrda babezioze. Leukocitarna formula je sačinjena na osnovu krvnih razmaza, tako što je određen relativni broj štapićastih i segmentiranih neutrofila, eozinofila, monocita, velikih i malih limfocita na 100 izbrojanih leukocita, dok je apsolutna vrednost izračunata kao proizvod relativne vrednosti i ukupnog broja leukocita dobijenog na hematološkom analizatoru. Nivo parazitemije je određen kao broj eritrocita u kojima je mikroskopski detektovana forma *Babesia* spp. na 2000 izbrojanih eritrocita (Beletić i sar., 2021).

#### 4.6. Molekularna dijagnostika uzročnika babezioze pasa

Za potrebe molekularne dijagnostike *Babesia* spp, korišćena je zamrznuta puna krv. Forme *Babesia* spp. koje su potvrđene na razmazu, identifikovane su kao *Babesia canis* pomoću RT-PCR metode, na osnovu Hsp70 gena. Kompletna PCR analiza sprovedena je u komercijalnoj referentnoj veterinarskoj laboratoriji služeći se komercijalnim reagensima (Tick/Vector Comprehensive Real PCR Panel Canine, IDEXX Laboratories, Inc).

#### 4.7. Ispitivanje funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita

Funkcionalna aktivnost neutrofilnih granulocita u krvi bez i sa dodatkom stimulatora (ConA, rastvarač za vakcinu i 10, 100 i 1000× razblažena vakcina) kod obolelih i zdravih pasa, određivana je na osnovu broja neutrofila sposobnih da obave fagocitozu i oksidativni prasak. U tu svrhu su primenjeni test fagocitoze partikula zimozana i Nitroblue tetrazolium (NBT) citohemijski test.

##### 4.7.1. Test fagocitoze partikula zimozana

Zimozan (1 mg) je opran u 1 mL PBS na 800g u trajanju od pet minuta i ova procedura je ponovljena još dva puta. Nakon poslednjeg ispiranja, zimozan je opsonizovan u 1 mL rastvora konjskog seruma u PBS (1:1), 30 minuta na 37°C. Nakon završene opsonizacije, u nove mikrotube alikvotirano je po 15 µL uzorka, prethodno izloženog dejstvu stimulatora u trajanju od 1h, i dodato po 3 µL opsonizovanog zimozana. Uzorci su inkubirani 15 minuta na 37°C i 15 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje, nakon čega je iz svakog uzorka napravljen krvni razmaz. Evaluacija fagocitne aktivnosti neutrofilnih granulocita sprovedena je određivanjem broja neutrofila sa fagocitovanim partikulama zimozana na 100 izbrojanih neutrofila na krvnom razmazu.

##### 4.7.2. Test oksidativnog praska

Test oksidativnog praska za procenu aktivnosti leukocita i sinteze ROS optimizovan je na osnovu Leoratti i sar. (2012). U osnovi reakcije je redukcija NBT u granule formazana tj. tamno-plavi precipitat unutar fagocita. Ovaj citohemijski test je sproveden dodavanjem po 3 µL 2% rastvora NBT u 15 µL pune krvi prethodno tretirane stimulatorima. Uzorci su inkubirani 15 minuta na 37°C i 15 minuta na sobnoj temperaturi. Evaluacija sposobnosti neutrofilnih granulocita da izazovu oksidativni prasak sprovedena je određivanjem broja neutrofila zahvaćenih oksidativnim praskom (pozitivan NBT test) na 100 izbrojanih neutrofila na krvnom razmazu.

#### 4.8. Određivanje koncentracije citokina

Uzorci plazme bolesnih i zdravih pasa, izdvojeni nakon izlaganja krvi uslovima bez i sa dodatkom stimulatora, korišćeni su za određivanje koncentracije IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$ . U tu svrhu, primenjeni su komercijalni Canine ELISA kitovi (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA). Za određivanje koncentracije IL-8 uzorci su razblaženi 10 $\times$ , za određivanje koncentracije MCP-1 uzorci su razblaženi 20 $\times$ , a koncentracija IFN- $\gamma$  je određena iz nerazblaženih uzoraka plazme. Apsorbance su očitavane na 450 i 540 nm, tako da je za izračunavanje koncentracije iskorišćena razlika ove dve vrednosti. Kompletna procedura, izrada standardne krive i izračunavanje koncentracije citokina sprovedena je prema uputstvu proizvođača.

#### 4.9. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Za određivanje koncentracije MDA i aktivnosti CAT i GPx na prezentaciji i oporavku korišćeni su uzorci ispranih eritrocita. Neposredno pred početak analize, uzorci su lizirani destilovanom vodom u odnosu 1:10 (MDA, CAT), odnosno Drapkinovim reagensom u odnosu 1:11 (GPx). U liziranim uzorcima, koncentracija hemoglobina je određena metodom van Kampen i Zijlstra (1961). Koncentracija ukupnih tiola je određena u uzorcima seruma na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka. Očitavanje apsorbanci za sve parametre sprovedeno je spektrofotometru Cecil 2021 UV/VIS (Select Science, Bath, UK), a potom su izračunate vrednosti za MDA, CAT i GPx normalizovane u odnosu na koncentraciju hemoglobina u hemolizatima.

##### 4.9.1. Određivanje koncentracije malondialdehida

Stepen oštećenja ćelijskih lipida određivan je na osnovu koncentracije nastalog MDA (Girotti i sar., 1991). Hemolizati u finalnoj zapremini od 300  $\mu$ L pomešani su sa 600  $\mu$ L TBA reagensa (0,4 g tiobarbiturna kiselina, 15 g trihlorsirćetna kiselina, 2,2 mL konc. HCl i do 100 mL destilovane vode), vorteksovani i inkubirani 15 minuta na 90 $^{\circ}$ C i pet minuta na ledu. Nakon centrifugovanja na 1000g (10 minuta, 4 $^{\circ}$ C), izdvojeni supernatant je iskorišćen za očitavanje apsorbance na 535 nm. Koncentracija MDA je određena preko formule:

$$C_{\text{TBAR}} = (\Delta A \times V_{\text{rs}} \times 10) / (\epsilon \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{Hgb}}),$$

gde je  $\Delta A$  razlika u apsorbancama uzorka i slepe probe,  $V_{\text{rs}}$  zapremina reakcione smeše,  $\epsilon$  molarni apsorpcioni koeficijent MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{uz}}$  zapremina uzorka,  $C_{\text{Hgb}}$  koncentracija hemoglobina u uzorku hemolizata. Koncentracija MDA je izražena u  $\mu\text{mol/g Hgb}$ .

##### 4.9.2. Određivanje koncentracije ukupnih tiola

Za određivanje koncentracije ukupnih tiola u serumu, korišćena je metoda u kojoj DTNB reagens (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) u baznoj sredini reaguje sa alifatičnim tiolima što rezultuje stvaranjem 1 mol p-nitrofenol anjona po 1 molu tiola (Ellman, 1959). Uzorci seruma zapremine 50  $\mu$ L pomešani su sa 20  $\mu$ L DTNB reagensa (10 mmol/L, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7) i 900  $\mu$ L fosfatnog pufera (0,2 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 mmol/L EDTA, pH 9). Tako pripremljeni uzorci inkubirani su tokom 25 minuta na 25 $^{\circ}$ C u mraku. Žuta boja nastalog anjona određena je spektrofotometrijski na 412 nm, prema prethodno urađenoj slepoj probi. Koncentracija ukupnih tiola (THIOLS) je određena preko formule:

$$\text{THIOLS} = A \times 1,43$$

i molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola ( $13\,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Koncentracija tiola je izražena u mmol/L.

#### 4.9.3. Određivanje aktivnosti katalaze

Za određivanje aktivnosti CAT u eritrocitima primenjeno je spektrofotometrijsko praćenje razgradnje molekula vodonik-peroksida do kiseonika i vode (Aebi, 1984). Reakcija se odvijala pri konstantnoj pH 7 i temperaturi 25°C, kao i niskoj koncentraciji vodonik-peroksida kako bi se sprečila inaktivacija enzima i/ili pojava mehurića prilikom oslobađanja kiseonika. Odnos Tris rastvora (1M, pH 8) i vodonik-peroksida (10 mM) određivan je u finalnoj zapremini od 3 mL na osnovu vrednosti slepe probe na 240 nm (0,525-0,550). Uzorci su pripremani dodavanjem 50 µL hemolizata u 3 mL podešenog rastvora vodonik-peroksida u Trisu. Aktivnost CAT je posmatrana kroz pad apsorbance na 240 nm, svakih 30 sekundi tokom tri minuta na 25°C. Aktivnost CAT je određena preko formule:

$$\text{CAT} = (100 \times R \times \Delta A) / (C_{\text{Hgb}} \times V \times 0,071),$$

gde je R faktor razblaženja,  $\Delta A$  srednja vrednost promene apsorbance u minutu,  $C_{\text{Hgb}}$  koncentracija hemoglobina u uzorku hemolizata, V zapremina uzorka, a 0,071 predstavlja milimolarni apsorpcioni koeficijent vodonik-peroksida. Aktivnost CAT je izražena u U/g Hgb.

#### 4.9.4. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost GPx je određivana u uzorcima ispranih eritrocita metodom po Günzler i sar. (1974). Princip merenja je podrazumevao spektrofotometrijsko registrovanje potrošnje NADPH u kuplovanom enzimskom sistemu. U smešu 500 µL kalijum-fosfatnog pufera (400 mmol/L, pH 7) i 200 µL glutationa (604 mmol/L), dodato je 20 µL prethodno pripremljenog uzorka (11× razblaženi hemolizat u Drapkinovom reagensu) i 480 µL destilovane vode. Rastvor je inkubiran 10 minuta na 37°C, a potom je dodato 200 µL NADPH (3 mmol/L u 0,1% NaHCO<sub>3</sub>) i 550 µL tercijarnog butil hidroperoksida (TBH) (6,3 nmol/L). Nakon isteka dva minuta od početka reakcije, merena je potrošnja NADPH u intervalima od 30 sekundi tokom tri minuta. Aktivnost GPx je izračunata kao razlika u brzini potrošnje NADPH između uzorka i slepe probe, gde slepa proba sadrži sve reagense u navedenom odnosu, ali bez uzorka. Aktivnost GPx je izražena u µKat/g Hgb.

#### 4.10. Određivanje nivoa proteina akutne faze

Nivo testiranih APP na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka određivan je u uzorcima seruma. Apsorbance su očitavane na spektrofotometru Cecil 2021 UV/VIS (Select Science, Bath, UK).

##### 4.10.1. Određivanje koncentracije ceruloplazmina

Koncentracija CER u uzorcima seruma je određena metodom Sunderman i Nomoto (1970), preko *p*-fenilendiamin (*p-phenylenediamine*, PPD) oksidazne aktivnosti. Pri pH 5,4 CER katalizuje oksidaciju PPD u obojeni proizvod, koji je direktno proporcionalan koncentraciji CER u serumu. Uzorci su pripremani u duplikatu, dodavanjem 100 µL seruma u 2 mL natrijum-acetatnog pufera (200 mM, pH 5,5 sa dodatkom 1,5 mg/mL PPD) i inkubirani na 37°C. U prvu epruvetu je dodato 50 µL 1,5 M natrijum azida pet minuta nakon početka inkubacije, a u drugu nakon 30 minuta. Promena boje reakcione smeše kvantifikovana je očitavanjem apsorbance na 530 nm. Koncentracija CER je određena preko formule:

$$C_{\text{CER}} = 0,752 \times \Delta A,$$

gde je 0,752 predstavljao kalibracioni faktor, a  $\Delta A$  razliku između apsorbance uzorka i slepe probe. Koncentracija CER je izražena u g/L.

#### 4.10.2. Određivanje koncentracije haptoglobina

Koncentracija HPT je određena standardizovanom metodom (Jones i Mould, 1984; Owen i sar., 1960) zasnovanoj na peroksidaznoj aktivnosti HGB-HPT kompleksa. Uzorci seruma razblaživani su  $10\times$  u fiziološkom rastvoru u finalnoj zapremini od 50  $\mu\text{L}$ . Razblaženi serumi su pomešani sa 50  $\mu\text{L}$  rastvora methemoglobina i inkubirani deset minuta na  $22^\circ\text{C}$  u mraku. Po završenoj inkubaciji, u svaki uzorak je dodato po 150  $\mu\text{L}$  rastvora gvajakola (pH 4) i 50  $\mu\text{L}$  preinkubiranog vodonik-peroksida. Uzorci su inkubirani tokom deset minuta na  $22^\circ\text{C}$ . Apsorbance su očitavane na 492 nm. Koncentracija HPT je određena na osnovu dobijene standardne krive i izražena u g/L.

#### 4.10.3. Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1

Aktivnost PON-1 je određena preko 4-nitrofenil acetata kao supstrata (Dantoine i sar., 1998). Uzorci seruma su razblaženi  $20\times$  u fiziološkom rastvoru u finalnoj zapremini od 250  $\mu\text{L}$ . Tako pripremljena razblaženja seruma pomešana su sa 2 mL Tris-HCl pufera (25 mM, pH 7,4,  $25^\circ\text{C}$ ) koji je sadržavao 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,5% metanola i 0,625 mM 4-nitrofenil acetata. Stvaranje 4-nitrofenola kao proizvoda reakcije određeno je merenjem apsorbance na 402 nm preko molarnog apsorpcionog koeficijenta ( $14\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Aktivnost PON-1 je izražena u U/L.

#### 4.11. Agarozna elektroforeza proteina

Uzorci seruma na prezentaciji i oporavku su korišćeni za elektroforetsko razdvajanje proteinskih frakcija na agaroznom gelu. Gelovi su pripremani kao 1% rastvor agaroze u 1:1 smeši barbituratnog pufera (pH 8,6) i destilovane vode. Svaki uzorak je neposredno pre postavljanja na gel razblažen  $5\times$  u fiziološkom rastvoru. Horizontalna elektroforeza je sprovedena u SAS-MX kadici (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) i barbituratnom puferu, u trajanju od 45 minuta na 80V. Po završenom putovanju, gelovi su 20 minuta sušeni na  $60^\circ\text{C}$ , a nakon toga pet minuta bojani u 0,25% rastvoru boje *Comassie brilliant blue* (CBB-G250) (Serva, Heidelberg, Germany). Gelovi su odbojavani u vodenom rastvoru sa dodatkom 30% metanola i 10% sirćetne kiseline, do pojave jasno definisanih plavih traka na gelu. Nakon skeniranja, gelovi su denzitometrisani u programu TotalLab TL120® software. Koncentracija proteinskih frakcija je izračunata kao proizvod procenta frakcije detektovane na gelu i ukupne koncentracije proteina određene na biohemijskom analizatoru (g/L).

#### 4.12. Zimografija

Aktivnost matriks metaloproteinaza u uzorcima seruma na prezentaciji i oporavku, kao i u plazmi i supernatantima leukocita poreklom od obolelih i zdravih pasa određena je standardizovanom metodom vertikalne elektroforeze na gelu poliakrilamida (Kovačić i sar., 2017). Zimografija SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) je primenjena za detekciju prisustva i aktivnosti enzima (pro)MMP-2 i -9. Nerazblaženi supernatanti i  $5\times$  razblaženi uzorci plazme i seruma pomešani su sa jednakom zapreminom pufera za uzorkovanje (125 mM Tris, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% bromfenol plavo, pH 6,8). Po 10  $\mu\text{L}$  tako pripremljenih uzoraka postavljeno je na 8% poliakrilamidni gel sa dodatkom 2% želatina. Za procenu veličine proteina korišćen je Perfect™ Color Protein Ladder (EurX, Gdańsk, Poland), a 10% FCS kao pozitivna kontrola. Uzorci su putovali 15 minuta na 80V i 60 minuta na 120V. Nakon završene elektroforeze, gelovi su potopljeni u 2% Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) u trajanju od  $2 \times 30$  minuta, na sobnoj temperaturi i uz konstantno mešanje. Po završenom ispiranju u tritonu, gelovi su inkubirani preko noći na  $37^\circ\text{C}$  u puferu za razvijanje (10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM Tris, pH 7,5-8). Nakon toga, gelovi su obojeni u 0,25% CBB-G250, a potom obezbojavani u rastvoru sa dodatkom 30% metanola i 10% sirćetne kiseline do pojave jasno definisanih belih traka na plavom gelu. Prisustvo i jačina signala detektovanih MMP je evaluirana služeći programom TotalLab TL120®



software. Aktivnost (pro)MMP-2 i (pro)MMP-9 je određena normalizovanjem dobijenih vrednosti prema aktivnosti pozitivne kontrole koja je uzeta za jediničnu vrednost.

#### 4.13. Western blot

Prisustvo MMP-2 i MMP-9 na prezentaciji i oporavku ispitivano je Western blot metodom (BIO-RAD General protocol for Western blotting). Uzorci seruma su razblaženi 5×, a potom u odnosu 1:1 pomešani sa puferom za uzorkovanje, sa dodatkom 5% betamerkapto-etanola. Nakon kuvanja na 78°C u trajanju od pet minuta, uzorci su razdvojeni elektroforezom na 10% akrilamidnom gelu. Transfer sa gela na PVDF membranu (0,4 µm prečnik pora) je ostvaren na aparatu Trans-Blot Turbo Transfer System, tokom sedam minuta. Za detekciju MMP-2, kao primarno antitelo korišćeno je 200× razblaženo poliklonsko antitelo protiv MMP-2 proizvedeno na kunićima (Rabbit polyclonal MMP-2 antibody, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), a kao sekundarno 2500× razblaženo antitelo protiv IgG kunića proizvedeno na kozama (Goat anti-Rabbit IgG H&L Biotin, Abcam, Cambridge, UK). Za detekciju MMP-9, kao primarno antitelo korišćeno je 1000× razblaženo monoklonsko antitelo protiv MMP-9 proizvedeno na miševima (Mouse monoclonal MMP-9 antibody, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), a kao sekundarno 5000× razblaženo antitelo protiv teškog lanca IgG2a proizvedeno na kozama (Goat anti-Mouse IgG2a heavy chain HRP, Abcam, Cambridge, UK).

#### 4.14. Statistički testovi

Kontinuirane varijable su prikazane kao medijana sa opsegom između minimalne i maksimalne vrednosti, odnosno interkvartilnim opsegom. Relativne promene između vrednosti na prezentaciji i nakon oporavka izračunate su služeći se formulom:

$$[(\text{vrednost na oporavku} - \text{vrednost na prezentaciji}) / \text{vrednost na prezentaciji}] \times 100.$$

Značajnost razlika između vrednosti ispitivanih parametara na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka određena je primenom Wilcoxon testa za parne uzorke. Mann-Whitney U test je primenjen kako bi se utvrdila značajnost razlika između rezultata dobijenih za SIRS pozitivne i SIRS negativne pse na prezentaciji. Povezanost vrednosti pojedinačnih parametara utvrđena je preko Spearman-ovog koeficijenta korelacija. Rezultati funkcionalne aktivnosti leukocita između obolelih i zdravih pasa, kao i između obolelih SIRS pozitivnih, SIRS negativnih i zdravih pasa upoređeni su primenom Kruskal-Wallis testa za sve testirane uslove i post-hoc analizom po Conover-u za dva ista uslova između bolesnih i zdravih pasa, kao i dva pojedinačna različita uslova u okviru grupe bolesnih ili grupe zdravih pasa. Kao statistički značajne, posmatrane su  $p$  vrednosti manje od 0,05. Za analizu podataka je korišćen program MedCalc® 14.8.1.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Vrednosti rutinskih laboratorijskih parametara i proteina akutne faze na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka pasa inficiranih *B. canis*

Analiza hematoloških parametara je pokazala da su psi na prezentaciji imali anemiju, leukopeniju i trombocitopeniju (tabela 2). Koncentracija ukupnih proteina i albumina, odnosno aktivnost GGT i PON-1 su bile niže u poređenju sa nivoima nakon kliničkog oporavka. Aktivnost AST i ALP, odnosno koncentracija CER na prezentaciji su bile veće od vrednosti dobijenih nakon kliničkog oporavka (tabela 3).

Tabela 2. Vrednosti hematoloških parametara u ispitivanim uzorcima pasa (n=24): referentni intervali, rezultati na prezentaciji i oporavku, relativne promene (medijana i interkvartilni opseg) i *p* vrednost (Wilcoxon test, *p* < 0,05 se smatra statistički značajnom).

Parametar	Referentni interval	Prezentacija	Oporavak	Relativna promena (%)	<i>p</i> vrednost
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	5,5-8,5	4,1 (3,4-5,6)	6,4 (6-7)	49,7 (24,5-92,6)	<0,001
HGB (g/L)	120-180	102,5 (79-135,5)	162 (142,5-168,5)	51,2 (20,3-97,1)	<0,001
HCT (%)	37-55	27,9 (22,9-33,6)	41 (38,2-44,2)	50,3 (23-80,3)	<0,001
MCV (fL)	60-77	65 (62,5-68)	64 (63-65)	-0,7 (-3,7-4)	0,758
MCHC (g/L)	310-340	371 (359-384)	382 (374-395)	2,6 (-0,8-7,2)	0,064
WBC ( $\times 10^9/L$ )	6-17	6,1 (4,3-8,2)	12 (9,1-14,1)	82,4 (40,5-119,2)	<0,001
NEUT ( $\times 10^9/L$ )	3-12	4,7 (3,2-7,1)	7,7 (5,9-9)	45,9 (2,3-121,6)	0,004
LYM ( $\times 10^9/L$ )	1-4,8	1 (0,6-1,6)	3,4 (2,6-4,6)	195 (134-411)	<0,001
MON ( $\times 10^9/L$ )	0,2-1,2	0,3 (0,2-0,4)	0,5 (0,3-0,7)	105,4 (-10,3-278)	0,021
PLT ( $\times 10^9/L$ )	200-500	2 (1-16)	209 (152-285)	10150 (863,2-21050)	<0,001

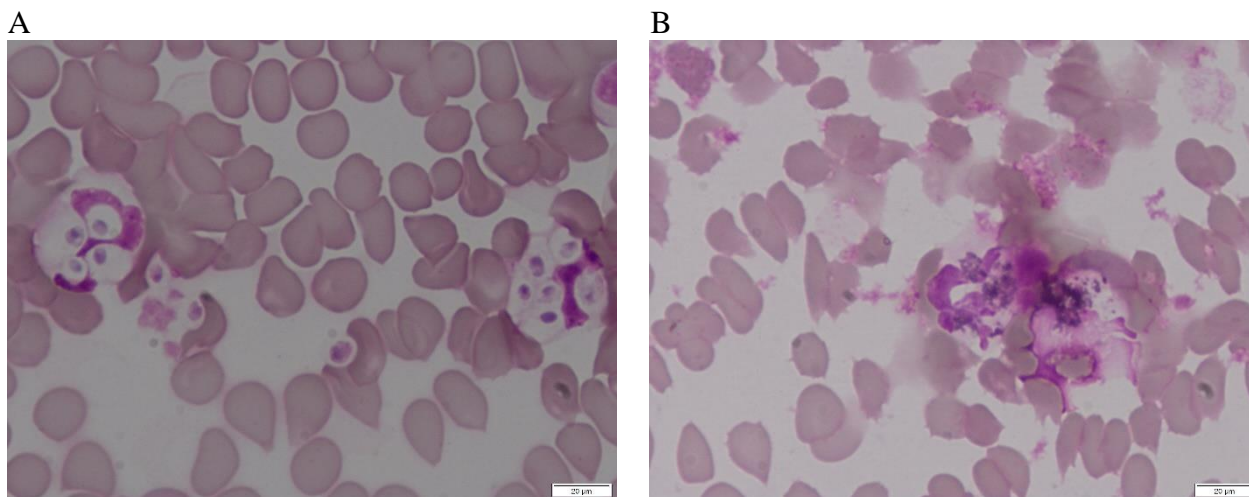
Tabela 3. Vrednosti biohemijskih parametara u ispitivanim uzorcima pasa (n=22) i nivo proteina akutne faze (broj uzoraka je naveden u superskriptu): referentni intervali, rezultati na prezentaciji i oporavku, relativne promene (medijana i interkvartilni opseg) i *p* vrednost (Wilcoxon test, *p* < 0,05 se smatra statistički značajnom).

Parametar	Referentni interval	Prezentacija	Oporavak	Relativna promena (%)	<i>p</i> vrednost
UP (g/L)	54-75	60,2 (55,7-63,2)	69,2 (65-78,1)	15,8 (9,6-30,6)	0,003
ALB (g/L)	23-31	31,2 (29,2-33,2)	39,4 (35-43,6)	27,1 (17,7-41,7)	<0,001
GLU (mmol/L)	4,2-6,6	5,4 (5,1-5,9)	5,5 (4,9-5,9)	3,3 (-14,4-14,1)	0,884
URE (mmol/L)	2,9-10	5,7 (4,1-7,8)	5,3 (3,7-6,6)	-5,8 (-39,6-29,6)	0,322
CRE (μmol/L)	54-150	104,4 (86,4-116,6)	99,6 (81,5-120)	-4,5 (-17,8-16,3)	0,426
CHOL (mmol/L)	3,5-7,5	5,5 (4,3-7)	5 (4,4-5,9)	-4,8 (-20,4-7,5)	0,119
TG (mmol/L)	0,3-1,5	0,9 (0,7-1,1)	0,7 (0,4-1,1)	-0,1 (-0,5-0,5)	0,445
BIL (μmol/L)	1,7-5,1	3,1 (2,1-5,1)	5,6 (3,2-11,9)	33,3 (-37,5-339,8)	0,123
Gvožđe (μmol/L)	15-40	40,9 (24,6-48,3)	40,8 (29,9-56,4)	7,5 (-25,2-45,9)	0,592
ALT (U/L)	10-109	28 (20-42)	33 (18-46)	-8,6 (-53-100)	0,592
AST (U/L)	13-60	57 (24-87)	16 (12-22)	-68,5 (-81,5 do -53,9)	<0,001
ALP (U/L)	11-114	262 (183-316)	265,5 (193-464)	20 (-6,6-55,4)	0,049
GGT (U/L)	1-12	6 (3-7)	8,5 (7-10)	58,3 (14,3-166,7)	0,007
AMY (U/L)	219-1215	881 (603-1251)	681 (498-872)	0,7 (-40,6-9,5)	0,249
LIP (U/L)	25-250	33,5 (17,4-89,9)	30,6 (20,9-45,4)	-34,7 (-60,2-28,8)	0,158
CK (U/L)	50-400	107 (71-160)	139 (76-169)	24,3 (-40,4-88,3)	0,465
CER (g/L) <sup>19</sup>	1-6	10,3 (7,8-14,4)	7,3 (5,1-8,2)	-35,9 (-64,9 do -13,2)	0,012
HPT (g/L) <sup>23</sup>	0,2-2,4	1,8 (1,5-2,1)	1,9 (1,8-1,9)	5,7 (-6,8-19,8)	0,144
PON-1 (U/L) <sup>19</sup>	4-7,5	2,5 (1,9-3,2)	4,1 (3,3-4,3)	62 (43,4-81,7)	<0,001

Jedina značajna razlika u relativnoj promeni ispitivanih laboratorijskih parametara između SIRS pozitivnih (n=11) i SIRS negativnih pasa (n=11) je bila prisutna kod aktivnosti AST (*p* = 0,014). Promena kod SIRS pozitivnih pasa je iznosila -78 (-87,3 do -68,5) %, a kod SIRS negativnih -57,4 (-71,5 do -5,2) %.

## 5.2. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti neutrofilnih granulocita testovima fagocitoze i oksidativnog praska *in vitro*

Sposobnost neutrofilnih granulocita da fagocituju i izazovu oksidativni prasak je testirana kod akutno inficiranih (n=7) i zdravih, kontrolnih pasa (n=7). Rezultati su dobijeni na osnovu mikroskopskog pregleda krvnog razmaza nakon izvedenog testa fagocitoze partikula zimošana (slika 1.A) i citohemijskog NBT testa (slika 1.B).

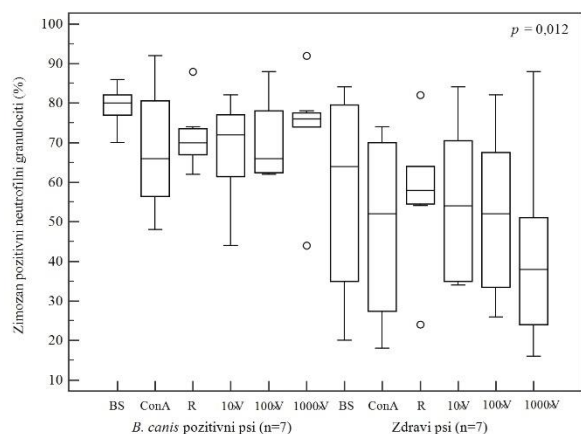


Slika 1. Prikaz (A) neutrofilnih granulocita sa fagocitovanim zimožanom i (B) oksidativnog praska u neutrofilnom granulocitu na krvnom razmazu (imerzioni objektivi, uvećanje 100×).

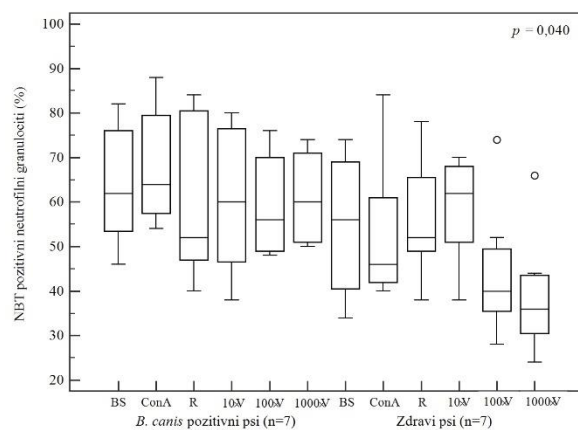
Broj neutrofilnih granulocita koji su fagocitovali zimožan je bio veći kod akutno inficiranih pasa u odnosu na zdrave pse u uslovima bez stimulatora i u uslovima sa dodatkom 1000× razblažene vakcine (grafikon 1.A). Unutar pojedinačnih grupa nije bilo značajnih razlika među uslovima.

Broj neutrofilnih granulocita zahvaćenih oksidativnim praskom je bio veći kod akutno inficiranih u odnosu na zdrave pse u uslovima sa dodatkom ConA, 100× i 1000× razblažene vakcine (grafikon 1.B). U okviru grupe akutno inficiranih pasa nije bilo značajnih razlika među uslovima. Kod zdravih pasa oksidativni prasak u neutrofilima je bio izraženiji kada su uzorci bez dodatka stimulatora, kao i oni sa dodatkom rastvarača vakcine i 10× razblažene vakcine, upoređeni sa uzorcima tretiranim 1000× razblaženom vakcinom.

A



B



Grafikon 1. Odnos broja neutrofila koji su (A) fagocitovali partikule zimožana i (B) redukovali NBT kod pasa sa akutnom babezozom i zdravih pasa. Kruskal-Wallis test sa post-hoc analizom po Conover-u,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

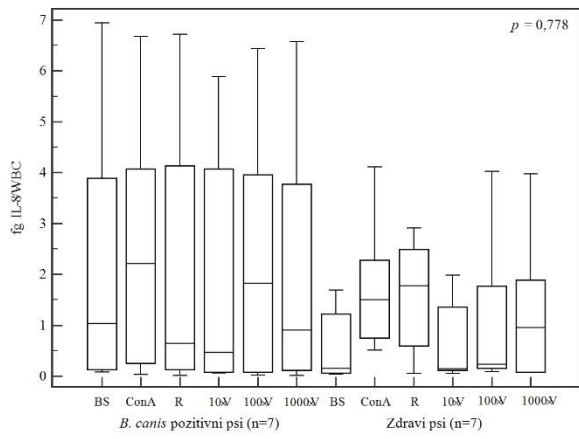
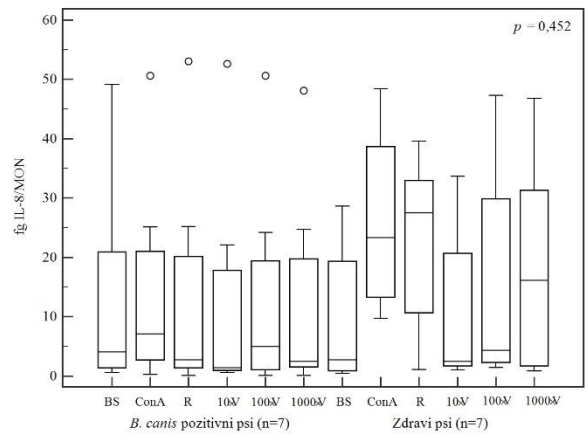
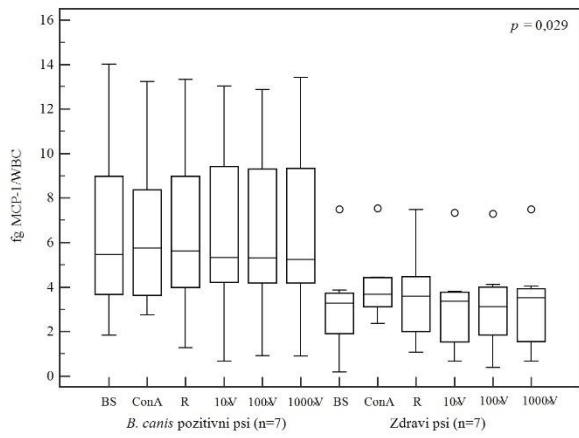
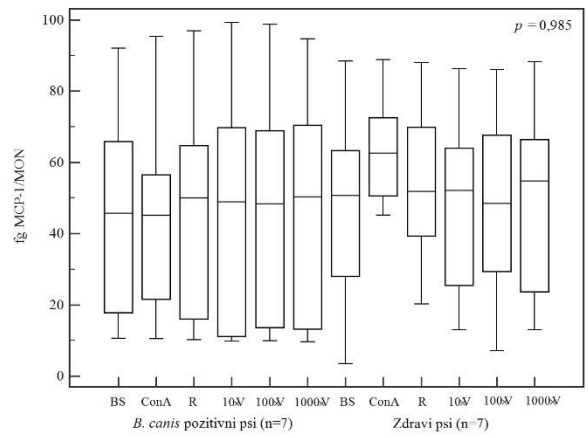
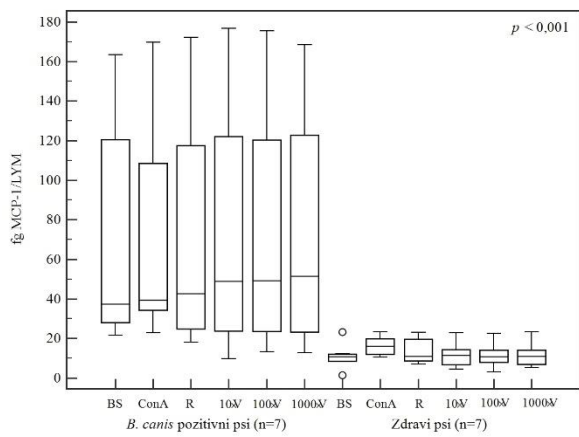
### 5.3. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita na osnovu nivoa izlučenih citokina *in vitro*

Funkcionalna aktivnost monocita i T limfocita je procenjena na osnovu koncentracije izlučenih citokina: IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$ .

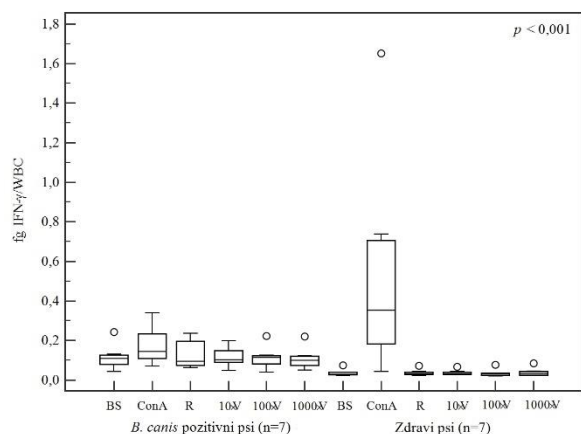
Normalizovanjem koncentracije izlučenog IL-8 prema ukupnom broju leukocita (grafikon 2.A) i monocita (grafikon 2.B) nisu dobijene značajne razlike između akutno inficiranih i zdravih pasa, odnosno između uslova unutar pojedinačnih grupa.

Koncentracija MCP-1 normalizovana prema ukupnom broju leukocita (grafikon 2.C) je bila veća kod obolelih u odnosu na zdrave pse u uslovima bez dodatka stimulatora i sa dodatkom 10 $\times$ , 100 $\times$  i 1000 $\times$  razblažene vakcine. Unutar pojedinačnih grupa nije bilo značajnih razlika u lučenju MCP-1 pod različitim uslovima. Normalizovanjem koncentracije MCP-1 na broj monocita nisu dobijene razlike između grupa i uslova unutar grupa (grafikon 2.D). Normalizovane koncentracije MCP-1 po broju limfocita su bile veće kod akutno inficiranih pasa i praćene značajnom razlikom između grupa pod svakim od šest primenjenih tretmana (grafikon 2.E).

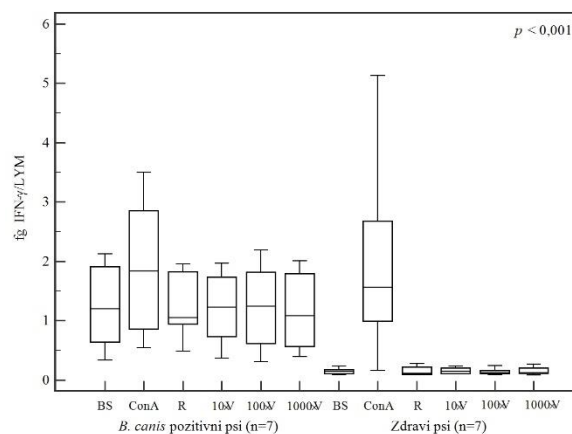
Koncentracija IFN- $\gamma$  normalizovana prema ukupnom broju leukocita (grafikon 2.F) je bila viša kod akutno inficiranih nego kod zdravih pasa u uslovima bez dodatka stimulatora i sa dodatkom rastvarača vakcine, 10 $\times$ , 100 $\times$  i 1000 $\times$  razblažene vakcine. Unutar grupe akutno inficiranih pasa nije bilo značajnih razlika u lučenju IFN- $\gamma$  pod različitim uslovima. Kod zdravih pasa su vrednosti IFN- $\gamma$ /WBC bile veće nakon stimulacije ConA u odnosu na sve ostale uslove. Navedene razlike između akutno inficiranih i zdravih pasa, odnosno između različitih tretmana u okviru iste grupe, održale su se i nakon što je koncentracija IFN- $\gamma$  normalizovana na broj limfocita (grafikon 2.G).

**A****B****C****D****E**

F



G



Grafikon 2. Koncentracija (A) IL-8/WBC, (B) IL-8/MON, (C) MCP-1/WBC, (D) MCP-1/MON, (E) MCP-1/LYM, (F) IFN- $\gamma$ /WBC i (G) IFN- $\gamma$ /LYM kod akutno inficiranih i zdravih pasa. Kruskal-Wallis test sa post-hoc analizom po Conover-u,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.



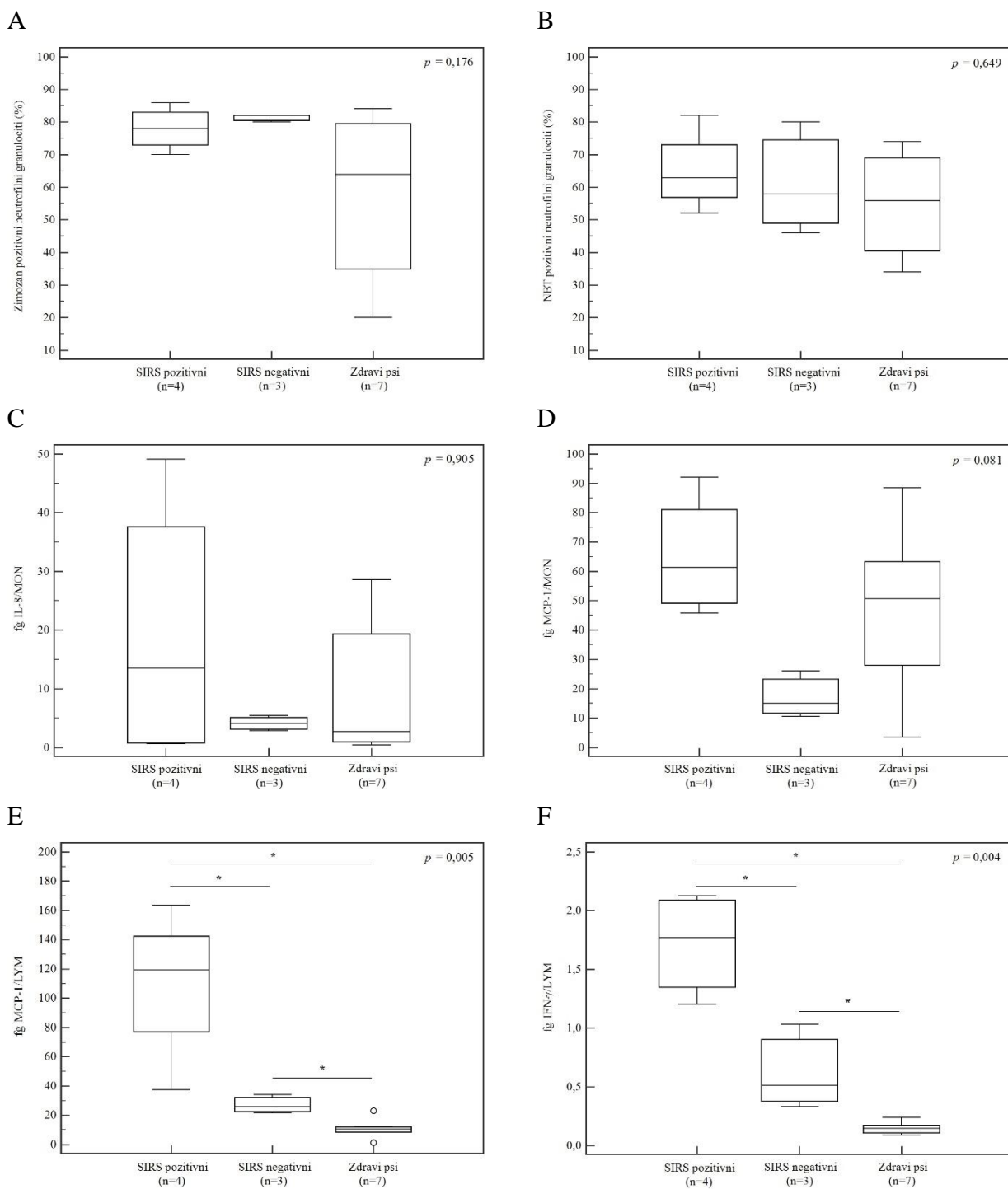
#### 5.4. Rezultati ispitivanja funkcionalne aktivnosti leukocita kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa prirodno inficiranih *B. canis*

Razlika u funkcionalnoj aktivnosti neutrofilnih granulocita, monocita i T limfocita kod akutno inficiranih SIRS pozitivnih (n=4) i SIRS negativnih (n=3) i zdravih pasa (n=7) je utvrđena na osnovu rezultata o sposobnosti neutrofila da fagocituju zimozan, odnosno izazovu oksidativni prasak, kao i na osnovu izlučenih količina IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$ .

Rezultati ispitivanja funkcionalne sposobnosti neutrofilnih granulocita da fagocituju zimozan (grafikon 3.A) i izazovu oksidativni prasak (grafikon 3.B) pokazali su da ne postoji razlika između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa inficiranih *B. canis* i zdravih pasa.

Razlike nisu bile pokazane ni kada su koncentracije IL-8 (grafikon 3.C) i MCP-1 (grafikon 3.D), normalizovane na broj monocita, upoređene između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa inficiranih *B. canis* i zdravih pasa.

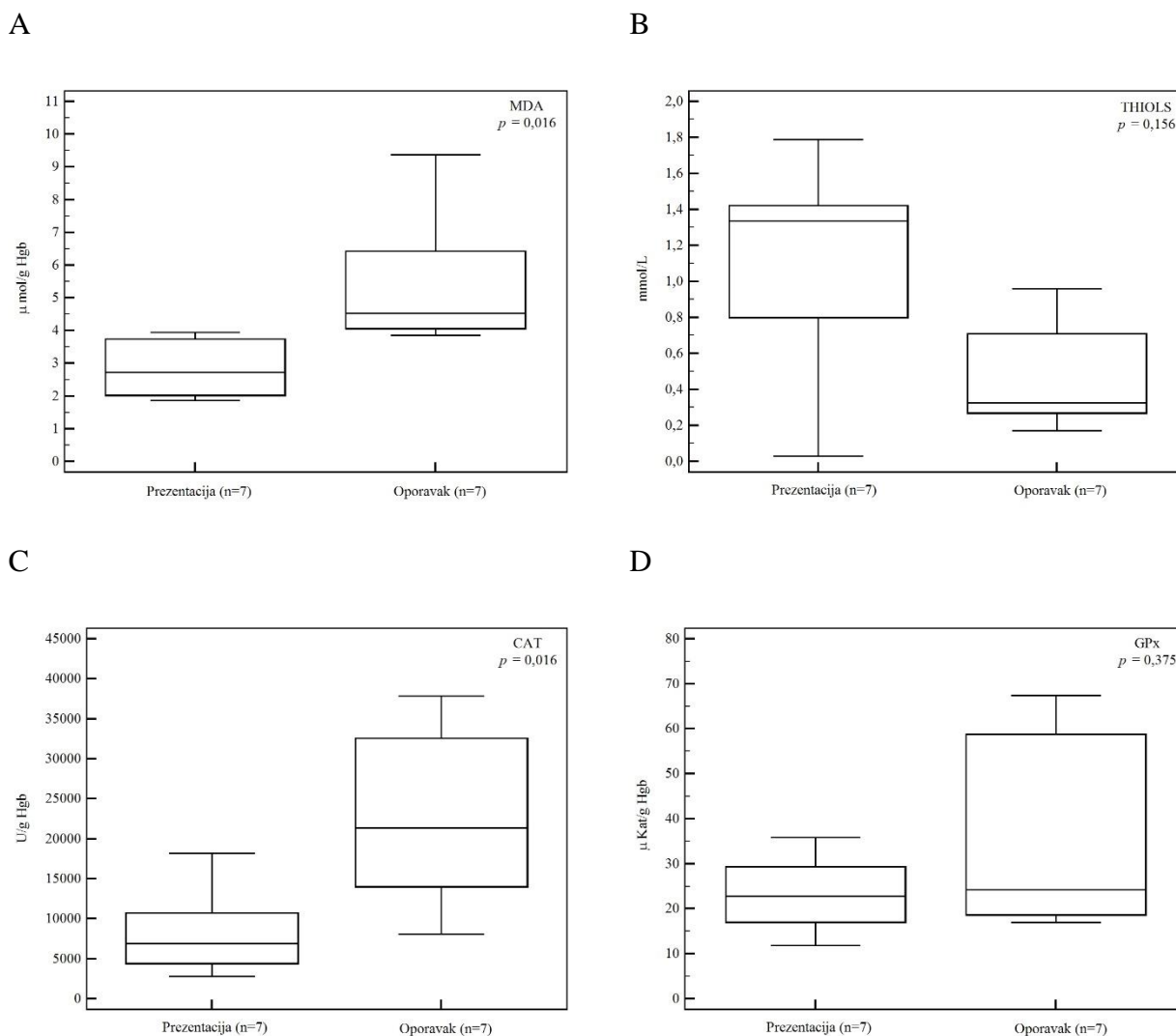
Koncentracija izlučenog MCP-1 izražena po broju limfocita se razlikovala između svih ispitivanih grupa, pri čemu su vrednosti MCP-1/LYM bile najviše kod SIRS pozitivnih, a najniže kod zdravih pasa (grafikon 3.E). Analogne razlike su bile prisutne i za koncentraciju izlučenog IFN- $\gamma$  izraženog po broju limfocita (grafikon 3.F).



Grafikon 3. Broj neutrofilnih granulocita koji su (A) fagocitovali zimozan i (B) imali pozitivan NBT test, koncentracija (C) IL-8/MON, (D) MCP-1/MON, (E) MCP-1/LYM i (F) IFN- $\gamma$ /LYM kod akutno inficiranih SIRS pozitivnih i SIRS negativnih i zdravih pasa. Kruskal-Wallis test sa post-hoc analizom po Conover-u,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom (zvezdica iznad horizontalne linije). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

## 5.5. Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Ispitivanjem vrednosti parametara oksidativnog stresa između uzoraka sedam pasa na prezentaciji i oporavku, pokazan je značajan porast koncentracije MDA u eritrocitima tokom kliničkog oporavka (grafikon 4.A), dok koncentracija ukupnih tiola u serumu nije značajno opala u toku ovog perioda (grafikon 4.B). Aktivnost CAT je porasla tokom oporavka (grafikon 4.C), dok porast aktivnosti GPx tokom oporavka nije bio značajan (grafikon 4.D).



Grafikon 4. Koncentracija (A) MDA u eritrocitima i (B) slobodnih tiolnih grupa u serumu i aktivnost (C) CAT i (D) GPx u eritrocitima. Wilcoxon test,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost.

Na prezentaciji je postojala jaka pozitivna korelacija između koncentracije MDA i aktivnosti GPx u eritrocitima. Pozitivno su korelirale koncentracija HPT u serumu i hemoglobina u krvi. Koncentracija tiola u serumu i broj leukocita u punoj krvi su pokazali jaku negativnu korelaciju (tabela 4).

Veza između MDA i GPx je očuvana i nakon oporavka. Pozitivna korelacija se pojavila između aktivnosti CAT i GPx u eritrocitima, kao i jaka pozitivna korelacija između koncentracije tiola u serumu i broja limfocita u punoj krvi (tabela 4).

Analiza relativnih promena između prezentacije i oporavka ukazala je na jaku pozitivnu korelaciju između koncentracije MDA i aktivnosti GPx u eritrocitima, kao i koncentracije tiola u serumu i broja eritrocita, odnosno koncentracije hemoglobina u punoj krvi (tabela 4).

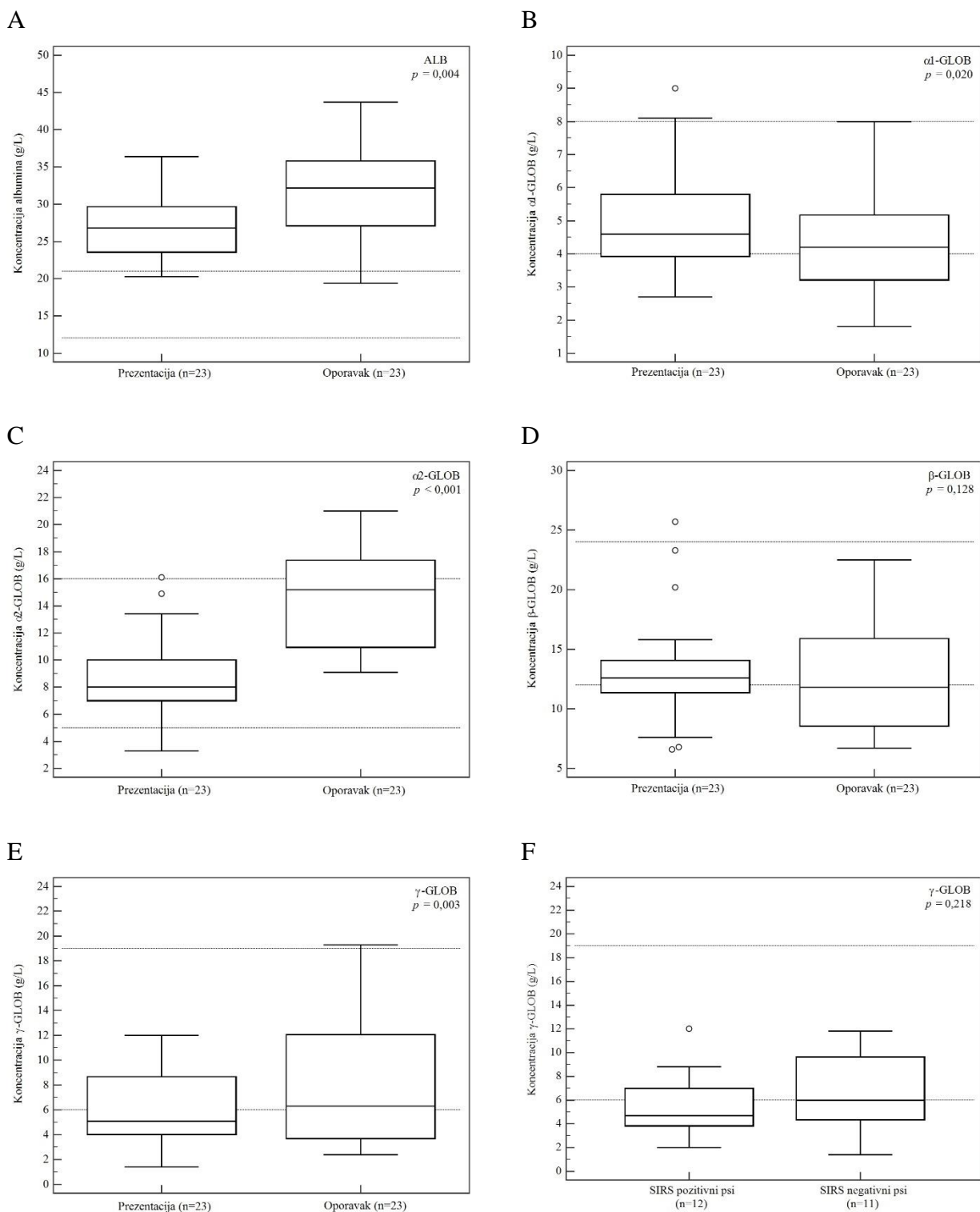
Nivo testiranih APP nije bio u korelaciji sa stepenom oksidativnog oštećenja.

Tabela 4. Korelacije između testiranih parametara: Spearman koeficijent korelacije ( $\rho$ ), 95% interval poverenja (CI),  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Broj uzoraka je naveden u superskriptu.

Parametar	Spearman $\rho$ (95% CI)	$p$ vrednost
Prezentacija		
MDA i GPx <sup>8</sup>	0,810 (0,244-0,964)	0,015
THIOLS i WBC <sup>6</sup>	-0,943 (-0,994 do -0,559)	0,005
HPT i HGB <sup>6</sup>	0,829 (0,052-0,981)	0,042
Oporavak		
MDA i GPx <sup>7</sup>	0,964 (0,771-0,995)	<0,001
CAT i GPx <sup>7</sup>	0,786 (0,080-0,967)	0,036
THIOLS i LYM <sup>7</sup>	0,881 (0,465-0,978)	0,004
Relativna promena (%)		
MDA i GPx <sup>7</sup>	0,857 (0,294-0,979)	0,014
THIOLS i RBC <sup>6</sup>	0,943 (0,559-0,994)	0,005
THIOLS i HGB <sup>6</sup>	0,886 (0,264-0,987)	0,019

## 5.6. Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnih $\gamma$ globulina i ostalih proteinskih frakcija u serumu pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka

U uzorcima seruma pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka ( $n=23$ ), određena je promena koncentracije albumina i frakcija  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  globulina, kao i razlika u koncentraciji ukupnih  $\gamma$  globulina između SIRS pozitivnih ( $n=12$ ) i SIRS negativnih ( $n=11$ ) pasa na prezentaciji. Koncentracija ALB je pokazala značajan porast tokom dvonedeljnog perioda (grafikon 5.A). Koncentracija  $\alpha_1$  globulina ( $\alpha_1$ -GLOB) je opala je tokom kliničkog oporavka (grafikon 5.B). Koncentracija  $\alpha_2$  globulina ( $\alpha_2$ -GLOB) je bila niža na prezentaciji nego na oporavku (grafikon 5.C) i kod šest pasa na prezentaciji i svih na oporavku je detektovana udvojena  $\alpha_2$  frakcija. Koncentracija  $\beta$  globulina ( $\beta$ -GLOB) se nije značajno promenila između prezentacije i oporavka (grafikon 5.D). Nivo  $\gamma$  globulina ( $\gamma$ -GLOB) je pokazao značajan porast tokom dve nedelje (grafikon 5.E). Između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa na prezentaciji nije bilo značajne razlike u koncentraciji  $\gamma$  globulina (grafikon 5.F).

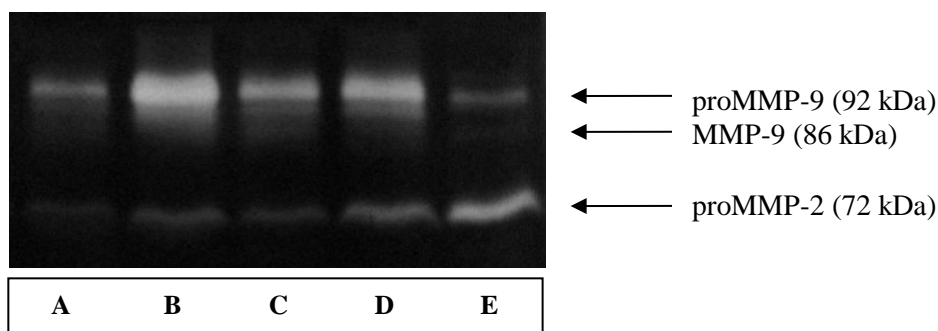


Grafikon 5. Koncentracija (A) albumina, (B)  $\alpha_1$ , (C)  $\alpha_2$ , (D)  $\beta$  i (E)  $\gamma$  globulina na prezentaciji i oporavku (Wilcoxon test,  $p < 0,05$ ), odnosno kod (F) SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa (Mann-Whitney U,  $p < 0,05$ ). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Istačkane linije predstavljaju referentne vrednosti Laboratorije za eksperimentalnu biohemiju (Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu).

## 5.7. Rezultati ispitivanja prisustva i aktivnosti želatinolitičkih matriks metaloproteinaza

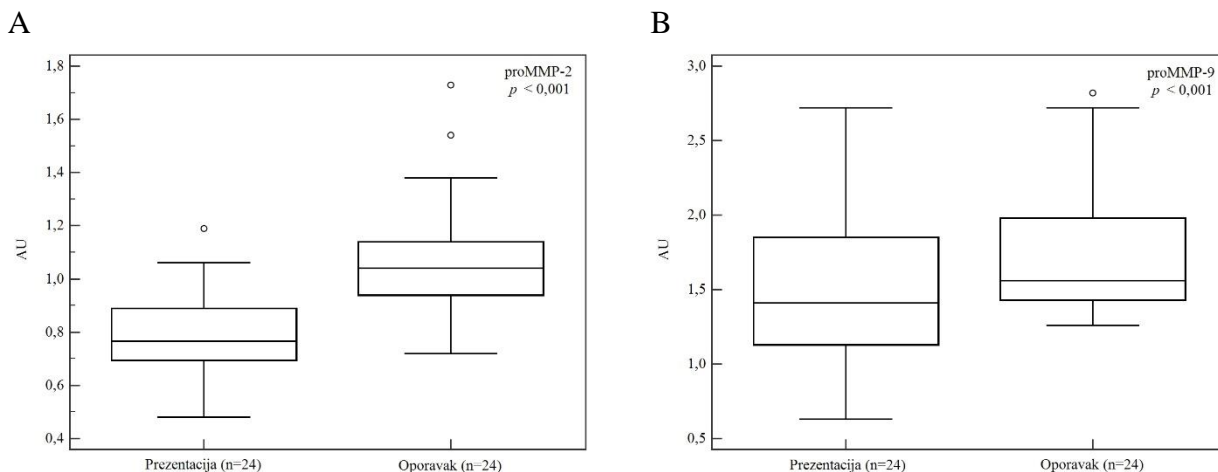
Prisustvo i aktivnost želatinolitičkih matriks metaloproteinaza je ispitana u parnim uzorcima seruma na prezentaciji i oporavku (n=24), kao i u plazmi i supernatantima leukocita poreklom od akutno inficiranih (n=7) i zdravih pasa (n=7).

Analiziranjem aktivnosti želatinaza na prezentaciji i oporavku pokazan je niži nivo proMMP-2 na prezentaciji u odnosu na oporavak, kao i odsustvo aktivne forme MMP-2 (slika 2). Nivo proMMP-9 i MMP-9 je bio niži na prezentaciji u odnosu na tačku oporavka (slika 2).



Slika 2. Zimogram parnih uzoraka seruma poreklom od pasa na prezentaciji (A, C) i nakon kliničkog oporavka (B, D); FCS (E) predstavlja pozitivnu kontrolu. Strelice ukazuju na poziciju odgovarajuće MMP.

Pokazano je značajno povišenje signala proMMP-2 (grafikon 6.A) i proMMP-9 (grafikon 6.B) tokom kliničkog oporavka. Razlika u nivou aktivne forme MMP-9 između dve tačke posmatranja nije bila značajna ( $p = 0,449$ , rezultati nisu prikazani).



Grafikon 6. Nivo (A) proMMP-2 i (B) proMMP-9 na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka. Wilcoxon test,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

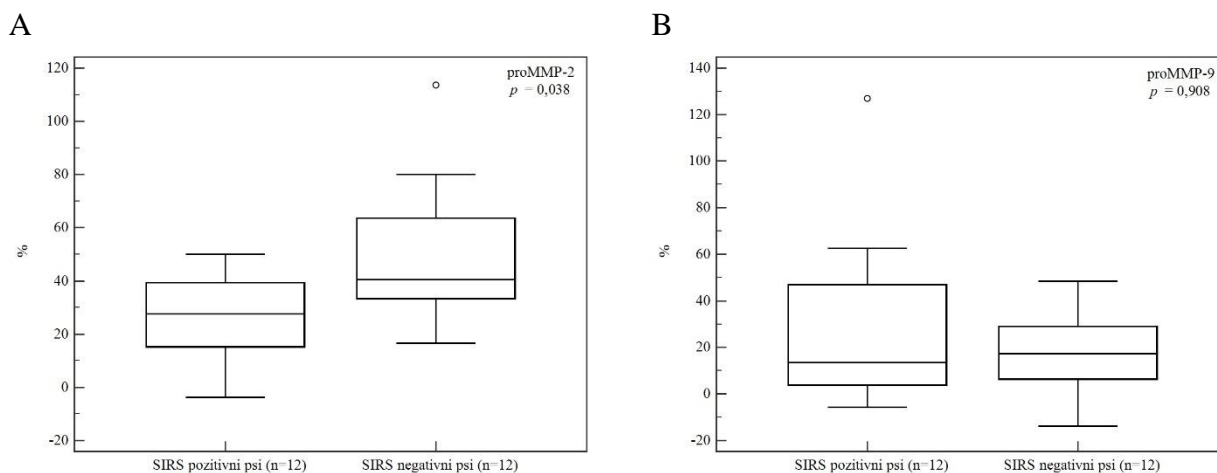
Korelacija između broja leukocita, odnosno trombocita, kao i stepena parazitemije na prezentaciji sa nivoom proMMP-2 nije bila značajna (tabela 5). Pokazana je jaka pozitivna korelacija između ukupnog broja leukocita i neutrofilnih granulocita sa nivoom proMMP-9 (tabela 5). Nivo parazitemije je bio u jakoj negativnoj korelaciji sa nivoom proMMP-9 na prezentaciji (tabela 5).

Tabela 5. Korelacije broja leukocita i trombocita ispitivanih pasa (n=24) i stepena parazitemije (n=17) sa nivoom zimogenih oblika matriks metaloproteinaza na prezentaciji: Spearman koeficijent korelacije ( $\rho$ ), 95% interval poverenja (CI),  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom.

Parametar	Nivo proMMP-2		Nivo proMMP-9	
	Spearman $\rho$	$p$ vrednost	Spearman $\rho$	$p$ vrednost
WBC ( $\times 10^9/L$ )	-0,157 (-0,527-0,264)	0,465	0,704 (0,420-0,863)	<0,001
NEUT ( $\times 10^9/L$ )	-0,307 (-0,632-0,110)	0,145	0,741 (0,482-0,881)	<0,001
LYM ( $\times 10^9/L$ )	0,034 (-0,375-0,431)	0,875	0,367 (-0,043-0,671)	0,078
MON ( $\times 10^9/L$ )	0,247 (-0,174-0,591)	0,245	0,207 (-0,214-0,563)	0,332
PLT ( $\times 10^9/L$ )	0,291 (-0,127-0,621)	0,168	0,255 (-0,165-0,597)	0,228
Parazitemija	0,334 (-0,263-0,652)	0,250	-0,616 (-0,845 do -0,192)	0,009



Poređenjem nivoa detektovanih proMMP u serumu, pokazano je da SIRS pozitivni psi imaju značajno nižu promenu proMMP-2 (grafikon 7.A), dok promena proMMP-9 ne pokazuje značajnu razliku između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa (grafikon 7.B).



Grafikon 7. Relativne promene u nivou (A) proMMP-2 i (B) proMMP-9 između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa na prezentaciji. Mann-Whitney U test,  $p < 0,05$  se smatra se statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

Analizom povezanosti relativnih promena hematoloških i biohemijskih parametara sa relativnim promenama nivoa detektovanih proMMP između prezentacije i oporavka, pokazana je značajna pozitivna korelacija između relativne promene nivoa proMMP-2 i relativnih promena broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokritske vrednosti (tabela 6). Relativna promena proMMP-9 pokazala je značajnu negativnu korelaciju sa relativnom promenom aktivnosti AST (tabela 6).

Tabela 6. Korelacije između relativnih promena vrednosti hematoloških parametara ispitivanih pasa (n=24), odnosno biohemijskih parametara (n=22) i relativnih promena nivoa zimogenih oblika matriks metaloproteinaza: Spearman koeficijent korelacije ( $\rho$ ), 95% interval poverenja (CI),  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom.

Parametar	Spearman $\rho$ (95% CI)	$p$ vrednost
Nivo proMMP-2		
RBC	0,451 (0,059-0,723)	0,027
HGB	0,445 (0,051-0,719)	0,029
HCT	0,491 (0,110-0,747)	0,015
Nivo proMMP-9		
AST	-0,461 (-0,745 do -0,037)	0,035

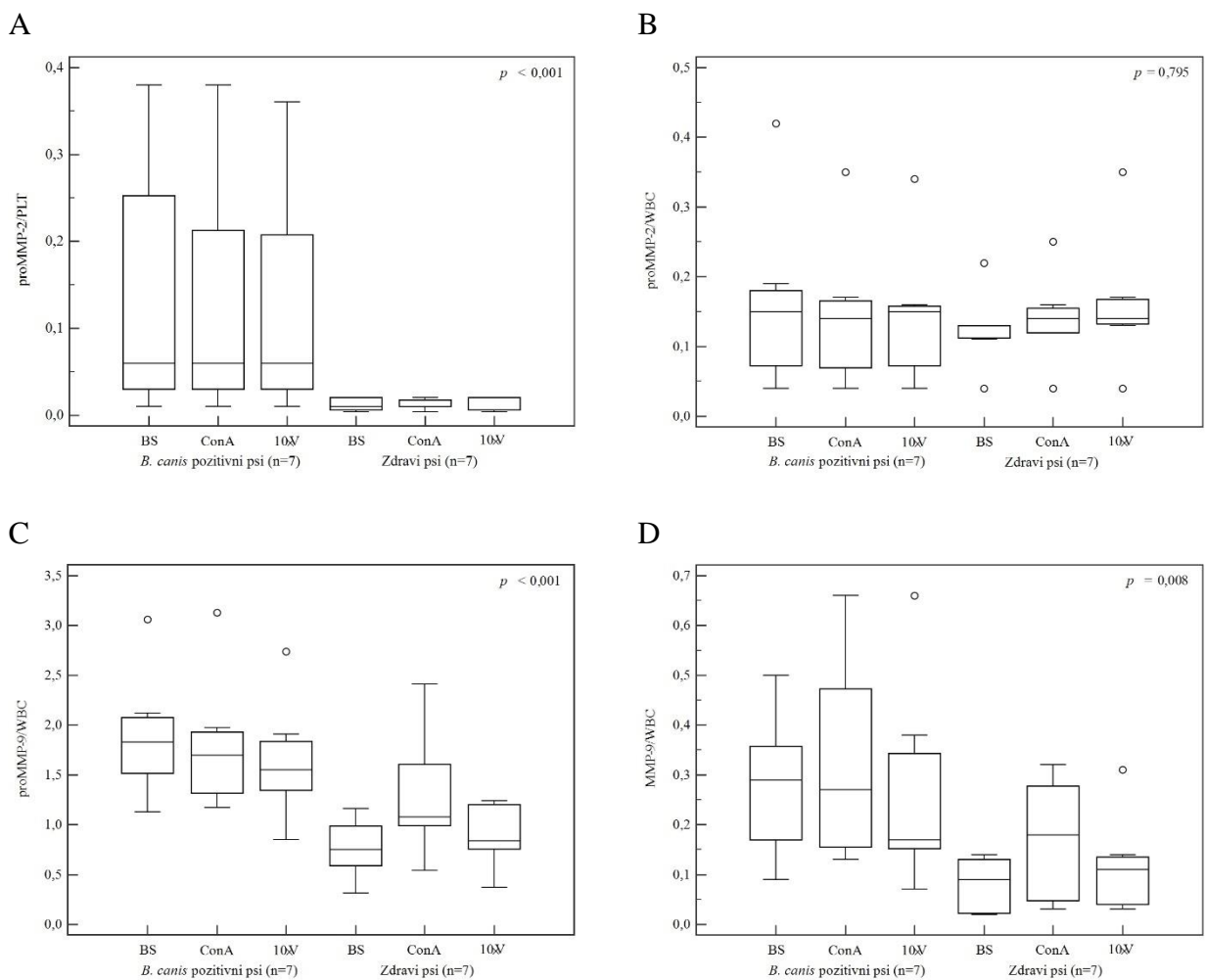
U uzorcima plazme bez i sa dodatkom ConA i 10× razblažene vakcine detektovane su proMMP-2, proMMP-9 i MMP-9. Dobijene vrednosti proMMP-2 normalizovane su prema broju trombocita i ukupnih leukocita, a nivo proMMP-9 i MMP-9 prema broju ukupnih leukocita.

Nivo proMMP-2/PLT je bio viši kod akutno inficiranih u odnosu na zdrave pse (grafikon 7.A). Utvrđena je značajna razlika proMMP-2 u uzorcima plazme bez dodatka stimulatora, sa dodatkom ConA i 10× razblažene vakcine (grafikon 8.A). U okviru grupe akutno inficiranih i grupe zdravih pasa nisu postojale značajne razlike u nivou proMMP-2 pod primenjenim tretmanima (grafikon 8.A).

Nivo proMMP-2/WBC se nije razlikovao među grupama, odnosno između tretmana u okviru pojedinačnih grupa (grafikon 8.B).

Nivo proMMP-9 normalizovan na broj ukupnih leukocita je bio viši kod pasa inficiranih babezijom (grafikon 8.C). Utvrđena je značajna razlika u uzorcima plazme bez dodatka stimulatora, sa dodatkom ConA i 10× razblažene vakcine (grafikon 8.C). Akutno inficirani psi nisu pokazali značajne razlike među uslovima. Zdrave kontrole su pokazale značajnu razliku u nivou proMMP-9 između nestimulisane i plazme sa dodatkom ConA (grafikon 8.C).

Normalizovana MMP-9 aktivnost po broju leukocita je pokazala više vrednosti kod pasa inficiranih babezijom (grafikon 8.D). Utvrđena je značajna razlika u uzorcima plazme bez dodatka stimulatora i sa dodatkom 10× razblažene vakcine (grafikon 8.D). U okviru grupe akutno inficiranih i grupe zdravih pasa nisu postojale značajne razlike u nivou MMP-9 pod različitim uslovima.

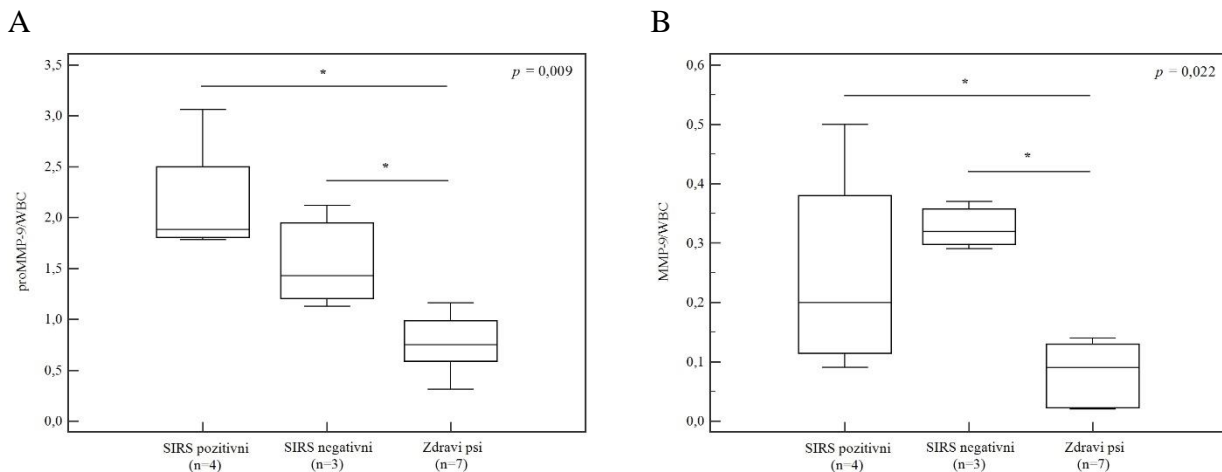


Grafikon 8. Nivo (A) proMMP-2/PLT, (B) proMMP-2/WBC, (C) proMMP-9/WBC i (D) MMP-9/WBC u uzorcima plazme akutno inficiranih i zdravih pasa. Kruskal-Wallis test sa post-hoc analizom po Conover-u,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

Analiza sposobnosti leukocita da luče zimogenu i aktivnu formu MMP-9 kod SIRS pozitivnih (n=4), SIRS negativnih (n=3) i zdravih pasa (n=7) je utvrdila značajnu razliku između grupa bez dodatka stimulatora *in vitro*.

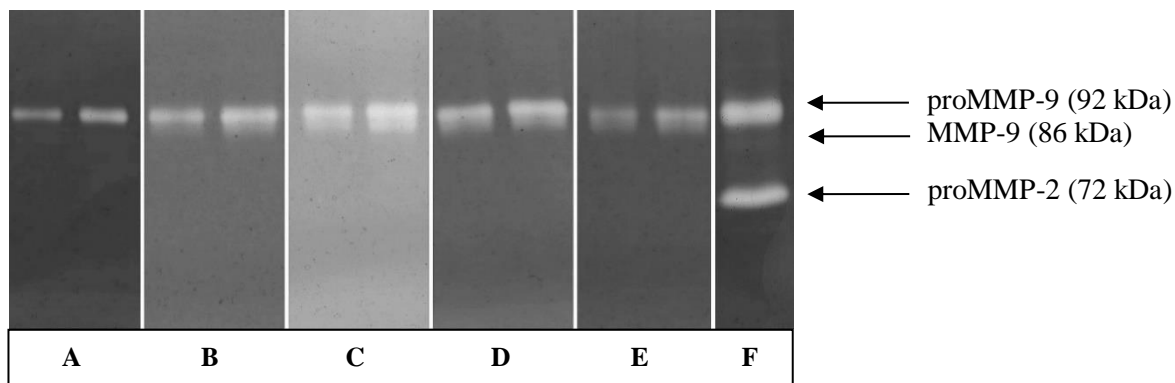
Nivo proMMP-9 izražen na ukupan broj leukocita je bio značajno viši kod SIRS pozitivnih pasa inficiranih *B. canis* u odnosu na zdrave pse, odnosno kod SIRS negativnih pasa inficiranih *B. canis* u odnosu na zdrave pse (grafikon 9.A).

Aktivnost MMP-9 izražena na ukupan broj leukocita je bila značajno veća kod SIRS pozitivnih pasa inficiranih *B. canis* u odnosu na zdrave pse, odnosno kod SIRS negativnih pasa inficiranih *B. canis* u odnosu na zdrave pse (grafikon 9.B).



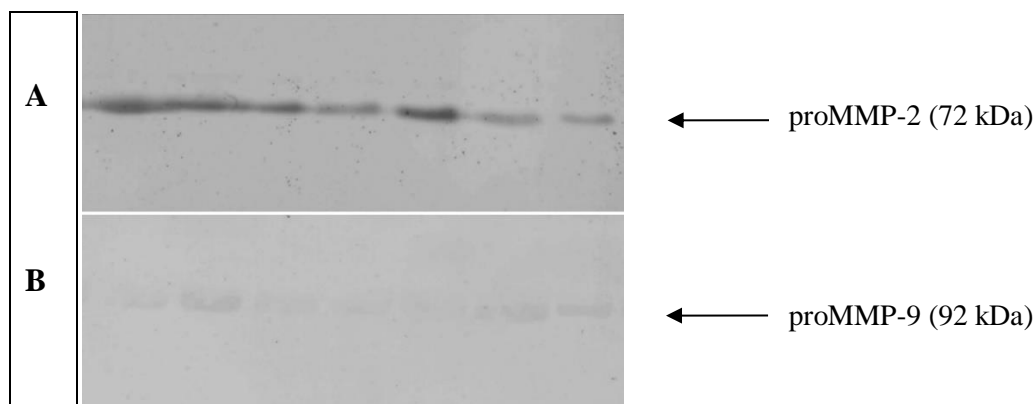
Grafikon 9. Nivo (A) proMMP-9 i (B) MMP-9 po broju leukocita kod akutno inficiranih SIRS pozitivnih i SIRS negativnih i zdravih pasa. Kruskal-Wallis test sa post-hoc analizom po Conover-u,  $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

U uzorcima supernatanta leukocita akutno inficiranih i zdravih pasa, pod nestimulisanim uslovima je detektovan signal koji odgovara proMMP-9 (slika 3.A). Supernatanti leukocita sa dodatkom LPS (slika 3.B), ConA (slika 3.C), CytB (slika 3.D) i PHA (slika 3.F) su dali jak signal na mestu proMMP-9 i nejasan, slabiji signal koji može da odgovara MMP-9. Signali su bili slabiji u uzorcima nakon 1h inkubacije u odnosu na one koji inkubirani 24h. Nije ustanovljena značajna razlika između nivoa izlučenih proMMP-9 u uzorcima bez i sa dodatkom stimulatora.



Slika 3. Zimogrami supernatanta leukocita pasa inficiranih *B. canis* (levo) i zdravih pasa (desno) pod uslovima (A) bez dodatka mitogena i (B) sa dodatkom LPS, (C) ConA, (D) CytB i (E) PHA; FCS (F) predstavlja pozitivnu kontrolu. Strelice ukazuju na poziciju odgovarajuće MMP.

U uzorcima seruma pasa na prezentaciji Western blot metodom je pokazano prisustvo proMMP-2 (slika 4.A) i proMMP-9 (slika 4.B).



Slika 4. Serumi pasa na prezentaciji testirani Western blot metodom na prisustvo (A) proMMP-2 i (B) proMMP-9.

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Promene laboratorijskih parametara i proteina akutne faze na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka pasa inficiranih *B. canis*

Vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara i nivo testiranih APP odgovaraju literaturnim podacima za akutnu infekciju protozom *B. canis* (Irwin, 2009; Schetters, 2019). Na prezentaciji su svi psi imali umerenu do jaku anemiju i izrazitu trombocitopeniju, sa leukopenijom kod polovine testiranih pasa. Nakon dve nedelje, došlo je do obnavljanja crvene i bele krvne loze, međutim, trombocitopenija se održala kod polovine testiranih pasa na oporavku. Budući da poluzivot trombocita pasa iznosi 5-7 dana (Tanaka i sar., 2002), psi koji su uspostavili homeostazu vezanu za održavanje balansa između relativno brzog stvaranja i uklanjanja trombocita iz cirkulacije, na oporavku su imali broj trombocita u okviru referentnih vrednosti. Bez dodatnih ispitivanja, nije moguće proceniti tačan uzrok trombocitopenije na oporavku kod druge polovine pasa, ali posmatrano sa patofiziološkog aspekta nastanka trombocitopenije, najizvesnije je da su ovome doprineli sporije stvaranje u kostnoj srži ili ubrzano uklanjanje trombocita imunski-posredovanim mehanizmima (Božić, 2012). Uzrok trombocitopenije kod akutne babezioze pasa je i dalje predmet istraživanja i u literaturi ne postoje podaci koji nedvosmisleno potvrđuju smanjenu proliferaciju, ubranu razgradnju i/ili potrošnju kao glavne mehanizme nastanka trombocitopenije. Rezultati ove studije ukazuju da, bilo da je u osnovi jedan ili udruženo delovanje navedenih mehanizama, kod određenog broja pasa uspostavljanje fiziološkog broja trombocita traje duže od dve nedelje.

Biohemijski parametri su kod većine pasa na prezentaciji i oporavku bili u opsegu referentnih vrednosti. Izuzetak je bila koncentracija albumina, koja je kod nešto manje od polovine pasa na prezentaciji bila iznad gornje granice referentnih vrednosti, što potvrđuje visok stepen dehidriranosti ovih jedinki u momentu akutne infekcije (Irwin, 2009). Koncentracija albumina je kod svih pasa na oporavku bila blago iznad referentnih vrednosti, što bi moglo predstavljati posledicu održavanja dehidriranosti manjeg obima i nakon dvonedeljnog oporavka, udruženog sa „povratkom“ sinteze albumina u okvir fizioloških granica i smanjenim intenzitetom APR. Relativne promene vrednosti biohemijskih parametara ukazuju da je tokom posmatranog dvonedeljnog perioda klinički oporavak uspešno protekao, odnosno da psi nisu imali oštećenje organa.

Približno polovina testiranih pasa je na prezentaciji ispunjavala uslove za SIRS, međutim, samo je relativna promena AST bila različita između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa. Značajna promena aktivnosti AST tokom oporavka, praćena fiziološkim vrednostima ALT i CK, isključuje oštećenje jetre i mišića. To dalje ukazuje da su najverovatniji izvor AST aktivirane endotelne ćelije, čija je funkcija poremećena tokom sistemske inflamacije (Goncharov i sar., 2017). Takođe, odsustvo oštećenja jetre dodatno može da objasni normalne do više koncentracije proteina i albumina na prezentaciji i oporavku.

Dinamika nivoa pozitivnih i negativnih APP je potvrdila prisustvo sistemske inflamacije na prezentaciji, koja je bila praćena oporavkom tokom dve nedelje. S obzirom na to da nije pokazana razlika u nivou APP kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa, dobijeni rezultati ukazuju da, iako su psi na prezentaciji imali viši stepen sistemske inflamacije nego na oporavku, sama klasifikacija pasa na SIRS pozitivne i SIRS negativne nije praćena razlikom u stepenu inflamacije, koja se može definisati na osnovu nivoa testiranih APP. Odsustvo razlike se može objasniti činjenicom da na nivo ispitanih APP, pored APR, utiču i drugi mehanizmi koji mogu imati suprotne efekte, poput hemolize na nivo HPT ili dehidriranosti na albuminemiju.

Pojedini biohemijski parametri su pokazali nešto veću varijabilnost nego što je bilo očekivano. Ovo se može objasniti nemogućnošću preciznog definisanja momenta infekcije i pojave kliničkih znakova. U našoj studiji, prezentacija je podrazumevala dan kada je pas doveden u ambulantu, što je primarno

zavisilo od subjektivne procene vlasnika kada je primetio znake bolesti i obratio se veterinaru, kao i od davanja tačne anamneze – kada su i da li pronađeni krpelji, kada je i koje znake bolesti pas ispoljio. Prezentacija zavisi i od rase i uzrasta psa, njegovog imunskog statusa, prethodnih susreta sa uzročnikom i stepena parazitizacije (Irwin, 2016). Sam koncept ove studije i navedene činjenice onemogućili su da se kod svih pasa utvrdi tačna faza bolesti na prezentaciji, odnosno da se zna tačno vreme infekcije.

## 6.2. Uticaj akutne infekcije *B. canis* na sposobnost fagocitoze i oksidativni prasak neutrofilnih granulocita

Rezultati testa fagocitoze su pokazali da je kod akutno inficiranih pasa bio veći broj neutrofilnih granulocita koji su imali stimulisanu fagocitnu aktivnost u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. Analogne razlike su bile prisutne i u sposobnosti aktivacije oksidativnog praska, ali samo nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*.

Ispitivanje fagocitne sposobnosti neutrofilnih granulocita pasa bez dodatka stimulatora je *in vitro* eksperimentalni model najbliži dešavanjima *in vivo*. Prisustvo većeg broja neutrofila koji su sposobni da fagocituju partikule zimožana kod akutno inficiranih u odnosu na zdrave pse može se tumačiti kao posledica prethodne aktivacije neutrofila usled *in vivo* kontakta sa uzročnikom, odnosno njegovim PAMP. Ovome može doprineti i *in vivo* mikrosredina bogata proinflamatornim materijama, među kojima mnoge mogu da aktiviraju neutrofilne granulocite i druge ćelije imunskog sistema. Takođe, rezultati u ovoj tezi su u skladu sa ponašanjem neutrofilnih granulocita kod ljudi inficiranih protozom *Plasmodium vivax* (Leorati i sar., 2012), kod kojih je procenat neutrofilnih granulocita sa fagocitovanim zimožanom bio veći kod bolesnih u odnosu na zdrave.

Broj neutrofilnih granulocita koji su fagocitovali zimožan je bio veći u krvi akutno inficiranih pasa u uslovu sa dodatkom 1000× razblaženja. S druge strane, neutrofili zdravih pasa nisu pokazali razliku u fagocitozi zimožana poredeći uslov bez stimulacije i tretmane različitim koncentracijama vakcine. Ovakvi rezultati bi mogli da ukažu da su neutrofilima, za prepoznavanje PAMP *B. canis*, neophodni činioci koji nisu bili prisutni *in vitro*.

Citohemijskim NBT testom je pokazano da je, nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*, veći udeo neutrofilnih granulocita inficiranih pasa aktivirao NADPH oksidazu i oksidativni prasak, nego što je to bio slučaj sa neutrofilima kontrolnih pasa. Slično je pokazano i kod malarije ljudi izazvane *P. falciparum* (Mordmüller i sar., 1998) i *P. vivax* (Leoratti i sar., 2012). Intenzivniji oksidativni prasak je pokazan i kod infekcije *Leishmania major* i *Leishmania infantum* (Oualha i sar., 2019), kao i kod *Leishmania brasiliensis* (Carlsen i sar., 2015; Falcão i sar., 2015).

Razlika u broju neutrofila koji su se aktivirali i reagovali oksidativnim praskom kod inficiranih pasa je porasla nakon dodavanja ConA. To potvrđuje i značajna razlika u broju neutrofila zdravih pasa, koji su aktivirali oksidativni prasak, nakon stimulacije ConA u odnosu na sve ostale tretmane. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o uticaju ConA na oslobađanje sadržaja granula neutrofila, sintezu ROS i izazivanje oksidativnog praska (Cohen i sar., 1982; Smith i Iden, 1980).

Razlike nakon dodavanja 100× i 1000× razblažene vakcine u krv inficiranih i zdravih pasa pokazale su da su niže doze vakcina uticale stimulatивно na oksidativni prasak kod inficiranih životinja. Odsustvo razlike prilikom dodavanja 10× razblažene vakcine moglo bi se posmatrati kao još jedan pokazatelj da su neutrofilni granulociti akutno inficiranih pasa bili već *in vivo* aktivirani prisustvom infektivnog agensa. Moguće je da se prilikom stimulacije ovom dozom vakcine oksidativni prasak odvio u kraćem vremenskom intervalu od trajanja testa, tako da je deo neutrofila obavio svoju funkciju i podlegao raspadanju, te je ostao neidentifikovan na razmazu. Ovome u prilog ide i to da su neutrofili kontrolnih pasa pokazali značajno viši nivo oksidativnog praska u uslovima stimulacije 10×

razblaženom vakcinom u odnosu na 1000× razblaženje, s obzirom na to neutrofili ovih pasa nisu prethodno bili u prirodnom kontaktu sa antigenom babezije.

### 6.3. Uticaj akutne infekcije *B. canis* na lučenje IL-8, MCP-1 i IFN- $\gamma$

Dobijeni rezultati su pokazali da nema razlike između akutno inficiranih i zdravih pasa u pogledu koncentracije IL-8 normirane na broj leukocita. U studiji Galán i sar. (2018) pokazano je da je infekcija *B. canis* praćena povećanom koncentracijom IL-8. Međutim, treba imati u vidu da je u pomenutoj studiji više od polovine pasa imalo komplikovanu formu babezioze, da je koncentracija IL-8 određivana u serumu i da je primenjena različita metoda. Dodatno, rezultati ove teze ukazuju i na mogućnost da leukociti i obolelih i zdravih pasa nisu reagovali na primenjene stimulatore, budući da su slične koncentracije izmerene pod svim *in vitro* primenjenim uslovima. Takođe, ovu mogućnost potvrđuje i činjenica da su razlike izostale i kada je nivo IL-8 normiran na broj monocita, koji predstavljaju glavni izvor ovog citokina.

Rezultati ove studije su pokazali da je u bazalnim uslovima i sa dodatkom solubilnog antigena vakcine *B. canis* koncentracija MCP-1 normirana na ukupan broj leukocita bila viša kod inficiranih u odnosu na zdrave pse. Služeći se literaturnim navodima da su monociti glavni izvor MCP-1, nivo MCP-1 je normiran na broj monocita kod bolesnih i zdravih pasa. Pokazan je isti opseg vrednosti za akutno inficirane i zdrave pse, odnosno da monociti inficiranih pasa značajno ne doprinose lučenju MCP-1. Rezultati dobijeni u ovoj studiji dalje upućuju na limfocite kao važnije regulatore lučenja MCP-1 što je u saglasnosti sa rezultatima Nam i sar. (2016), s obzirom na to da je normiranjem izlučenog MCP-1 na broj limfocita postojala razlika između akutno inficiranih i zdravih pasa za svaki od primenjenih tretmana. Veza između proinflamatornog MCP-1 i limfocita bi mogla da bude pokazatelj pojačanog Th1 odgovora prilikom infekcije *B. canis*, s obzirom na to da su kod inficiranih pasa normirane koncentracije MCP-1 po broju limfocita bile i do deset puta veće nego kod zdravih pasa.

Psi inficirani babezijom su pokazali više koncentracije IFN- $\gamma$  normalizovane po broju leukocita pod svim testiranim uslovima, pri čemu je razlika još više došla do izražaja nakon normalizovanja po broju limfocita. Ovim je potvrđen doprinos limfocita u regulaciji lučenja IFN- $\gamma$  (Young, 1996), odnosno da je tokom akutne infekcije *B. canis* očuvana sposobnost (Th1) limfocita da luče IFN- $\gamma$ .

Vezivanjem ConA za odgovarajuće receptore na limfocitima, stimuliše se lučenje IFN- $\gamma$  (Van Damme i sar., 1981). Poređenjem bazalnih uslova i uslova sa dodatkom ConA, pokazane su više koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije ovim mitogenom samo u okviru grupe zdravih pasa. To ukazuje da je kod akutno inficiranih pasa postojala izvesna supresija limfocita da luče IFN- $\gamma$ . Slični rezultati su pokazani prilikom infekcije protozomom *L. infantum*, kada je nakon stimulacije agonistom TLR-2 i ConA, grupa zdravih pasa pokazala više koncentracije izlučenog IFN- $\gamma$  u odnosu na inficirane pse (Martinez-Orellana i sar., 2017a).

Dodatno, rezultati su još jednom potvrdili značaj IFN- $\gamma$  u imunskom odgovoru organizma na infekciju (Schroder i sar., 2003). Analogno IGRA (*Interferon gamma release assay*) testu za utvrđivanje latentne infekcije *Mycobacterium bovis*, određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  kod infekcije *B. canis* moglo bi da nađe primenu u dizajniranju brzog testa (24h) koji će na osnovu nivoa IFN- $\gamma$  u uzorku antigenima stimulisane krvi moći da obezbedi dijagnostiku perzistentne infekcije, koja u populaciji pasa često ostane neotkrivena. Tome doprinosi dugotrajan asimptomatski period, kao i činjenica da se kod perzistentne infekcije *B. canis*, molekularnim dijagnostičkim metodama najčešće ne može utvrditi prisustvo patogena (Wlosniewski i sar., 1997).

Odsustvo razlike u okviru istih grupa nakon stimulacije uzoraka različitim koncentracijama antigena *B. canis* ukazuje da *in vitro* primenjenim dozama antigena *B. canis* ne postiže dozno-zavisna stimulacija lučenja citokina. Odsustvo očekivanog odgovora može biti posledica prevelikog ili



nedovoljnog razblaženja vakcine i/ili vremenskog intervala u kojem je sproveden test. Kod pasa se vakcinacija sprovodi u razmaku od 21 dan, tako da je jednokratna primena razblažene vakcine u trajanju od 24h mogla da utiče na dobijene rezultate. S druge strane, ovi rezultati bi mogli da potvrde slabu efikasnost vakcine (Schetters, 2005).

#### 6.4. Uticaj SIRS na funkcionalnu aktivnost leukocita kod pasa akutno inficiranih *B. canis*

Sposobnost fagocitoze i oksidativnog praska neutrofilnih granulocita SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa akutno inficiranih *B. canis* i zdravih pasa nije bila praćena razlikom između ove tri grupe. Odsustvo razlike može biti posledica malog broja uzoraka u obe podgrupe bolesnih pasa. Međutim, postoji i mogućnost da je na neutrofilnim granulocitima SIRS pozitivnih pasa eksprimirano više PD-L1 (*programmed death ligand 1*), koji u sepsi smanjuje sposobnost neutrofilnih granulocita da obave fagocitozu (Patera i sar., 2016), odnosno u slučaju rezultata ove studije, održavaju je na nivou koji je prisutan u neutrofilima SIRS negativnih i zdravih pasa. Takođe, odsustvo razlike u fagocitnoj aktivnosti između SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa može biti posledica izraženije leukopenije, odnosno neutropenije kod SIRS pozitivnih pasa.

Između akutno inficiranih SIRS pozitivnih i SIRS negativnih i zdravih pasa nije bilo razlike u lučenju IL-8 iz monocita. Ovi rezultati nisu usaglašeni sa nekim od prethodno objavljenih, koji pokazuju povišene koncentracije IL-8 kod pacijenata koji imaju SIRS i povezanost sa letalnim ishodom u sepsi (Hong i sar., 2014; Matsumoto i sar., 2018; Volpin i sar., 2014). Iz ovog razloga se čini neophodnim proveriti rezultate u obimnijoj studiji.

Koncentracije MCP-1 i IFN- $\gamma$  normalizovane na broj limfocita su bile najviše kod SIRS pozitivnih, a najniže kod zdravih pasa. Prethodna istraživanja su pokazala povišene koncentracije MCP-1 kod pasa (Johnson i sar., 2016), odnosno ljudi sa sepsom (Hong i sar., 2014; Matsumoto i sar., 2018; Zhu i sar., 2017). Galán i sar. (2018) su utvrdili vezu između porasta serumskog MCP-1 i sepse kod pasa akutno inficiranih *B. canis*. Povišen nivo MCP-1 je važan prognostički marker nepovoljnog ishoda sepse kod pasa (Montealegre i Lyons, 2021). Nivo IFN- $\gamma$  povišen je kod humanih pacijenata sa sepsom (de Pablo i sar., 2014), dok su istraživanja kod pasa limitirana i najčešće su povezana sa sepsom usled bakterijske infekcije, ali takođe pokazuju povišenje IFN- $\gamma$  (Karlsson i sar., 2012).

Rezultati izlučenih MCP-1 i IFN- $\gamma$  kod akutno inficiranih SIRS pozitivnih pasa ukazuju na očuvan i aktivan Th1 odgovor prilikom infekcije *B. canis*, odnosno na dominaciju proinflamatornih citokina. Međutim, neophodno je uzeti u obzir i činjenicu da mali broj pasa može predstavljati ograničenje, odnosno da je dobijene rezultate neophodno potvrditi u obimnijoj studiji.

#### 6.5. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita u krvi pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da su psi na prezentaciji imali narušenu redoks ravnotežu i da je oksidativno oštećenje eritrocita trajalo i nakon kliničkog oporavka pasa.

Prethodne studije su pokazale porast lipidne peroksidacije i koncentracije MDA u serumu životinja inficiranih babezijom (Crnogaj i sar., 2017; Saleh, 2009; Salem i sar., 2016), ali nijedna od njih nije uporedila vrednosti na prezentaciji odnosno u momentu umerene do teške anemije, sa vrednostima nakon oporavka. Rezultati ove studije su pokazali da postoji obrazac u održavanju redoks homeostaze u eritrocitima koji se ogleda u istovremenom porastu koncentracije MDA i aktivnosti CAT. To potvrđuje da su eritrociti zahvaćeni oksidativnim oštećenjem tokom akutne inflamacije usled *B. canis* infekcije i da su se CAT, GPx i drugi mehanizmi antioksidativne zaštite aktivirali u cilju zaštite eritrocita od oštećenja i hemolize. Nakon uspešne terapije i oporavka, broj eritrocita se vratio u okvir referentnih vrednosti, što je bilo praćeno porastom koncentracije MDA u odnosu na vrednosti na

prezentaciji. Eritrociti koji su analizirani na prezentaciji su upravo oni koji nisu bili hemolizovani usled prisustva *B. canis*. Tokom dve nedelje od infekcije, kostna srž je oslobodila mlade eritrocite i time nadoknadila polovinu cirkulišućeg pula na oporavku. Zahvaljujući relativno dugom životu eritrocita pasa (Hawkins i Whipple, 1938), eritrociti koji su analizirani nakon kliničkog ozdravljenja skoro jednako pripadaju starim i mladim eritrocitima. Upravo su ti stari eritrociti doprineli smanjenoj antioksidativnoj odbrani tokom prethodne akutne infekcije i inflamacije i podlegli oksidativnom stresu. Pozitivne korelacije između relativnih promena MDA i GPx, tiola i broja eritrocita/koncentracije hemoglobina, kao i MDA i GPx nakon ozdravljenja potvrđuju ovo objašnjenje.

Dinamika nivoa APP i tiola je potvrdila da je antioksidativni sistem u serumu sačuvao svoju efikasnost u toku bolesti. Nivo CER koji uklanja superoksidni anjon i lipidne perokside, opada tokom ozdravljenja (Goldstein i sar., 1979; Gutteridge i sar., 1981). Suprotno se dešava sa PON-1, koja neutrališe ROS i u tom procesu se inaktivira (James, 2006). Dodatno, pad koncentracije serumskih tiola između prezentacije i oporavka nije bio značajno različit. To ukazuje da su ROS delovali na molekule u plazmi, ali da su uspešno neutralisani sadejstvom CER, PON-1 i drugih mehanizama antioksidativne zaštite.

Odsustvo značajne razlike u koncentraciji HPT između prezentacije i oporavka može indirektno da ukaže na hemolizu kao deo patogeneze babezioze (Reyers, 1998). Na prezentaciji, nivo HPT, kao pozitivnog APP, predstavlja ravnotežu između veće proizvodnje u hepatocitima i potrošnje usled određenog stepena hemolize (Matijatko i sar., 2007). Jaka pozitivna korelacija između HPT u serumu i HGB u punoj krvi može podržati ovo objašnjenje. Efikasno uklanjanje slobodnog hemoglobina je suština antioksidativne zaštite prilikom intravaskularne hemolize, s obzirom na to da slobodni hem inicira nastanak ROS u plazmi (Duvigneau i sar., 2019; Hasan i Schafer, 2008). Suprotno se dešava na oporavku – i sinteza u jetri i intravaskularno trošenje opadaju.

Osim slobodnog hema, tokom inflamacije ROS nastaju i kao posledica aktiviranih neutrofila i monocita. Na prezentaciji je postojala jaka negativna korelacija između nivoa tiola u serumu i ukupnog broja leukocita što ukazuje na doprinos ovih ćelija u nastanku oštećenja izazvanih putem ROS. Na prezentaciji, tiolne grupe su pokazale korelaciju sa brojem limfocita, što daje prostor za detaljniju studiju kako bi se ovaj rezultat tačnije objasnio.

#### 6.6. Koncentracija $\gamma$ globulina i ostalih proteinskih frakcija u serumu pasa na prezentaciji i nakon kliničkog oporavka

Elektroforetska analiza proteinskih frakcija je pokazala razliku između vrednosti albumina na prezentaciji i oporavku, što je bilo u saglasnosti sa rezultatima dobijenim metodom primenjenom na biohemijskom analizatoru. Viša koncentracija  $\alpha$ 1-GLOB na prezentaciji u odnosu na oporavak potvrđuje odgovor akutne faze (Kaneko i sar, 1997). Nivo  $\alpha$ 2-GLOB je bio niži na prezentaciji u odnosu na tačku oporavka. Pojava udvojene frakcije  $\alpha$ 2-GLOB u skladu je sa literaturnim podacima za infekciju *B. canis* i prisustvo hemolize (Tothova i sar., 2020). U ispitivanim uzorcima detektovane su udvojene  $\alpha$ 2 frakcije kod šest pasa na prezentaciji i svih pasa na oporavku. Dalje, HPT na oporavku je bio delimično slobodan, a delimično u kompleksu sa HGB, što je rezultovalo jačim signalom, odnosno udvojenom zonom  $\alpha$ 2 frakcije. Nivo  $\beta$ -GLOB je ostao nepromenjen između dve posmatrane tačke, čak su vrednosti kod određenog broja pasa bile ispod referentnih i na prezentaciji i na oporavku. To nije tipičan nalaz odgovora akutne faze, kada bi se očekivalo da će ova frakcija biti viša kod akutno inficiranih pasa. Prema O'Connell i sar. (2005), ponekad se u  $\beta$  zonu „smeštaju“ IgA, IgM i IgG, što daje osnovu za pretpostavku da se deo imunoglobulina, sintetisanih u periodu oporavka, nalazi u  $\beta$  zoni, usled čega je došlo do njenog porasta i izostanka razlike u odnosu na prezentaciju. Porast nivoa  $\gamma$ -GLOB od prezentacije do oporavka najverovatnije predstavlja posledicu proizvodnje imunoglobulina, kao odgovor na infekciju i odražava očuvanu aktivnost B limfocita kod pasa akutno

inficiranih *B. canis*, na koju nije uticalo prisustvo SIRS. Imajući u vidu da su koncentracije  $\gamma$ -GLOB kod više od polovine pasa na prezentaciji bile ispod referentnog intervala, možemo zaključiti da Th2 odgovor još uvek nije bio aktiviran, a plazma ćelije nisu bile dovoljno stimulirane da luče antitela (Baumgarth i sar., 2020).

#### 6.7. Prisustvo i aktivnost želatinolitičkih MMP u krvi pasa akutno inficiranih *B. canis*

Rezultati ove studije su pokazali da su u serumu nivoi proMMP-2 i proMMP-9 niži tokom akutne *B. canis* infekcije u odnosu na fazu oporavka, a da je nivo proMMP-2 niži kod pasa koji imaju SIRS. Na prezentaciji, nizak nivo proMMP-9 pratio je sniženi broj leukocita i neutrofilnih granulocita, dok se suprotno desilo sa parazitacijom. Tokom oporavka porast proMMP-2 pratio je oporavak crvene krvne loze. Istovremeno, povećanje proMMP-9 povezano je sa smanjenjem aktivnosti AST.

Nivo proMMP-2 i proMMP-9 je bio niži u serumu akutno inficiranih pasa poredeći sa vrednostima dobijenim na oporavku. U obe posmatrane tačke, aktivna forma MMP-9 detektovana na gelu, pokazivala je sličan intenzitet i nije bila praćena korelacijama sa ukupnim brojem leukocita tj. neutrofila. Međutim, očekivano je da tokom inflamacije aktivnost MMP-9 raste (Yazdan-Ashoori i sar., 2011). U ovoj studiji, odsustvo razlike između serumske MMP-9 na prezentaciji i oporavku bi se moglo pripisati poremećaju aktivacione dinamike između zimogena i aktivne forme.

Inflamacija, a naročito SIRS, utiču na sekreciju i aktivaciju proMMP-2 i proMMP-9 (Yazdan-Ashoori i sar., 2011). Međutim, literaturni podaci za proMMP-2 i MMP-2 nisu dosledni, jer je pokazano da je njihov nivo ili nepromenjen (Hoffmann i sar., 2006) ili povišen (Yazdan-Ashoori i sar., 2011). Pomenute studije nisu pokazale da postoji aktivna forma MMP-2 u uzorcima plazme ili seruma, koja takođe nije detektovana ni u uzorcima ispitanim u ovoj studiji. Najverovatnije objašnjenje ovakvih rezultata može pružiti činjenica da se aktivacija proMMP-2 dešava na endotelnoj strani bazalne membrane i koordinirana je preko MT-1-MMP i TIMP (Elkington i sar., 2005; Yana i Seiki, 2002). Nivo TIMP raste tokom inflamacije i sepse kod ljudi (Hoffmann i sar., 2006; Yazdan-Ashoori i sar., 2011). Kako je inflamacija kod babezioze povezana sa aktivacijom endotelnih ćelija (Kuleš i sar., 2017), opravdano je pretpostaviti da je nizak nivo proMMP-2 u akutnoj *B. canis* infekciji povezan sa porastom TIMP i/ili vezivanjem proMMP-2 za membranu aktiviranih endotelnih ćelija.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazali su da nivo proMMP-2 u serumu nije u korelaciji sa brojem leukocita/neutrofila, što ukazuje da oni ne doprinose regulaciji proMMP-2 ekspresije. To je dalje potvrđeno time što izolati leukocita nisu dali signal na mestu (pro)MMP-2. Takođe, pokazano je da trombociti ljudi predstavljaju izvor (pro)MMP-2 (Momi i sar., 2009), tako da trombocitopenija akutno inficiranih pasa može biti dodatni uzrok niskog nivoa proMMP-2 na prezentaciji. U ovoj studiji, teška trombocitopenija može da objasni odsustvo korelacija između broja trombocita i nivoa proMMP-2 na prezentaciji. Pozitivna korelacija između relativnih promena u nivou proMMP-2 i eritrocitnoj lozi upućuju na istovremenu regeneraciju i remodelovanje eritroidnog odeljka kostne srži i funkcije endotelnih ćelija, kojima može doprineti i povećanje broja trombocita na oporavku.

Nivo proMMP-9 u serumu je takođe bio niži na prezentaciji u odnosu na fazu oporavka. Nivo proMMP-9 je pokazao korelacije sa brojem leukocita i neutrofila na prezentaciji, ali ta korelacija nije očuvana kada su testirane relativne promene ovih parametara. Može se smatrati da na prezentaciji gotovo celokupna količina proMMP-9 potiče iz neutrofilnih granulocita, budući da se, zbog jake trombocitopenije, trombociti mogu isključiti kao izvor. U serumu, nivo proMMP-9 u velikoj meri zavisi od broja odnosno aktivacije neutrofilnih granulocita. Pozitivna korelacija broja neutrofilnih granulocita i nivoa proMMP-9 na prezentaciji se može objasniti time da su neutrofilni bili aktivirani, što dovodi do degranulacije i oslobađanja zimogene forme u cirkulaciju. Kako su se psi oporavljali, stepen aktivacije neutrofila je postepeno opadao i korelacija je nestala. Dodatno, može se pretpostaviti da je manja količina proMMP-9 u serumu na prezentaciji u odnosu na oporavak delimično i posledica

„utroška“ leukocita u cilju eliminisanja patogena (Bilić i sar., 2018), što bi moglo objasniti i negativnu korelaciju između nivoa proMMP-9 i parazitemije na prezentaciji. Recipročna dinamika između proMMP-9 i AST može biti posledica eliminacije patogena nakon primene terapije i oporavka funkcije endotelnih ćelija.

Ova studija je pokazala značajne promene u koncentracijama i aktivnosti APP, ali ne i njihovu povezanost sa detektovanim proMMP. To potvrđuje da sekrecija i aktivacija proMMP nije samo posledica dejstva proinflamatornih citokina, već zavisi i od stepena oksigenacije, hormona, aktivnosti serin proteaza (plazmin, trombin) i inhibitora MMP (Sternlicht and Werb, 2001).

Infekcije protozoama rodova *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* i *Trypanosoma* praćene su povišenjem nivoa MMP (uključujući MMP-2 i MMP-9) i odražavaju remodelovanje tkiva tokom migracije parazita (Geurts i sar., 2012). Psi sa akutnom infekcijom *B. canis* pokazali su snižene vrednosti ovih MMP. S obzirom na to da su MMP-9 deficitarni miševi rezistentni na endotoksični šok (Dubois i sar., 2002), moguće je pretpostaviti da su leukopenija i snižene vrednosti MMP zapravo mehanizmi koji štite obolele pse od progresije SIRS u stanje šoka i pojave multiorganskih komplikacija. Ostaje otvoreno pitanje da li je pretpostavljeni mehanizam zaista relevantan u biološkom i kliničkom smislu (Renckens i sar., 2006).

U odnosu na zdrave pse, kod akutno obolelih pasa je zabeležen viši nivo proMMP-2 normiran na broj trombocita, ali je razlika izostala kada je nivo proMMP-2 normiran na broj leukocita. Prisustvo znatno višeg nivoa proMMP-2 kod bolesnih pasa u bazalnim uslovima, kao i nakon *in vitro* kontakta sa ConA, odnosno solubilnim antigenom *B. canis*, ukazuje da je ova dinamika proMMP-2 prvenstveno posledica infekcije *B. canis*. Odsustvo značajne razlike između nivoa proMMP-2 nakon normalizacije prema broju leukocita dodatno potvrđuje stanovište da leukociti ne predstavljaju značajne izvore (pro)MMP-2.

U uzorcima plazme bez i sa dodatkom stimulatora zabeleženi su viši nivoi proMMP-9 i MMP-9 kod akutno obolelih u odnosu na zdrave pse. Normalizacijom nivoa proMMP-9 u plazmi prema broju leukocita pokazana je značajna razlika između pacijenata i zdravih pasa pod svim testiranim uslovima. Najjači signal proMMP-9 je bio pod bazalnim uslovima, dok je dodavanjem ConA i 10× razblažene vakcine, nivo zimogena opadao. Ovakav rezultat može da bude posledica intenzivnijeg prelaska proMMP-9 u MMP-9 pod navedenim uslovima, što i potvrđuju više vrednosti MMP-9 pod stimulišućim u odnosu na bazalne uslove. Kod zdravih pasa je zabeležen pozitivan odgovor na delovanje ConA u smislu viših nivoa proMMP-9 i MMP-9 u odnosu na ostala dva uslova, što je u skladu sa literaturnim podacima (Ribeiro i sar., 2018). U slučaju pasa inficiranih *B. canis* ovo se dešava pod uticajem analognih mitogena prisutnih u plazmi (Manicone i McGuire, 2008; Sternlicht and Werb, 2001), što dodatno potvrđuje da je uloga leukocita odnosno neutrofila u lučenju MMP-9 ostala očuvana kod akutno obolelih pasa.

Između SIRS pozitivnih i zdravih pasa, odnosno SIRS negativnih i zdravih pasa je postojala značajna razlika u lučenju i proMMP-9 i MMP-9 u odnosu na broj leukocita. Dobijeni rezultati ukazuju da postoji razlika u oslobađanju sadržaja granula samo između akutno obolelih i zdravih pasa i da je ono intenzivnije kod pacijenata. Povišene koncentracije proMMP-9 i MMP-9 kod SIRS pozitivnih i SIRS negativnih pasa u odnosu na kontrolne pse nisu bile praćene i razlikama u fagocitozi i oksidativnom prasku u neutrofilnim granulocitima. Odsustvo razlika bi moglo da se objasni slabijim prelaskom zimogene u aktivnu formu, usled čega je suprimirana aktivnost MMP-9 i usporena hemotaksa, odnosno poremećena fagocitoza i oksidativni prasak kod SIRS pozitivnih pasa. Neophodno je napomenuti da je opisane promene potrebno potvrditi u studiji koja bi uključila veći broj pasa.

Dobijeni rezultati su pokazali odsustvo proMMP-2 i MMP-2 u supernatantima leukocita poreklom od akutno inficiranih i zdravih pasa. U supernatantima leukocita poreklom od pasa sa nekomplikovanom babezozom i zdravih pasa utvrđen je jak signal poreklom od proMMP-9. Kako su u supernatantima dominirali neutrofilni granulociti, ovaj nalaz je saglasan sa rezultatima eksperimenata na humanim neutrofilima u uslovima kada oni nisu stimulisani proinflamatornim medijatorima (Opdenakker i sar., 2001). U uzorcima izolovanim nakon stimulacije mitogenima i 1h inkubacije potvrđen slabiji signal ispod proMMP-9 koji je u uzorcima nakon 24h zamaskiran širom zonom proMMP-9. Ovaj signal može da odgovara MMP-9, koja je detektovana u serumu pasa kako u ovoj tako i u prethodnim studijama (Melo i sar., 2011; Prakash Krupakaran i sar., 2016). To ukazuje da su u plazmi prisutni aktivatori koji su neophodni za prelazak zimogene u aktivnu formu MMP. Ovo bi dodatno moglo da potvrdi odsustvo značajne razlike u nivou proMMP-9 između ConA stimuliranih leukocita inficiranih i zdravih pasa, s obzirom na to da se ConA vezuje za SHPS-1 (*protein tyrosine phosphatase substrate 1*) i indukuje lučenje MMP-9 (Ribeiro i sar., 2018).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Kod pasa sa nekomplikovanom babeziozom usled prirodne infekcije protozooom *B. canis* mogu se uočiti sledeće promene funkcionalne aktivnosti leukocita u perifernoj krvi:
  - a. Fagocitna aktivnost neutrofilnih granulocita u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis* je izraženija nego kod zdravih pasa. Analogne razlike u intenzitetu oksidativnog praska se uočavaju samo nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. Prisustvo SIRS nije povezano sa opisanim razlikama.
  - b. T limfociti sekretuju veću količinu IFN- $\gamma$  u odnosu na zdrave pse kako u bazalnim uslovima, tako i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. Nivo IFN- $\gamma$  je najviši kod SIRS pozitivnih pasa.
  - c. Ukupni leukociti sekretuju veću količinu MCP-1 u odnosu na zdrave pse kako u bazalnim uslovima, tako i nakon *in vitro* kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. Prisustvo SIRS nije povezano sa opisanim razlikama.
2. Tokom nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije protozooom *B. canis* ukupni leukociti obolelih pasa nisu stimulisani da izlučuju veće količine IL-8 u poređenju sa zdravim psima.
3. *In vitro*, leukociti pasa ne luče proMMP-2, ali luče proMMP-9 i MMP-9. Leukociti obolelih pasa, a posebno SIRS pozitivnih, *in vitro* luče više proMMP-9 i MMP-9 u poređenju sa leukocitima zdravih pasa, kako u bazalnim uslovima, tako i nakon kontakta sa solubilnim antigenom *B. canis*. *In vivo*, u serumu pasa sa nekomplikovanom babeziozom, nivo proMMP-9 je niži nego na oporavku. Nivo proMMP-9 u serumu nije povezan sa prisustvom SIRS.
4. Oporavak od nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije protozooom *B. canis* prati diferencijacija B limfocita u plazma ćelije koje sintetišu imunoglobuline, na šta ukazuje porast koncentracije  $\gamma$  globulina u serumu obolelih pasa. Porast te koncentracije se ne razlikuje između SIRS pozitivnih i negativnih pasa.
5. Porast koncentracije malondialdehida u eritrocitima je odraz oksidativnog oštećenja eritrocita tokom oporavka od nekomplikovane babezioze usled prirodne infekcije protozooom *B. canis*. Istovremeni porast aktivnosti katalaze i stabilna koncentracija tiola u serumu pokazatelji su očuvanosti antioksidativne zaštite tokom istog perioda. Nivo proteina akutne faze i prisustvo SIRS nije povezano sa stepenom oksidativnog oštećenja.
6. Sveobuhvatno posmatrano, rezultati upućuju na zaključak da je aktivnost neutrofilnih granulocita i limfocita kod SIRS pozitivnih i negativnih pasa sa nekomplikovanom babeziozom pojačana, ali da se stepen oštećenja tkiva ne razlikuje između ove dve grupe, najverovatnije zahvaljujući tome što su zaštitni mehanizmi adekvatno očuvani.

## 8. LITERATURA

1. Abate O, Zanatta R, Malisano T, Dotta U, 2000. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). *Vet J.* 159: 154-160.
2. Abram CL, Lowell CA, 2009. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 27: 339-362.
3. Adrian A, Schoppmann K, Sromicki J, et al., 2013. The oxidative burst reaction in mammalian cells depends on gravity. *Cell Commun Signal.* 11: 98.
4. Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, et al., 1998. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol.* 63: 108-116.
5. Akira S, Takeda K, 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4: 499-511.
6. Almeida IC, Gazzinelli RT, 2001. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol.* 70: 467-477.
7. Altıparmak IH, Erkuş ME, Sezen H, et al., 2016. The relation of serum thiol levels and thiol/disulfide homeostasis with the severity of coronary artery disease. *Kardiol Pol* 74: 1346-1353.
8. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L, 1996. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunol.* 89: 563-568.
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 7915-7922.
10. Arend WP, Palmer G, Gabay C, 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 223: 20-38.
11. Arnér ES, Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267: 6102-6109.
12. Asawakarn S, Sirisawadi S, Kunasut N, Kamkong P, Taweethavonsawat P, 2021. Serum protein profiles and C-reactive protein in natural canine filariasis. *Vet World.* 14: 860-864.
13. Asri Rezaei S, Dalir-Naghadeh B, 2006. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol.* 142: 179-186.
14. Ates I, Kaplan M, Yuksel M, et al., 2016. Determination of thiol/disulphide homeostasis in type 1 diabetes mellitus and the factors associated with thiol oxidation. *Endocrine* 51: 47-51.
15. Auf dem Keller U, Prudova A, Eckhard U, et al., 2013. Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. *Sci Signal.* 6: rs2.
16. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD, 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 15: 563-591.
17. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG, 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 134: 907-934.
18. Bal C, Büyükşekerci M, Koca C, et al., 2016. The compromise of dynamic disulphide/thiol homeostasis as a biomarker of oxidative stress in trichloroethylene exposure. *Hum Exp Toxicol.* 35: 915-920.
19. Baumgarth N, Nikolich-Zugich J, Lee FEH, Bhattacharya D, 2020. Antibody responses to SARS-CoV-2: Let's stick to known knowns. *J Immunol.* 205: 2342-2350.
20. Beck R, Vojta L, Mrljak V, et al., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol.* 39: 843-848.
21. Becker K, Gromer S, Heiner Schirmer R, Müller S, 2000. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem.* 267: 6118-6125.

22. Beletić A, Janjić F, Radaković M, et al., 2021. Systemic inflammatory response syndrome in dogs naturally infected with *Babesia canis*: Association with parasite load and host factors. *Vet Parasitol.* 291: 109366.
23. Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, et al., 2018. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (Ageing and chronic disease). *J Clin Med.* 7: 400.
24. Bertram TA, 1985. Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med.* 30: 91-129.
25. Beutler B, Rietschel ET, 2003. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 3: 169-176.
26. Bielski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW, 1983. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 258: 4759-4761.
27. Bilić P, Kuleš J, Barić Rafaj R, Mrljak V, 2018. Canine Babesiosis: Where Do We Stand? *Acta Vet Beograd.* 68: 127-160.
28. BIO-RAD General protocol for Western blotting, [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6376.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6376.pdf).
29. Birkenheuer AJ, Neel J, Ruslander D, Levy MG, Breitschwerdt EB, 2004. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet Parasitol.* 124: 151-160.
30. Birkenheuer AJ, Correa MT, Levy MG, Breitschwerdt EB, 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 227: 942-947.
31. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 385: 729-733.
32. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC, 1998. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435: 29-34.
33. Boozer LA, Macintire DK, 2003. Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33: 885-904.
34. Boring L, Gosling J, Chensue SW, et al., 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in CC-chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 100: 2552-2561.
35. Borregaard N, Cowland JB, 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89: 3503-3521.
36. Bosch SS, Kronenberger T, Meissner KA, et al., 2015. Oxidative stress control by apicomplexan parasites. *Biomed Res Int.* 2015: 351289.
37. Božić T, 2012. Poremećaji bele krvne slike. In: Božić T, Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, pp. 71-97.
38. Browne RW, Armstrong D, 2000. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. *Clin Chem.* 46: 829-836.
39. Bruhns P, 2012. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119: 5640-5649.
40. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al., 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol.* 167: 416-423.
41. Carlsen E, D, Jie Z, Liang Y, et al., 2015. Interactions between neutrophils and *Leishmania braziliensis* amastigotes facilitate cell activation and parasite clearance. *J Innate Immun.* 7: 354-363.
42. Carret C, Walas F, Carcy B, et al., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of three subspecies by restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J Eukaryot Microbiol.* 46: 298-303.



43. Cawston T, Mercer E, de Silva M, Hazleman BL, 1984. Metalloproteinases and collagenase inhibitors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 27: 285-290.
44. Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S, 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 34: 85-99.
45. Cerón JJ, Tecles F, Tvarijonavičiute A, 2014. Serum paraoxonase 1 (PON-1) measurement: an update. *BMC Vet Res.* 10: 74.
46. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD, 2006. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol.* 79: 214-222.
47. Chandra S, Ruhela D, Deb A, Vishwakarma RA, 2010. Glycobiology of the *Leishmania* parasite and emerging targets for antileishmanial drug discovery. *Expert Opin Ther Targets.* 14: 739-757.
48. Chaplin DD, 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125: S3-S23.
49. Chaudhuri S, Varshney JP, Patra RC, 2008. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Res Vet Sci.* 85: 120-124.
50. Chen ST, Lin YL, Huang MT, et al., 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature.* 453: 672-676.
51. Chen Y, Junger WG, 2012. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol.* 844: 115-124.
52. Chensue SW, Warmington KS, Lukacs NW, et al., 1995. Monocyte chemotactic protein expression during schistosome egg granuloma formation. Sequence of production, localization, contribution, and regulation. *Am J Pathol* 146: 130-138.
53. Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF, 1966. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 122: 1167-1171.
54. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al., 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 201: 19-25.
55. Coban C, Igari Y, Yagi M, et al., 2010. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe.* 7: 50-61.
56. Cohen HJ, Chovaniec ME, Wilson MK, Newburger PE, 1982. Con-A-stimulated superoxide production by granulocytes: reversible activation of NADPH oxidase. *Blood.* 60: 1188-1194.
57. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM, 1992. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem.* 267: 515-519.
58. Cray C, Zaias J, Altman NH, 2009. Acute phase response in animals: A review. *Comp Med.* 59: 517-526.
59. Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, et al., 2010. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. *Vet Med (Praha).* 55: 163-171.
60. Crnogaj M, Kiš I, Kučer N, et al., 2015. Lipid peroxidation in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *Vet Arhiv.* 85: 37-48.
61. Crnogaj M, Cerón JJ, Šmit I, et al., 2017. Relation of antioxidant status at admission and disease severity and outcome in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *BMC Vet Res.* 13: 114.
62. Curry TE Jr, Mann JS, Estes RS, Jones PBC, 1990.  $\alpha$ 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology.* 127: 63-68.
63. Dahlgren C, Karlsson A, 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods.* 232: 3-14.

64. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, et al., 1998. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 9: 2082-2088.
65. Davitkov D, Vučićević M, Stevanović J, et al., 2015. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Vet Hungarica.* 63: 199-208.
66. Debierre-Grockiego F, Schwarz RT, 2010. Immunological reactions in response to apicomplexan glycosylphosphatidylinositols. *Glycobiology.* 20: 801-811.
67. DeClue AE, 2009. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E (Eds), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 8<sup>th</sup> ed, Saunders Elsevier, Saint Louis, pp. 1492-1504.
68. De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, et al., 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 273: 22528-22536.
69. Deisseroth A, Dounce AL, 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* 50: 319-375.
70. De Pablo R, Monserrat J, Prieto A, Alvarez-Mon M, 2014. Role of circulating lymphocytes in patients with sepsis. *Biomed Res Int.* 2014: 671087.
71. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Met Cardiovasc Dis.* 15: 316-328.
72. Deroost K, Tyberghein A, Lays N, et al., 2013. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 48: 589-600.
73. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE, 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 6: 313-326.
74. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA, 1990. *Exp Med Ill.* 171: 1155-1162.
75. Dirican N, Dirican A, Sen O, et al., 2016. Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer? *Redox Rep.* 21: 197-203.
76. Dkhil MA, Abdel-Baki AS, Al-Quraishy S, Abdel-Moneim AE, 2013. Hepatic oxidative stress in Mongolian gerbils experimentally infected with *Babesia divergens*. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 346-351.
77. Dong C, Flavell RA, 2000. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res Ther.* 2: 179-188.
78. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN, 2000. Rabbit serum paraoxonase (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 275: 33435-33442. 3
79. D'Souza V, Swagata H, Vijayalaxmi K, Namratha AS, 2009. Erythrocyte antioxidant enzymes and their correlation with malondialdehyde in malaria. *Biomed Res.* 20:25-27.
80. Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, et al., 2002. Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *Eur J Immunol.* 32: 2163-2171.
81. Dunkelberger JR, Song WC, 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20: 34-50.
82. Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov AV, 2019. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways. *Antioxidants (Basel).* 8: 475.
83. Eckersall PD, 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp Haematol Int.* 5: 93-97.
84. Ehrenwald E, Chisoim GM, Fox PL, 1994. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 93: 1493-1501.
85. Elkington PTG, O'Kane CM, Friedland JS, 2005. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol.* 142: 12-20.

86. Ellman E, 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82: 70-77.
87. English WR, Puente XS, Freije JM, et al., 2000. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem.* 275: 14046-14055.
88. Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V, 1997. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clin Biochem.* 30: 631-639.
89. Erel O, Neselioglu S, 2014. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 47: 326-332.
90. Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, et al., 2014. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. *Vet Parasitol.* 205: 38-45.
91. Esterbauer H, Zollner H, 1989. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Rad Biol Med.* 7: 197-203.
92. Esterbauer H, Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol.* 186: 407-421.
93. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med.* 11: 81-128.
94. Falcão SA, Weinkopff T, Hurrell BP, et al., 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 9: e0003601.
95. Faurschou M, Borregaard N, 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 14: 1317-1327.
96. Fingleton B, 2017. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1864: 2036-2042.
97. Flohé L, 1971. Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects. *Klin Wochenschr.* 49: 669-683.
98. Fouzder C, Mukhuty A, Das S, Chattopadhyay D, 2019. TLR signaling on protozoan and helminthic parasite infection. In: Nima Rezaei (Ed), *Toll-like receptors*, IntechOpen.
99. Frankel EN, Neff WE, 1983. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *BBA Lipids Lipid Metab.* 754: 264-270.
100. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S, 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22: 556-560.
101. Futosi K, Fodor S, Mócsai A, 2013. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 3: 638-650.
102. Gaffen SL, 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 9: 556-567.
103. Galán A, Mayer I, Barić Rafaj R, et al., 2018. MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by *Babesia canis*. *PLoS ONE.* 13: e0190474.
104. Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S, 2002. Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 86: 127-136.
105. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, et al., 1995. Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF- $\alpha$ . *J Leukocyte Biol.* 57: 774-777.
106. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A, 2009. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 8: 40-52.
107. Gessler P, Pfenninger J, Pfammatter JP, Carrel T, Baenziger O, Dahinden C, 2003. Plasma levels of interleukin-8 and expression of interleukin-8 receptors on circulating neutrophils and monocytes after cardiopulmonary bypass in children. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126: 718-725.
108. Geurts N, Opdenakker G, van den Steen PE, 2012. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther.* 133: 257-279.

109. Ghosh D, Stumhofer JS, 2013. Do you see what I see: Recognition of protozoan parasites by Toll-like receptors. *Curr Immunol Rev.* 9: 129-140.
110. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA, 1991. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 31: 32-35.
111. Goddard A, Leisewitz AL, Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT, Schoeman JP, 2016. Excessive pro-inflammatory serum cytokine concentrations in virulent canine babesiosis. *PLoS ONE.* 11: e0150113.
112. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G, 1979. Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals. *J Bio Chem.* 254: 4040-4045.
113. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G, 1982. Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann N Y Acad Sci.* 389: 368-379.
114. Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV, 2017. Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state. *Oxid Med Cell Longev.* 2017: 9759735.
115. Gougerot-Pocidalo MA, Roche Y, Fay M, Perianin A, Bailly S, 1989. Oxidative injury amplifies interleukin-1-like activity produced by human monocytes. *Int J Immunopharmacol.* 11: 961-969.
116. Gowda DC, 2007. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 23: 596-604.
117. Griffin, 2008. Cytokines and chemokines. In: *Encyclopedia of virology*, Elsevier Ltd, Philadelphia, pp. 620-624.
118. Gu L, Tseng S, Horner RM, et al., 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature.* 404: 407-411.
119. Gutteridge JMC, Richmond R, Halliwell B, 1980. Oxygen free radicals and lipid peroxidation: Inhibition by the protein caeruloplasmin. *FEBS Lett.* 112: 269-272.
120. Gutteridge JMC, Stocks J, 1981. Ceruloplasmin: physiological and pathological perspective. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 14: 257-329.
121. Günzler WA, Kremers H, Flohe L, 1974. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (E.C. 1.11.1.9) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 12: 444.
122. Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG, 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 104: 580-587.
123. Halliwell B, Gutteridge JMC, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-14.
124. Halliwell B, Gutteridge JM, 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
125. Halliwell B, 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 344: 721-724.
126. Handel TM, Domaille PJ, 1996. Heteronuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry.* 35: 6569-6584.
127. Hanna RN, Cekic C, Sag D, et al., 2015. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science.* 350: 985-990.
128. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al., 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 1: 475-482.
129. Hasan RN, Schafer AI, 2008. Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF-κB. *Circ Res.* 102: 42-50.
130. Hawkins WB, Whipple GH, 1938. The life cycle of the red blood cell in the dog. *Am J Physiol.* 122: 418-427.

131. Hecker M, Ullrich V, 1989. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem.* 264: 141-150.
132. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, et al., 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* 14: 821-830.
133. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL, 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 260: 2493-2500.
134. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS, 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 26: 477-489.
135. Hill RL, Delaney R, Fellows RE, Lebovitz HE, 1966. The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 56: 1762-1769.
136. Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L, 2002. Peroxiredoxins. *J Biol Chem.* 383: 347-364.
137. Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E, et al., 2006. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: Prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis.* 38: 867-872.
138. Holmberg CG, Laurell CB, 1947. Investigations in serum copper; nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chem Scand.* 1: 944-950.
139. Hong TH, Chang CH, Ko WJ, et al., 2014. Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome. *J Transl Med.* 12: 146.
140. Hu ML, 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Meth Enzymol.* 233: 380-385.
141. Irwin PJ, 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vect.* 2: S4.
142. Irwin PJ, 2016. Babesiosis and Cytauxzoonosis. In: Shaw SE, Day MJ (Eds), *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*, 2<sup>nd</sup> edition, Manson Publishing Ltd, London, pp. 77-95.
143. Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al., 2009. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med.* 206: 2879-2888.
144. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, et al., 1996. Degradation of interleukin-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 271: 14657-14660.
145. James RW, 2006. A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases. *Clin Chem Lab Med.* 44: 1052-1059.
146. Janeway CA Jr, Medzhitov R, 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216.
147. Johnson HL, Chiou CC, Cho CT, 1999. Applications of acute phase reactants in infectious diseases. *J Microbiol Immunol Infect.* 32: 73-82.
148. Johnson V, Burgess B, Morley P, Bragg R, Avery A, Dow S, 2016. Comparison of cytokine responses between dogs with sepsis and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Immunol Immunopathol.* 180: 15-20.
149. Jones GE, Mould DL, 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Res Vet Sci.* 37: 87-92.
150. Jones DP, Go YM, 2010. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab.* 12: 116-125.
151. Kaneko JJ, 1989. Serum proteins and the dysproteinemias. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 4<sup>th</sup> edition, Academic Press, San Diego, pp. 142-165.
152. Kang JY, Lee JO, 2011. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem.* 80: 917-941.
153. Kany S, Vollrath JT, Relja B, 2019. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci.* 20: 6008.

154. Kaplan JE, Chrenek RD, Morash JG, Catarina M, Ruksznis L, Hannum G, 2008. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. *Comparative and Biochemistry Physiol A Mol Integr Physiol*. 151: 726-730.
155. Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Karlstam E, Wernersson S, 2012. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reprod Domest Anim*. 6: 337-341.
156. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WH, Hurst SD, Barrett TA, 1997. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol*. 158: 4129-4136.
157. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR, 2007. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol*. 37: 467-478.
158. Khokha R, Murthy A, Weiss A, 2013. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 13: 649-665.
159. Kimbrell DA, Beutler B, 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet*. 2: 256-267.
160. King C, 2009. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol*. 9: 757-766.
161. Kjemtrup AM, Conrad PA, 2006. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Vet Parasitol*. 138: 112-117.
162. Kohen R, Nyska A, 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 30: 620-650.
163. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V, 2009. IL-17 and TH17 Cells. *Ann Rev Immunol*. 27: 485-517.
164. Kovačević Filipović M, Radovanović A, 2012. Matične ćelije i njihova uloga u homeostazi tkiva. In: Božić T, Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, pp. 7-33.
165. Kovačić M, Marković D, Maslovarić I, et al., 2017. Serum proteins and lipids in mild form of calf bronchopneumonia: candidates for reliable biomarkers. *Acta Vet Beograd*. 67: 201-221.
166. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, et al., 2005. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 280: 8606-8616.
167. Kuleš J, de Torre-Minguela C, Barić Rafaj R, et al., 2016. Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis. *Res Vet Sci*. 105: 222-228.
168. Kuleš J, Gotić J, Mrljak V, Barić Rafaj R, 2017. Blood markers of fibrinolysis and endothelial activation in canine babesiosis. *BMC Vet Res*. 13: 82.
169. Kumar A, Varshney JP, Patra RC, 2006. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with *Ehrlichia canis* with or without concurrent infection with *Babesia gibsoni*. *Vet Res Comm*. 30: 917-920.
170. Kurihara T, Warr TGG, Loy J, Bravo R. 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*. 186: 1757-1762.
171. Kushner I, Mackiewicz A, 1987. Acute phase proteins as disease markers. *Dis Markers*. 5: 1-11.
172. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, et al., 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 12053-12057.
173. Laliberté J, Carruthers VB, 2011. *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Mol Biochem Parasitol*. 177: 49-56.

174. Landsteiner K, Chase MW, 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc Soc Exp Biol Med.* 49: 688-690.
175. Lawrence HS, 1949. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc Soc Exp Biol Med.* 71: 516-522.
176. Lehrer RI, Ganz T, 1990. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood.* 76: 2169-2181.
177. Leoratti FMdS, Trevelin SC, Cunha FQ, et al., 2012. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1710.
178. Lim SK, Ferraro B, Moore K, Halliwell B, 2001. Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. *Redox Rep.* 6: 219-227.
179. Løvstad RA, 1982. The protective action of ceruloplasmin on copper ion stimulated lysis of rat erythrocytes. *Int J Biochem.* 14: 585-589.
180. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN, 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286: 152-154.
181. Mahanta A, Ganguli P, Barah P, et al., 2018. Integrative approaches to understand the mastery in manipulation of host cytokine networks by protozoan parasites with emphasis on *Plasmodium* and *Leishmania* species. *Front Immunol.* 9: 296.
182. Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, 1984. Purification of a type V collagen-degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Coll Relat Res.* 4: 479-492.
183. Manicone AM, McGuire JK, 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 19: 34-41.
184. Marangoni NR, Melo GD, Moraes OC, Souza MS, Perri SH, Machado GF, 2011. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 33: 330-334.
185. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM, 1998. Reduced *ex vivo* interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood.* 91: 3439-3446.
186. Martínez-Orellana P, Marí-Martorell D, Montserrat-Sangrà S, Ordeix L, Baneth G, Solano-Gallego L, 2017a. *Leishmania infantum*-specific IFN- $\gamma$  production in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis at diagnosis and during treatment. *Vet Parasitol.* 248: 39-47.
187. Martínez-Orellana P, Quirola-Amores P, Montserrat-Sangrà S, et al., 2017b. The inflammatory cytokine effect of Pam3CSK4 TLR2 agonist alone or in combination with *Leishmania infantum* antigen on *ex-vivo* whole blood from sick and resistant dogs. *Parasites Vectors.* 10: 123.
188. Martínez-Orellana P, Montserrat-Sangrà S, Quirola-Amores P, González N, Solano-Gallego L, 2018. Cytokine effect of TLR3, TLR4, and TLR7 agonists alone or associated with *Leishmania infantum* antigen on blood from dogs. *Biomed Res Int.* 2018: 5693736.
189. Martínez-Subiela S, Tecles F, Parra MD, Cerón JJ, 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. *An Vet Murcia.* 17: 99-116.
190. Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Cerón JJ, 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res.* 64: 1021-1026.
191. Masatani T, Asada M, Ichikawa-Seki M, et al., 2014. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci.* 76: 139-143.
192. Masciantonio MG, Lee CKS, Arpino V, Mehta S, Gill SE, 2017. The balance between metalloproteinases and TIMPs: Critical regulator of microvascular endothelial cell function in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 147: 101-131.
193. Matijatko V, Mrljak V, Kiš I, et al., 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol.* 144: 242-250.

194. Matijatko V, Kiš I, Torti M, et al., 2009. Septic shock in canine babesiosis. *Vet Parasitol.* 162: 263-270.
195. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, et al., 2018. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep.* 8: 13995.
196. Mael J, 1984. Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. *Parasitol.* 88: 579-592.
197. McGuire JK, Li Q, Parks WC, 2003. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol.* 162: 1831-1843.
198. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM, 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science.* 289: 1202-1206.
199. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM, 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood.* 100: 1160-1167.
200. Melo GD, Marangoni NR, Marcondes M, Lima VMF, Machado GF, 2011. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: A preliminary report. *Vet J.* 188: 243-245.
201. Mierzejewska EJ, Welc-Faleciak R, Bednarska M, Rodo A, Bajer A, 2014. The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of central Asian Shepherd dogs. *Ann Agric Environ Med.* 21: 500-503.
202. Mikkola HKA, Orkin SA, 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development.* 133: 3733-3744.
203. Milanović Z, Beletić A, Vekić J, et al., 2020. Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol.* 282: 109140.
204. Mills GC, 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 229: 189-197.
205. Milutinović M, Radulović Z, 2002. Ecological notes on ticks, Acari: Ixodidae, in Serbia, central regions. *Acta Vet Beograd.* 52: 49-58.
206. Mogarekar MR, Talekar SJ, 2013. Serum lactonase and arylesterase activities in alcoholic hepatitis and hepatitis B. *Indian J Gastroenterol.* 32: 307-310.
207. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, et al., 2002. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry.* 41: 9462-9469.
208. Moldovan L, Moldovan NI, 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol.* 122: 395-412.
209. Momi S, Falcinelli E, Giannini S, et al., 2009. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis *in vivo*. *J Exp Med.* 206: 2365-2379.
210. Montealegre F, Lyons BM, 2021. Fluid Therapy in Dogs and Cats With Sepsis. *Front Vet Sci.* 8: 622127.
211. Montgomery AM, Sabzevari H, Reisfeld RA, 1993. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. *Biochim Biophys Acta.* 1176: 265-268.
212. Mordmüller B, Turrini F, Long H, Kreamsner PG, Arese P, 1998. Neutrophils and monocytes from subjects with the Mediterranean G6PD variant: effect of *Plasmodium falciparum* hemozoin on G6PD activity, oxidative burst and cytokine production. *Eur Cytokine Netw.* 9: 239-245.
213. Moresco EM, LaVine D, Beutler B, 2011. Toll-like receptors. *Curr Biol.* 21: R488-93.
214. Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 385: 733-736.



215. Mukaida N, Harada A, Matsushima K, 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 9-23.
216. Murase T, Ueda T, Yamato O, Tajima M, Maede Y, 1996. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci.* 58: 259-261.
217. Murata CE, Goldberg DE, 2003. *Plasmodium falciparum* falcilysin: a metalloprotease with dual specificity. *J Biol Chem.* 278: 38022-38028.
218. Murata H, Shimada N, Yoshioka M, 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 168: 28-40.
219. Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL, 2003. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 19: 320-328.
220. Nagase H, 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-160.
221. Nagase H, Visse R, Murphy G, 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69: 562-573.
222. Naik RS, Branch OH, Woods AS, et al., 2000. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med.* 192: 1563-1576.
223. Nam AR, Kim DH, Kim MJ, Lee JS, Yang SJ, Kim IS, 2016. S100A8 induces secretion of MCP-1, IL-6, and IL-8 via TLR4 in jurkat T cells. *Biomed Sci Lett.* 20: 60-64.
224. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N, 2019. Role of catalase in oxidative stress and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019: 9613090.
225. Naruse K, Ueno M, Satoh T, et al., 1996. A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics.* 34: 236-240.
226. Nauseef WM, McCormick S, Yi H, 1992. Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase. *Blood.* 80: 2622-2633.
227. Nordberg J, Arnér ES, 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31: 1287-1312.
228. Novak F, Vavrova L, Kodykova J, et al., 2010. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med.* 10: 21-25.
229. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B, 2005. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician.* 71: 105-112.
230. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M, 2003. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 1185-1199.
231. Opdenakker G, Masure S, Proost P, Billiau A, Van Damme J, 1991. Natural human monocyte gelatinase and its inhibitor. *FEBS Lett.* 284: 73-78.
232. Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J, 1991. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 317-324.
233. Opdenakker G, Van den Steen PE, van Damme J, 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 22: 571-579.
234. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, et al., 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 69: 851-859.
235. Osaki S, Johnson DA, Frieden E, 1966. The possible significance of the ferrous oxidase activity of caeruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem.* 241: 2746-2751.
236. Otsuka Y, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, 2001. Increased generation of superoxide in erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci.* 63: 1077-1081.

237. Oualha R, Barhoumi M, Marzouki S, Harigua-Souiai E, Ben Ahmed M, Guizani I, 2019. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. *Front Cell Infect Microbiol.* 9: 153.
238. Owen JA, Better FC, Hoban J, 1960. A simple method for the determination of serum haptoglobins. *J Clin Pathol.* 13: 163-164.
239. Owen J, Punt J, Stanford S, 2013a. Cells, organs, and microenvironments of the immune system. In: *Kuby Immunology*, 7<sup>th</sup> edition, WH Freeman, New York, pp. 27-65.
240. Owen J, Punt J, Stanford S, 2013b. Receptors and signaling: Cytokines and chemokines. In: *Kuby Immunology*, 7<sup>th</sup> edition, WH Freeman, New York, pp. 105-141.
241. Owen J, Punt J, Stanford S, 2013c. Innate immunity. In: *Kuby Immunology*, 7<sup>th</sup> edition, WH Freeman, New York, pp. 141-187.
242. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z, 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 221-233.
243. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS, 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4: 617-629.
244. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, et al., 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 1919-1924.
245. Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS, 2016. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol.* 100: 1239-1254.
246. Petering H, Götze O, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J, 1999. The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood.* 93: 694-702.
247. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM, 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 35: 163-187.
248. Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M, 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 167: 1547-59.
249. Peyron P, Maridonneau-Parini I, Stegmann T, 2001. Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes *in vitro*: involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria. *J Biol Chem.* 276: 35512-35517.
250. Pfeffer K, 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 185-191.
251. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Rahbari-Oskouia F, 2003. Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clin Chim Acta.* 328: 83-86.
252. Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, et al., 2004. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol.* 172: 4926-4933.
253. Prakash Krupakaran R, Balamurugan TC, Sheeba A, et al., 2016. A comparative study of serum gelatinase in normal and tumour affected dogs through gelatin zymography. *Cell Tissue Res.* 16: 5579-5582.
254. Prato M, Giribaldi G, Polimeni M, Gallo V, Arese P, 2005. Phagocytosis of hemozoin enhances matrix metalloproteinase-9 activity and TNF-alpha production in human monocytes: role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of falciparum malaria. *J Immunol.* 175: 6436-6442.
255. Petney TN, Pfaeffle MP, Skuballa JD, 2012. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *System Appl Acarol.* 17: 115-170.
256. Pryor WA, Stanley JP, 1975. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem.* 40: 3615-3617.

257. Pryor WA, 1989. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Rad Biol Med.* 7: 177-178.
258. Quaye IK, 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 735-742.
259. Radaković M, Davitkov D, Borozan S, et al., 2016. Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Vet J.* 217: 112-118.
260. Rajasekaran S, Anuradha R, Bethunaickan R, 2017. TLR specific immune responses against helminth infections. *J Parasitol Res.* 2017: 6865789.
261. Ramaiah SK, Jaeschke H, 2007. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol.* 35: 757-766.
262. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A, 2011. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res.* 317: 575-589.
263. Renckens R, Roelofs JJ, Florquin S, et al., 2006. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense against abdominal sepsis. *J Immunol.* 176: 3735-3741.
264. Regner EL, Thompson CS, Iglesias AA, Guerrero SA, Arias DG, 2014. Biochemical characterization of thioredoxin reductase from *Babesia bovis*. *Biochimie.* 99: 44-53.
265. Reyers, F, Leisewitz, AL, Lobetti, RG, Milner, RJ, Jacobson, LS, 1998. Canine babesiosis in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for falciparum malaria? *Ann Trop Med Parasitol.* 92: 503-511.
266. Reznick AZ, Packer L, 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol.* 233: 357-363.
267. Ribeiro AC, Ferreira R, Freitas R, 2018. Plant lectins: Bioactivities and bioapplications. *Stud Nat Prod Chem.* 58: 1-42.
268. Richard C, Lemonnier F, Thibault M, Ccuturier M, Auzepy P, 1990. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care Med.* 18: 4-9.
269. Rollins BJ, 1997. Chemokines. *Blood.* 90: 909-928.
270. Romagnani S, 1991. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res.* 21: 152-158.
271. Roncalli AR, 2001. The history of Italian parasitology. *Vet Parasitol.* 98: 3-30.
272. Rot A, von Andrian UH, 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 22: 891-928.
273. Rubio CP, Martinez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, et al., 2016. Changes in serum biomarkers of oxidative stress after treatment for canine leishmaniosis in sick dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 49: 51-57.
274. Sadler AJ, Williams BR, 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 8: 559-568.
275. Sainz Á, Roura X, Miro G, Estrada-Pena A, et al., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors.* 8: 75.
276. Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD, 1989. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 264: 21-26.
277. Saleh M, 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. *Res Vet Sci.* 86: 43-48.
278. Salem N, Yehia S, Farag H, Awany Elkhia M, 2016. Clinical, hemato-biochemical alterations and oxidant-antioxidant biomarkers in *Babesia*-infected calves. *Int J Vet Sci Med.* 4: 17-22.
279. Salvin SB, Youngner JS, Lederer WH, 1973. Migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *Infect Immun.* 1: 68-75.
280. Sardesai VM, 1995. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract.* 10: 19-25.
281. Schetters T, 2005. Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol.* 21: 179-184.
282. Schetters T, 2019. Mechanisms involved in the persistence of *Babesia canis* infection in dogs. *Pathogens.* 8: 94.

283. Schneider C, Boeglin WE, Yin H, Porter NA, Brash AR, 2008. Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chem Res Toxicol.* 21: 895-903.
284. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA, 2012. Babesia: a world emerging. *Infect Genet Evol.* 12: 1788-1809.
285. Schonbeck U, Mach F, Libby P, 1998. Generation of biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 $\beta$  processing. *J Immunol.* 161: 3340-3346.
286. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA, 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75: 163-189.
287. Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B, 2007. Neutrophil activation via  $\beta$ 2 integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost.* 98: 262-273.
288. Segal AW, 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 23: 197-223.
289. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL, 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med.* 56: 509-538.
290. Shortt HE, 1973. *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mammalian hosts. *Int J Parasitol.* 3: 119-148.
291. Shubayev VI, Myers RR, 2002. Endoneurial remodeling by TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$ -releasing proteases: a spatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 7: 28-36.
292. Singh RK, Srivastava A, Singh N, 2012. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res.* 167: 445-451.
293. Smith RJ, Iden SS, 1980. Properties of concanavalin A-elicited granule exocytosis from human polymorphonuclear neutrophils. *Inflammation.* 4: 343-358.
294. Smith-Garvin J, Koretzky G, Jordan M, 2009. T cell activation. *Ann Rev Immunol.* 27: 591-619.
295. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW, 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 38: 73-83.
296. Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, et al., 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites Vectors.* 9: 336.
297. Sopata I, Dancewics AM, 1974. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta.* 370: 510-523.
298. Sönmez MG, Kozanhan B, Deniz ÇD, et al., 2018. Is oxidative stress measured by thiol/disulphide homeostasis status associated with prostate adenocarcinoma? *Cent Eur J Immunol.* 43: 174-179.
299. Sternlicht MD, Werb Z, 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 463-516.
300. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr, 1993. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 75: 1434-1441.
301. Stocks J, Gutteridge JM, Sharp RJ, Dormandy TL, 1974. The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relationship to serum proteins and tocopherol. *Clin Sci Mol Med.* 47: 223-233.
302. Stüve O, Dooley NP, Uhm JH, et al., 1996. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes *in vitro*: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol.* 40: 853-863.
303. Stüve O, Chabot S, Jung SS, Williams G, Yong VW, 1997. Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. *J Neuroimmunol.* 80: 38-46.
304. Sunderman FW Jr, Nomoto S, 1970. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin Chem.* 16: 903-10.
305. Swain JA, Darley-Usmar V, Gutteridge JMC, 1994. Peroxynitrite releases copper from ceruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* 342: 49-52.

306. Takeda K, Shimada Y, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I, 1984. Plasma lipid peroxides and alpha tocopherol in critically ill patients. *J Crit Care Med.* 12: 957-959.
307. Takeuchi O, Akira S, 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140: 805.
308. Tanaka R, Murota A, Nagashima Y, Yamane Y. 2002. Changes in platelet life span in dogs with mitral valve regurgitation. *J Vet Intern Med.* 16: 446-451.
309. Tanaka M, Sakurai T, Yokoyama N, Inoue N, Kawazu SI, 2009. Cloning and characterization of peroxiredoxin in *Babesia bovis*. *Parasitol Res.* 105: 1473-1477.
310. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT, 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 249: 158-175.
311. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, et al., 2002. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 169: 3876-3882.
312. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses.* 6: 920-940.
313. Tóthová C, Lukáč B, Kadaši M, Baranova D, Weissova T, 2019. The electrophoretic pattern of serum proteins in dogs with babesiosis. *Acta Vet (Brno).* 88: 425-432.
314. Tóthová C, Karasová M, Blaňarová L, Fialkovičová M, Nagy O, 2020. Differences in serum protein electrophoretic pattern in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni* and *Babesia canis*. *Sci Rep.* 10: 1-9.
315. Travis JC, Brown SO, Sanders BG, 1970. A polymeric form of haptoglobin in the gamma-irradiated Spanish goat. *Biochem Genet.* 4: 639-649.
316. Traynor TR, Herring AC, Dorf ME, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB, 2002. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of Th1 immunity. *J Immunol.* 168: 4659-4666.
317. Tvarijonaviciute A, Kocaturk M, Cansev M, Tecles F, Ceron JJ, Yilmaz Z, 2012. Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. *Res Vet Sci.* 93: 668-674.
318. Uilenberg G, 2006. Babesia – a historical overview. *Vet Parasitol.* 138: 3-10.
319. Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T, 2005. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol.* 34: 144-147.
320. Uribe-Querol E, Rosales C, 2017. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front Immunol.* 8: 1368.
321. Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G, 1999. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10: 61-86.
322. Van Damme J, De Ley M, Claeys H, Billiau A, Vermynen C, De Somer P, 1981. Interferon induced in human leukocytes by concanavalin A: isolation and characterization of  $\gamma$ - and p-type components. *Eur J Immunol.* 11: 937-942.
323. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- $\alpha$  and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 96: 2673-2681.
324. Van Kampen EJ, Zijlstra WG, 1961. Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin Chim Acta.* 6: 538-544.
325. Visse R, Nagase H, 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92: 827-839.
326. Volpin G, Cohen M, Assaf M, Meir T, Katz R, Pollack S, 2014. Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGF $\beta$ ) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop.* 38: 1303-1309.
327. Weeks BS, Schnaper HW, Handy M, Holloway E, Kleinman HK, 1993. Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B). *J Cell Physiol.* 157: 644-649.

328. Weinbaum DL, Sullivan JA, Mandell GL, 1980. Receptors for concanavalin A cluster at the front of polarized neutrophils. *Nature*. 286: 725-727.
329. Weiser G, 2012. Neutrophil production, trafficking, and kinetics. In: Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell (Eds), *Veterinary hematology and clinical chemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, Willey-Blackwell, New Jersey, pp. 123-127.
330. Weydert CJ, Cullen JJ, 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 5: 51-66.
331. Winterbourn C, Kettle AJ, Hampton MB, 2016. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem*. 85: 765-792.
332. Wlosniewski A, Leriche MA, Chavigny C, et al., 1997. Etude du portage asymptomatique de *Babesia canis* en zone d'enzootie [Asymptomatic carriers of *Babesia canis* in an enzootic area]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 20: 75-86.
333. Wykes MN, Horne-Debets JM, Leow CY, Karunarathne DS, 2014. Malaria drives T-cells to exhaustion. *Front Microbiol*. 5: 249.
334. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T, 2008. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol*. 9: 1179-1188.
335. Yana I, Seiki M, 2002. MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. *Clin Exp Metastasis*. 19: 209-215.
336. Yang J, Zhang L, Yu C, et al., 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2: 1.
337. Yardim-Akaydin S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, Sepici V, 2004. Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radic Res*. 38: 623-628.
338. Yazdan-Ashoori P, Liaw P, Toltl L, et al., 2011. Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 26: 556-565.
339. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ, 1989. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear leukocytes. *J Immunol*. 142: 1956-1962.
340. Young HA, 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 16: 563-568.
341. Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R, 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol*. 89: 241-248.
342. Zhou H, Bernhard EJ, Fox FE, Billings PC, 1993. Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes. *BBA Mol Cell Res*. 1177: 174-178.
343. Zhu J, Krishnegowda G, Li G, Gowda DC, 2011. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. *Exp Parasitol*. 128: 205-211.
344. Zhu T, Liao X, Feng T, et al., 2017. Plasma monocyte chemoattractant protein 1 as a predictive marker for sepsis prognosis: a prospective cohort study. *Tohoku J Exp Med*. 241: 139-147.
345. Zwahlen RD, Spreng D, Wyder-Walther M, 1994. *In vitro* and *in vivo* activity of human interleukin-8 in dogs. *Vet Pathol*. 31: 61-66.

## **Biografija**

Kristina Spariosu je rođena 28. februara 1988. godine u Pančevu. Završila je gimnaziju „Uroš Predić” u Pančevu, nakon čega je upisala Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, školske 2007/2008. Tokom školovanja, bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Kao jedan od najboljih studenata svoje generacije, više puta je nagrađena od strane Fakulteta veterinarske medicine, a od strane Grada Pančeva nagrađena je za jednog od najboljih studenata završnih godina fakulteta. Diplomirala je 5. februara 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,27. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine je upisala školske 2015/2016. i položila sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 10. Odlukom Veća naučnih oblasti medicinskih nauka, na sednici održanoj 8. decembra 2020. godine, Kristini Spariosu je odobrena tema doktorske disertacije pod nazivom „Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *Babesia canis*“.

Nakon sticanja zvanja doktora veterinarske medicine, usavršavala se u Veterinarskoj ambulanti „Mondo Animale” i Veterinarskom specijalističkom institutu u Pančevu, Katedri za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Fakulteta veterinarske medicine i Veterinarskoj laboratoriji za kliničku dijagnostiku „VetLab“ u Beogradu. Kao istraživač-pripravnik, učestvovala je u radu projekta „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja” (OI 175061), pod rukovodstvom prof. dr Milice Kovačević Filipović. Trenutno je zaposlena kao istraživač-saradnik na Katedri za patološku fiziologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Kristina Spariosu je autor/koautor tri rada objavljenih u časopisima kategorije M21, dva rada kategorije M23, jednog rada objavljenog u časopisu kategorije M51 i četiri na međunarodnim kongresima kategorije M34.

Ljubav prema crtanju i građi ćelija spojila je kroz autorske ilustracije u okviru udžbenika Histologija sa embriologijom 2 (Marković i sar., 2016) i Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje (Pavlović i sar., 2018, Poglavlje III: Fiziologija graviditeta).

Slobodno vreme provodi sa Febom, Lajrom i Žučom, najboljim psima na svetu.

Kad poraste, biće akademik. Ili najmanje – autor omiljene knjige vaše dece.

(Why not both?)

## **Prilog 1.**

### **Izjava o autorstvu**

Potpisana: Kristina Spariosu

Broj upisa: 2015/5003

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

#### **„Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozooom *Babesia canis*“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Kristina Spariosu

Broj upisa: 2015/5003

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: „**Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *Babesia canis***“

Mentor 1: prof. dr Milica Kovačević Filipović

Mentor 2: prof. dr Svetlana Milanović

Potpisana: Kristina Spariosu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **„Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozooom *Babesia canis*“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.